TESIS

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA

"EFECTO DE LAS MUTACIONES PIM-1^{L184V} Y PIM-1^{S97N} EN LA DINÁMICA MOLECULAR DE LA ENZIMA PIM-1 ASOCIADO A CÁNCER LINFOMA"

Tesis para optar el título profesional de:

MÉDICO CIRUJANO

Presentado por:

Claudia Sofia Vargas Quiroz (0000-0002-5655-2942)

Cristopher Jose Edmundo Enriquez Saenz (0000-0001-8341-5233)

Asesor:

Vladimir Fernando Camel Paucar (0000-0002-3618-8215)

Lima – Perú

2024

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ACTA DE SUSTENTACIÓN

Lima, 30 de mayo del 2024.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Magister Eddy Segura Paucar
Miembro: Med. Diego Urrunaga Pastor
Miembro: Med. Juan Huaccho Rojas

Se reúnen para evaluar la tesis titulada: **"Efecto de las mutaciones PIM-1L184V y PIM-1S97N en la dinámica molecular de la enzima PIM-1 asociado a cáncer Linfoma"**

Presentado por os estudiantes **Enriquez Saenz Cristopher Jose Edmundo y Vargas Quiroz Claudia Sofia**

Para optar por el Titulo profesional de **Medico Cirujano**

Asesorado por el : **Magister Vladimir Fernando Camel Paucar**

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado su desempeño en la sustentación, concluyen de manera unánime calificar a:

Tesista: **Enriquez Saenz Cristopher Jose Edmundo**			Nota (en letras): 15 (quince)
Aprobado (x)	Aprobado - Muy buena ( )	Aprobado - Sobresaliente ( )	Desaprobado (.)

Tesista: **Vargas Quiroz Claudia Sofia**			Nota (en letras): 15 (quince)
Aprobado (x)	Aprobado - Muy buena ( )	Aprobado - Sobresaliente ( )	Desaprobado (.)

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.

Magister Eddy Segura Paucar
Presidente del Jurado

Magister Vladimir Fernando Camel Paucar
Asesor

Med. Diego Urrunaga Pastor
Miembro

Med. Juan Huaccho Rojas
Miembro

ANEXO: FORMATO DE DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DE CONTENIDO DE INFORME FINAL DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DE CONTENIDO DE INFORME FINAL DE TESIS / TRABAJO DE INVESTIGACIÓN[1]

Lima, 06 de junio del 2024

Señor,
Carlos Zavalaga Reyes

Director General de Investigación, Desarrollo e Innovación
Universidad Científica del Sur
Presente. –

De nuestra consideración,

Yo: Claudia Sofia Vargas Quiroz y Cristopher Jose Edmundo Enriquez Saenz, egresado de la carrera de Medicina Humana de la Universidad Científica del Sur, en conjunto con el asesor de Vladimir Fernando Camel Paucar, declaramos que este informe final de tesis/trabajo de investigación titulado: Efecto de las mutaciones PIM-1L184V y PIM-1S97N en la dinámica molecular de la enzima PIM-1 asociado a cáncer Linfoma, sustentado para obtener el título profesional de Médico Cirujano es original.

Es decir, no contiene plagio parcial ni total, cuando se utilizó información de fuentes externas se reconoció la autoría mediante la adecuada citación y los resultados obtenidos son producto entero de mi (nuestra) investigación y no han sido falseados ni fabricados. Todo esto en cumplimiento del Código de ética en la investigación, Reglamento del Comité de Integridad Científica, Reglamento de Propiedad Intelectual, Normas y procedimientos de los trabajos de investigación para la obtención de títulos profesionales y grados académicos [2], que afirmamos conocer en su totalidad.

Por ello, en caso de identificarse alguna situación de plagio, falsificación o fabricación de resultados, nos allanamos al proceso de investigación que establezca la Universidad y las posibles sanciones que pudieran surgir.

Firmamos en conformidad con lo declarado,

Firma tesista
Claudia Sofia Vargas Quiroz
DNI: 70619056

Firma del asesor de tesis
Vladimir Fernando Camel Paucar
DNI: 71271603

Firma tesista
Cristopher Jose Edmundo Enriquez Saenz
DNI: 48298629

[1] En conformidad con la Resolución del Consejo Directivo N° 084-2022-SUNEDU/CD
[2] Los documentos están en: https://investigacion.cientifica.edu.pe/reglamentos/

INFORME DE REVISIÓN DE ORIGINALIDAD

Título del documento evaluado. Efecto de las mutaciones PIM-1L184V y PIM-1S97N en la dinámica molecular de la enzima PIM-1 asociado a cáncer Linfoma

Autores. Cristopher Jose Edmundo Enriquez Saenz; Claudia Sofia Vargas Quiroz

Mecanismo de revisión de originalidad. Evaluación con Turnitin (ID 2412094732).

Resultado de la evaluación. 6%

Revisado por. Helbert Rubén Borja García; Magaly Kelly Guerrero Huaracallo.

Comentarios sobre la revisión. Filtros usados: excluir fuentes de menos de 12 palabras.



TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

DEDICATORIA

A nuestros queridos padres y hermanas. Este logro académico es un reflejo del esfuerzo que han invertido para brindarnos una educación. Cada sacrificio que han hecho y trabajo duro es fundamental de nuestro éxito. Su dedicación y compromiso nos motiva a ser mejores profesionales.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a nuestra institución por brindarnos una excelente educación que nos ha moldeado en este camino. Nuestro tiempo aquí ha sido un viaje de aprendizaje y crecimiento que siempre valoraremos

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ÍNDICE

DEDICATORIA **¡Error! Marcador no definido.**

AGRADECIMINETO **¡Error! Marcador no definido.**

ÍNDICE 2

ÍNDICE DE FIGURAS 4

ÍNDICE DE TABLAS 5

ÍNDICE DE ANEXOS 6

I. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 7

1.1 Pregunta general 9

1.2 Preguntas específicas 9

II. INTRODUCCIÓN 9

III. JUSTIFICACIÓN 16

IV. OBJETIVO GENERAL E HIPÓTESIS 18

4.1 Objetivo General 18

4.2 Objetivos específicos 18

4.3 Hipótesis general 18

4.4 Hipótesis específica 18

V. MATERIALES Y MÉTODOS 20

5.1. Caracterización de la estructura primaria y secundaria 20

5.1.1 Alineamiento de secuencias múltiples 20

5.1.2. Clasificación de las isoformas de PIM-1 20

5.2 Comportamientos estructurales y funcionales 21

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

5.2.1 Análisis de modo normal 21

5.2.2 Dinámica Molecular 21

5.2.3 Análisis de componentes principales 22

5.2.4 Matrices dinámicas de correlación cruzada (DCCM) 22

5.3 Análisis de Estabilidad y Flexibilidad 22

VI. RESULTADOS 24

6.1. Alineamiento de secuencia Múltiple 24

6.2. Caracterización de estructura terciaria 27

6.3. Perfiles de flexibilidad entre estructuras terciarias homólogas de PIM-1 y su relación con el Linfoma 31

6.4. Diferencias entre la flexibilidad intrínseca de la proteína wildtype PIM-1 y los mutantes PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N} 34

6.5. Movimiento colectivo de la proteína wildtype PIM-1 respecto de los mutantes PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N} 37

6.6. Movimientos de correlación cruzada de los segmentos proteicos de la proteína wildtype PIM-1 respecto de los mutantes PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N} 41

VII. DISCUSIONES 46

VIII. CONCLUSIONES 51

IX. RECOMENDACIONES 53

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

ANEXOS 60

Anexo 01. Secuencia de aminoácidos 60

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Anexo 02. Análisis de Ramachandran 61

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Alineamiento de secuencia de la quinasa PIM-1 y sus mutaciones PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N} 26

Figura 2. Caracterización de la estructura terciaria de la quinasa PIM-1. 29

Figura 3. Evaluación de estabilidad y flexibilidad entre estructuras terciarias homólogas de la quinasa PIM-1. 34

Figura 4. Perfiles RMSD y RMSF de PIM-1 y sus mutantes, PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N}. 36

Figura 5. Análisis de componentes principales de la PIM-1 y sus mutantes. 41

Figura 6. Análisis de correlación cruzada (DCCM). 45

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Expresión de PIM quinasas en diversos tipos de cáncer (14) 13

Tabla 2. Función de aminoácidos importantes de la PIM-1. 30

Tabla 3. Promedio y desviación estándar de RMSD. Regiones seleccionadas por residuos con RMSF media más alta (0.3 nm). 37

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 01. Secuencia de aminoácidos 58

Anexo 02. Análisis Ramachandran 59

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

RESUMEN

Objetivo: Determinar los efectos de las mutaciones PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N} en la interacción y dinámica molecular de residuos de aminoácidos de la PIM-1^{Wt} y su relación con el Linfoma. **Material y métodos:** Estudio computacional, se combinó simulaciones de dinámica molecular y análisis estructural para modelar, simular y analizar las mutaciones en la enzima PIM-1. A nivel descriptivo, se detallan las estructuras y funcionalidades de la enzima y sus mutaciones, a nivel explicativo se exploran y explican sus efectos en la dinámica molecular y funcionalidad. **Resultados:** El alineamiento de secuencias múltiples reveló mutaciones clave que afectan las regiones N-terminal y C-terminal. La estructura terciaria bilobulada de PIM-1 muestra actividad constitutiva debido a su configuración catalítica única. El análisis PCA identificó dos grupos principales de isoformas, diferenciados por su conformación abierta o cerrada. Las simulaciones de dinámica molecular indicaron que las mutaciones afectan la flexibilidad y estabilidad de la proteína, con PIM-1 mostrando mayor variabilidad estructural. El análisis de correlación cruzada sugirió movimientos coordinados entre los dominios N-terminal y C-terminal, cruciales para la función enzimática. **Conclusiones:** Las mutaciones de la enzima PIM-1 alteran regiones clave de la proteína, pero no afectan los sitios fundamentales, sugiriendo que la capacidad catalítica y la regulación biológica de PIM-1 se mantienen intactas. Sin embargo, la dinámica molecular mostró que estas mutaciones influyen significativamente en la dinámica estructural de la enzima, afectando las correlaciones cruzadas en regiones específicas. **Palabras claves:** PIM-1, Linfoma, Análisis de componentes principales, Correlaciones cruzadas, Efectos conformacionales.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ABSTRACT

Objective: Determine the effects of the PIM-1L184V and PIM-1S97N mutations on the molecular dynamics and interaction of amino acid residues of PIM-1Wt and its relationship with Lymphoma. **Material and methods:** Computational study, molecular dynamics simulations and structural analysis were combined to model, simulate and analyze mutations in the PIM-1 enzyme. At a descriptive level, the characteristics and structural of the enzyme and its mutations are detailed, at an explanatory level its effects on molecular dynamics and functionality are explored and explained. **Results:** Multiple sequence alignment revealed key mutations affecting the N-terminal and C-terminal regions. The bilobed tertiary structure of PIM-1 shows constitutive activity due to its unique catalytic configuration. PCA analysis identified two main groups of isoforms, differentiated by their open or closed conformation. Molecular dynamics simulations indicated that the mutations affect the flexibility and stability of the protein, with PIM-1 showing greater structural variability. Cross-correlation analysis suggested coordinated movements between the N-terminal and C-terminal domains, crucial for enzyme function. **Conclusions:** Mutations of the PIM-1 enzyme alter key regions of the protein, but do not affect the fundamental sites, suggesting that the catalytic capacity and biological regulation of PIM-1 remain intact. However, molecular dynamics showed that these mutations significantly influence the structural dynamics of the enzyme, affecting cross-correlations in specific regions. **Keywords:** PIM-1, Lymphoma, Principal component analysis, Cross-correlations, Conformational effects.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

I. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Pregunta general

¿Como las mutaciones S97N y L184V afectan la dinámica molecular y en la correlación de movimientos de los residuos de aminoácidos de la enzima PIM-1^{WT}?

1.2 Preguntas específicas

I. ¿Habrá patrones de flexibilidad entre las diferentes estructuras terciarias de la enzima PIM-1 disponibles en el repositorio del PDB?
II. ¿Existirá variaciones en la flexibilidad de los residuos de aminoácidos de la proteína PIM-1^{WT} cuando hay presencia de las mutaciones L184V y S97N?
III. ¿Serán diferentes los movimientos de las enzimas mutantes PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N} en función del PIM-1^{WT}?
IV. ¿Existirá cambios en el movimiento de correlación cruzada de los mutantes PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N} en función del PIM-1^{WT}?

II. INTRODUCCIÓN

Los linfomas son un grupo de neoplasias malignas de los tejidos linfoides formados por diversos progenitores de células B, T o T N/K, tiene una incidencia de 7.8 casos de 100 000 habitantes y una índice de mortalidad de 3.7 pacientes de 100 000 habitantes, (1) además se consideran como el quinto cáncer más común en Estados Unidos y la octava causa de muerte por cáncer en México.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

(1,2) En el Perú para el año 2023, los linfomas ocupan la novena posición de las neoplasias que afectan a la población siendo más frecuente en varones que en mujeres. (3)

La acumulación de cambios genéticos y epigenéticos da lugar a mutaciones del ADN que se concentran en diversas fases de la maduración de los linfocitos B, T y NK. Estas mutaciones son la causa de la progresión. (4) La serina/treonina quinasa de la familia de inserción proviral en murino (PIM) son conocidos como reguladores críticos en las neoplasias malignas. Por tanto, se ha sugerido que PIM-1 es un objetivo farmacológico atractivo en el cáncer. Los siguientes hechos hacen que las PIM quinasas sean especialmente atractivas para la inhibición farmacológica: (i) Un estudio del fenotipo de los ratones con deficiencia de PIM-1 indica un perfil de toxicidad favorable para los inhibidores de PIM. (ii) La terapia basada en inhibidores de PIM redujo el crecimiento in vivo de leucemia y adenocarcinoma de xenoinjertos. (iii) El modo de unión de ATP con el sitio de unión de PIM es significativamente diferente en comparación con la mayoría de las proteínas quinasas. Esta última característica es especialmente interesante para el diseño de fármacos, ya que promete la posibilidad de desarrollar inhibidores específicos. (5) Asimismo, se ha evidenciado que la sobreexpresión de PIM-1 está asociado en cánceres líquidos como sólidos, es decir en órganos hematopoyéticos encontrándose en enfermedades como leucemia aguda mieloide y linfoide, (6) mientras que, en órganos sexuales, se encuentra en el cáncer de próstata.

Así también, cabe señalar que la proteína proto oncogénica (PIM-1) está ubicada en el cromosoma 6 (6p21.2), abarcando 5 kb de ADN. (7) Se ha demostrado que tiene varias funciones como respuesta a la hipoxia, el ciclo celular y la resistencia

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

a apoptosis, (8) es por ello que su función es la transducción de señales en las células sanguíneas, que comunica la proliferación y supervivencia celular selectiva en la tumorigénesis. (9) En las enfermedades hematológicas agresivas como las neoplasias linfoblásticas de células T, afecta a la médula ósea, la sangre (T-ALL) o en los nódulos linfáticos (T-LBL), presentando la fosforilación sostenida y activación de la vía STAT5 (factores de transcripción que tienen funciones críticas in vivo en el desarrollo linfoide), (10) que induce la sobreexpresión genética alterando las transcripciones aberrantes. El resultado para la proliferación de aquellas células oncológicas de la vía STAT5 son por la sobreexpresión del PIM-1 que tiene efecto directo a C-MYC y mTOR. (11) En la leucemia mieloide aguda (LMA), un tercio de los pacientes afectados tienen mutaciones en el gen FLT3, que en su activación al receptor provoca la pérdida de auto inhibición, entre las vías que se activan está el STAT5, que genera la transcripción de los genes como ciclina D1, c-myc,p21, enzimas serina quinasas (PIM 1 y PIM2). (12)

PIM-1 es un objetivo de las caspasas, proteínas esenciales implicadas en la transmisión y ejecución de la señal apoptótica desencadenada por una variedad de eventos (13) y contiene 313 residuos de aminoácidos. Debido a la actividad serina/treonina quinasa, es considerada como miembro de la familia de proteínas PIM2 y PIM3, y está regulada transcripcionalmente por citocinas, mitógenos y numerosos factores de crecimiento. Los sitios de inicio de la traducción de PIM-1 y PIM2 son alternativos con dos y tres isoformas respectivamente. (14) Las mutaciones naturales de PIM-1 han demostrado ser efectivas en la actividad transcripcional de la fosfoproteína MYC, regulación del ciclo celular y la fosforilación e inhibición de proteínas pro-apoptóticas. (15) Sobre el mecanismo

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

de acción, la fosforilación a veces incrementa la estabilidad o su actividad enzimática, o por lo contrario, la inhibe, por consecuencia la ETK al fosforilar a la PIM-1 en el residuo Tyr218, incrementa la actividad de la PIM quinasa, que en condición natural su activación no depende de fosforilación externa. (16) Por el contrario, la fosfatasa PP2A se sobreexpresa y desfosforila PIM-1, lo que da lugar a ubiquitinación y destrucción a través de la vía proteasómica. La HSP90 interactúa con los PIM para aumentar su estabilidad, mientras que la HSP70 promueve la ubiquitinación y la destrucción del proteasoma. (17) Esto inhibe en condiciones de hipoxia, su actividad en humanos es a través de la regulación en la actividad transcripcional de MYC, también de la progresión del ciclo celular, fosforilación e inhibición de proteínas pro-apoptóticas, entre ellas BAD, MAP3K5, FOXO3.(18) El rol de las PIM quinasas en el desarrollo del cáncer, ocurre por su sobre-expresión en diferentes tumores hematopoyéticos y sólidos. En el ciclo celular y proliferación, puede inhibir a p21 y p27 lo cual impide la regulación negativa y permite a la célula tumoral superar la parada G1/S de la división celular. En la apoptosis, la Pim inhibe la apoptosis a través de BAD, esto evita la muerte programada de las células neoplásicas. También se ha encontrado que las Pim quinasas se relaciona con la migración de células tumorales a través de la fosforilación en Ser339 de CXCR4 relacionada con la angiogénesis, metástasis y resistencia terapéutica. (14) En condiciones fisiológicas, PIM-1 se expresa constitutivamente a un nivel bajo en varios tejidos. Su nivel aumenta significativamente en respuesta a diversos factores de crecimiento, mitógenos y citoquinas, ya que está regulado por las vías JAK-STAT y NF-κB. El PIM-1 se sobreexpresa en una amplia gama de tumores humanos, lo que sugiere su

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

participación en procesos oncogénicos. Además, en las neoplasias hematopoyéticas, expresión de PIM-1 se relaciona con un mal pronóstico. (5,6)

A la actualidad, se evaluaron un total de 100 mutaciones en el dominio quinasa de PIM-1; sin embargo, se desconoce los efectos que tiene las mutaciones en la dinámica molecular, sobre todo en los procesos de flexibilización, cierre y apertura de la proteína. A continuación, se resume la expresión de PIM quinasas en diferentes modelos tumorales:

Tabla 1. Expresión de PIM quinasas en diversos tipos de cáncer (14)

Tumor	Expresión de PIM	Pronóstico
Tumores hematopoyéticos		
Leucemia linfática crónica	PIM-1, PIM2	ND
Linfoma de células de manto	PIM-1, PIM2	Pobre
Linfoma difuso de células B grandes	PIM-1, PIM2	Pobre
Linfoma de Burkitt	PIM-1	ND
Linfoma de celular B	PIM-1, PIM2	Pobre
Leucemia mieloide aguda	PIM2	ND
Tumores sólidos		
Cáncer de próstata	PIM-1, PIM2	Pobre, favorable
Cáncer de vejiga	PIM-1	ND
Cáncer de páncreas	PIM-1, PIM3	Favorable (PIM-1)
Cáncer gástrico	PIM-1, PIM3	Pobre
Cáncer escamoso de cabeza y cuello	PIM-1	Pobre
Carcinoma escamoso oral	PIM-1	ND
Carcinoma colorrectal	PIM-1, PIM3	ND
Cáncer de hígado	PIM-1, PIM2, PIM3	ND
Liposarcoma	PIM-1	ND
Sarcoma de Ewing	PIM3	ND

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Fuente: La inacción de PIM quinasas potencia la muerte celular mediada por el ligando de muerte TRAIL en glioblastoma.

Los principales mecanismos por los cuales las PIM quinasas ejercen sus actividades oncogénicas incluyen: modulación de la actividad transcripcional de MYC (las PIM fosforilan MYC en S62 y S329, lo que da como resultado una mayor estabilidad de la proteína MYC y, por lo tanto, regulan su actividad transcripcional), regulación de la traducción dependiente de cap (estructura que poseen casi todos los mRNA eucariontes en su extremo 5' (m7GpppN, donde N es cualquier nucleótido), (19) regulación de progresión del ciclo y señalización a favor de la supervivencia que contrarresta la mayor sensibilidad de las células tumorales a la apoptosis. (5)

PIM-1 adopta un típico pliegue de quinasa bilobulada. El dominio N-terminal (residuos 37 a 122) consta principalmente de cadenas β y una única hélice α. El dominio C-terminal (residuos 126 a 305) es principalmente α-helicoidal. Los dominios están conectados a través de una región bisagra (residuos 123-125). En la quinasa PIM-1, su sitio de unión a ATP se ubica entre los dos dominios y está flanqueado por dos bucles: un bucle rico en glicina (bucle G; residuos 44 a 52) y un bucle de activación (residuos 185 a 204), y una región bisagra 5. (20) La singularidad de la unión de ATP en PIM-1 se manifiesta en interacciones dentro de la región bisagra. La mayoría de las proteínas quinasas interactúan con el ATP formando dos enlaces de hidrógeno dentro de esta región, mientras que la región bisagra de PIM-1 carece de uno de los donantes de enlaces de hidrógeno canónicos dentro de la columna vertebral, en lugar de contener un residuo de prolina (Pro123) en la posición equivalente. (21) Esta

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

característica distintiva estableció la proteína quinasa PIM-1 como un objetivo atractivo para el diseño de fármacos. (22)

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

III. JUSTIFICACIÓN

El cáncer en su complejidad se caracteriza por su proceso proliferativo y circulación descontrolada llamada metástasis, el cual tiene varias alteraciones, incluyendo mutaciones e inestabilidad genética, para su tratamiento se utilizan agentes quimioterapéuticos convencionales, con efectos secundarios y/o nulos. Surge la necesidad de la orientación para la base de nuevos fármacos quimioterapéuticos basados en la dinámica molecular. Sin embargo, los protooncogenes pasan por mutaciones donde pueden producir una división celular descontrolada, tomando como ejemplo, el aumento de la expresión de PIM-1 la cual se correlaciona con el grado de malignidad de las neoplasias hematológicas, como también otros tipos de cáncer (23). Las PIM quinasas son relacionados con la metástasis debido a la fosforilación de los anticuerpos GSK3b y FOXP3 por parte de PIM-1 ya que anula el papel anti-metastásico de las proteínas mencionadas.

Investigadores han comunicado que las variaciones genéticas que afectan al PIM-1 se relacionan con la capacidad intrínseca de resistencia a fármacos como ibrutinib. En su conjunto, estos datos apuntan hacia la participación de PIM-1 en el fenómeno de resistencia a ibrutinib, ya sea a través de alteraciones genéticas específicas o un incremento en la actividad genética de esta enzima, y sugieren que la modificación de este mecanismo podría potenciar la efectividad de ibrutinib. Se ha comprobado que la combinación de un inhibidor pan-PIM junto con ibrutinib puede superar la resistencia provocada tanto por la presencia de mutaciones en PIM-1 como por un tratamiento prolongado con fármacos. (8)

Dado que las terapias recientemente desarrolladas tienen como objetivo abordar las neoplasias mediante mecanismos vinculados a cambios genéticos, es

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

justificable investigar estas mutaciones genéticas y sus particularidades. (24) Por tanto, la comprensión del papel de las quinasas son áreas importantes de investigación en la genética oncológica y terapéutica del linfoma. Este estudio proporcionará un panorama genómico y proteómico de la interacción en la dinámica molecular y predicción de la funcionalidad de las proteínas en las mutaciones del PIM-1, ofreciendo un aporte para nuevos estudios dirigidos a la práctica clínica, los programas de desarrollo de fármacos y tratamientos biomédicos.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

IV. OBJETIVO GENERAL E HIPÓTESIS

4.1 Objetivo General

Evaluar como las mutaciones en la zona L184V y S97N afectan la dinámica molecular e interacción de residuos de aminoácidos de la enzima PIM-1^{WT}.

4.2 Objetivos específicos

I. Evaluar los patrones de movimiento de las estructuras homólogas de PIM-1 almacenadas en el repositorio protein data bank.
II. Analizar las variaciones de la flexibilidad de los residuos de aminoácidos de los mutantes PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N} y la proteína PIM-1.
III. Evaluar el movimiento de las enzimas mutantes PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N} en función del PIM-1^{WT}
IV. Examinar los cambios del movimiento de correlación cruzada de las enzimas mutantes PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N} en función del PIM-1^{WT}.

4.3 Hipótesis general

Las mutaciones L184V y S97N afectan la dinámica molécula y la interacción residuo-residuo de la enzima PIM-1^{WT} de *Homo sapiens*

4.4 Hipótesis específica

I. Existe un patrón de flexibilidad colectiva de los residuos de aminoácidos ubicados en la región C-terminal de las proteínas de la familia PIM.
II. Si existe diferencias en la flexibilidad de la enzima PIM-1^{WT} a causa de las mutaciones L184V y S97N, específicamente en las regiones donde se ubican las mutaciones.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

III. Los movimientos colectivos de las proteínas PIM-1^{WT} respecto de los mutantes, variara debido a cambios en los residuos L184V y S97N.

IV. Las correlaciones cruzadas de los residuos de aminoácidos de los mutantes L184V y S97N, será diferentes respecto del PIM-1^{WT}.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Caracterización de la estructura primaria y secundaria

5.1.1 Alineamiento de secuencias múltiples

Se utilizó el alineamiento múltiple de secuencias con BIOEDIT y el método ClustalW para estudiar los aspectos evolutivos de la conformación y funcionalidad del gen PIM-1 desde un enfoque estructural. Además, se realizó un estudio filogenético utilizando el modelo UPGMA del software MEGA6; se encontraron homólogos de la proteína PIM-1 en el repositorio de Uniprot.

5.1.2. Clasificación de las isoformas de PIM-1

Los códigos de la proteína PIM-1 (1XQZ, 1XR1, 4K0Y, 4K1B, 4X7Q, etc.) se utilizaron para identificar estructuras análogas utilizando BLAST, y las diversas estructuras de PIM-1 encontradas por cristalografía se descargaron del PDB del RCSB utilizando el software Bio3D. (25,26) Kalenkiewicz et al. emplearon un criterio de identidad de secuencia del 70% (27), y eliminaron las estructuras duplicadas con residuos de aminoácidos faltantes. Estas secuencias de aminoácidos se alinearon utilizando la técnica MUSCLE. (28) Las coordenadas cartesianas de los átomos C-α, que corresponden al dominio C-terminal, se utilizaron para superponer todas las conformaciones. Se empleó el análisis de componentes principales (PCA) para evaluar los vínculos entre grupos de conformaciones de estructuras apiladas, ya que es altamente eficaz para evaluar las distribuciones de estructuras experimentales y compararlas con conformaciones obtenidas a través de simulaciones de dinámica molecular (MD).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

5.2 Comportamientos estructurales y funcionales

5.2.1 Análisis de modo normal

Los estudios de NMA se llevaron a cabo utilizando la biblioteca Bio3D, que permitió el examen simultáneo de una gran cantidad de estructuras mediante la implementación del análisis de modos normales de conjunto (eNMA) (25,26). Este método permitió la rápida caracterización y comparación de la flexibilidad entre estructuras homólogas. El programa MUSCLE (28). se utilizó para proporcionar información en forma de estructuras pdbs alineadas. Luego se utilizó un modelo eficaz basado en C- α para determinar rápidamente los modos.

5.2.2 Dinámica Molecular

Se llevaron a cabo simulaciones con estructuras cristalográficas de alta resolución (>3 angstroms) de proteínas PIM-1. El paso inicial del procedimiento fue eliminar las moléculas de agua y los monómeros. Se evaluó la estereoquímica de los modelos mediante gráficos de Ramachandran generados en el sitio MolProbity (29), mientras que la validez de los pliegues se comprobó utilizando el servicio Verify3D en línea (30,31). Se utilizó la versión 2022 del software GROMACS (32) para ejecutar la simulación de dinámica molecular. Se utilizó el módulo PDB2GMX para crear la topología. Se utilizó el campo de fuerza CHARMM36 para simular todos los sistemas (33). Se empleó una caja de 10 Å para la dinámica, con condiciones de contorno periódicas (PBC) aplicadas en todas las direcciones. Los sistemas se resolvieron utilizando el modelo de agua TIP3P (34). Se utilizaron iones para enfriar el sistema, como en investigaciones anteriores (35,36). Para la reducción de energía se empleó el enfoque escalonado con 10 000 pasos, con el objetivo de encontrar energía menor a 1000 kcal/mol. Se empleó un sistema isotérmico-isobárico de dos fases para modelar

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

un entorno celular fisiológico. La primera fase de equilibrio se realizó en el ensamble NVT a una temperatura constante de 300 K, controlada por un termostato Berendsen. La segunda fase de equilibrio se llevó a cabo en el ensamble NPT a una presión de 1 bar durante 2 ns, utilizando el barostato Parrinello-Rahman. La simulación se extendió a lo largo de 100 ns con pasos de integración de 2 fs bajo condiciones de temperatura y presión constantes mediante la técnica de integración escalonada. Durante el equilibrio, todos los enlaces se restringieron utilizando el método LINCS (37), y las interacciones iónicas de largo alcance se manejaron mediante la técnica de malla de partículas de Ewald.

5.2.3 Análisis de componentes principales

Para comenzar el PCA, el archivo xtc se convirtió al formato dcd utilizando el programa CATDC. Luego se realizaron los PCA utilizando el paquete Bio3D de R-Project (25) (38,39) Los átomos Cα de los últimos 100 ns de las trayectorias se usaron para el el análisis de componentes principales. (40)

5.2.4 Matrices dinámicas de correlación cruzada (DCCM)

Se utilizó el DCCM para evaluar la dirección de movimiento de los átomos de Cα en simulaciones de dinámica molecular de la proteína PIM-1 y sus variantes. Al analizar la correlación de los cambios atómicos, este enfoque arrojó información valiosa sobre el impacto de la mutación en la dinámica de la proteína (41,42). Utilizando el programa Bio3D de R-Project, se construyó el DCCM (25)

5.3 Análisis de Estabilidad y Flexibilidad

Mediante el análisis RMSD (Root Mean Square Deviation) y RMSF (Root Mean Square Fluctuation), se evaluaron los niveles de estabilidad y flexibilidad. A lo

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

largo de la simulación, las diferencias entre la estructura inicial de la proteína y la estructura final se pudieron medir gracias al RMSD, que también reveló el estado de equilibrio de la proteína. Sin embargo, el valor RMSF se utilizó para hacer el análisis de flexibilidad, lo que permitió determinar la flexibilidad promedio, es decir, la forma en que fluctuó cada residuo, durante la simulación de dinámica molecular. Se utilizaron las herramientas GROMACS para calcular el RMSD y el RMSF, y ggplot2 para crear los gráficos (25,26,32).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

VI. RESULTADOS

6.1. Alineamiento de secuencia Múltiple

PIM-1 se sintetiza como una única cadena polipeptídica de 313 aminoácidos. El alineamiento de secuencias múltiples muestra las mutaciones en la proteína PIM-1. La primera es la sustitución del aminoácido serina (S) por asparagina (N) en la posición 97, denominada mutación PIM-1S97N, localizada en la región N-terminal. La segunda mutación, conocida como PIM-1L184V, implica el reemplazo del aminoácido leucina (L) por valina (V) en la posición 184, ubicada en la región C-terminal (Figura 1).

Asimismo, se observa el dominio N-terminal, que abarca los residuos 37 a 122, se caracteriza por estar compuesto principalmente de 7 cadenas β y una hélice α. Por otro lado, el dominio C-terminal, abarca los residuos 126 a 305, está principalmente compuesto por 8 hélices α y 5 cadenas β.

Estos dos dominios, N-terminal y C-terminal, están conectados a través de una región bisagra, que consiste en los residuos 123 a 125. La región bisagra actúa como un puente flexible que permite la comunicación y la transmisión de señales entre los dominios N-terminal y C-terminal. Esta flexibilidad estructural es importante para la función de la proteína PIM-1, ya que le permite adoptar diferentes conformaciones y realizar diversas interacciones moleculares según las condiciones y señales celulares.

Los tres puntos de unión de ATP, identificados como K67, E121 y D128, se mantienen completamente conservados en las tres secuencias analizadas. Asimismo, el sitio activo aceptor de protones (D167), crucial para la función catalítica de la enzima quinasa, permanece inalterado en todas las secuencias estudiadas. Además, los cuatro puntos de autofosforilación en la proteína PIM-

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

1, situados en S8, T23, S98 y S261 y responsables de regular su actividad biológica, muestran conservación en todas las secuencias (Figura 1).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

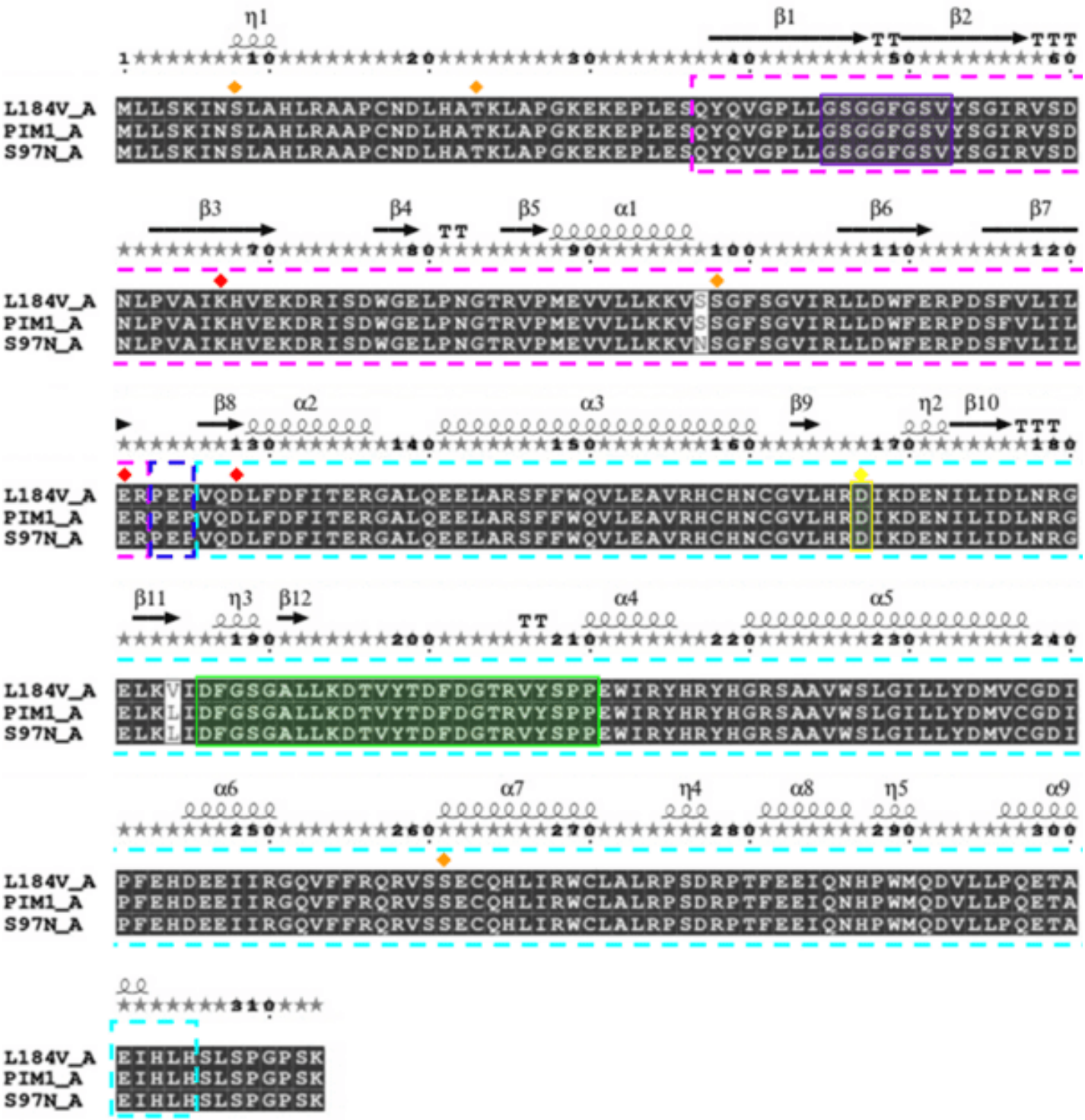


Figura 1 Alineamiento de secuencia de la quinasa PIM-1 y sus mutaciones PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N}

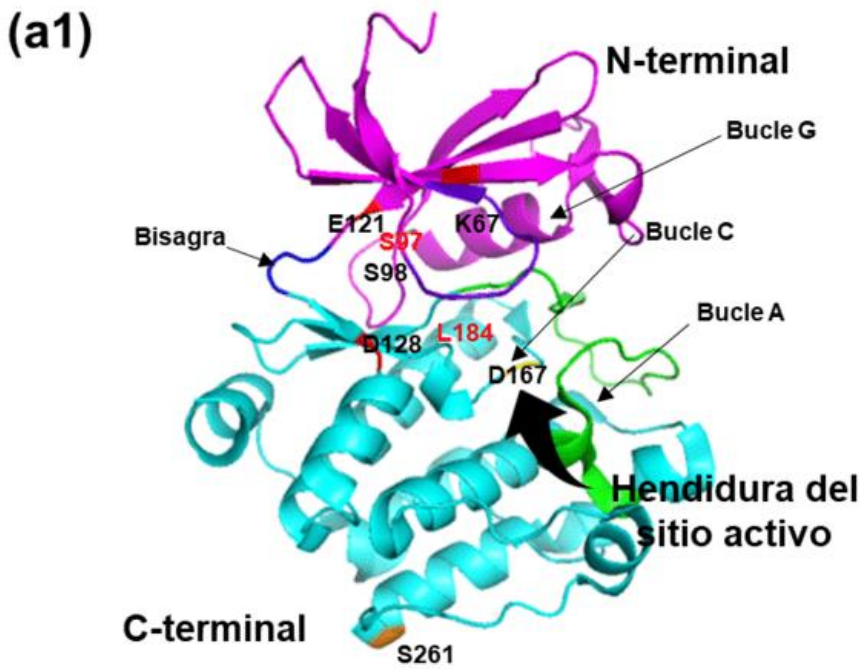
Las secuencias se alinearon usando ESPript 3. Las coincidencias exactas se muestran en texto blanco sobre fondo gris, y los cambios en los residuos en texto gris sobre fondo blanco. Además, el dominio N-terminal encerrado en un recuadro de bordes punteados magenta y el dominio C-terminal encerrado en un recuadro de bordes punteados cyan, mientras la región bisagra en un recuadro de bordes punteados azul. Los tres sitios de unión de ATP (K67, E121 y D128) están señalados por los rombos rojos, el sitio activo aceptor de protones (D167) por un rombo amarillo y los puntos de autofosforilación (S8, T23, S98 y S261) por rombos naranjas. Los bucles A, C y G, se encuentran sombreados de color verde, amarillo y morado, respectivamente. Asimismo, las hélices α se muestran en líneas en espiral y las hojas β como flechas en la parte superior de la secuencia de aminoácidos.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

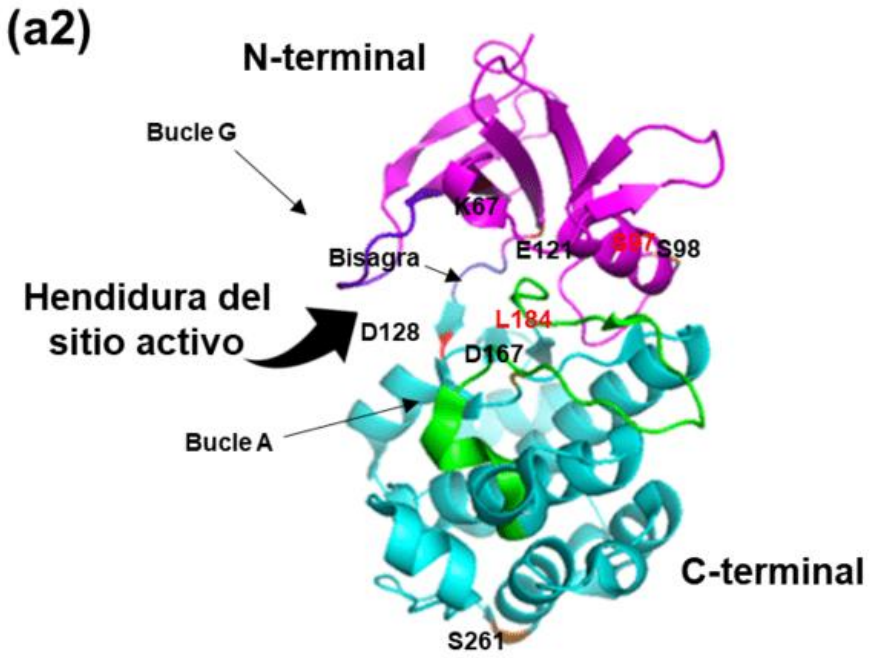
6.2. Caracterización de estructura terciaria

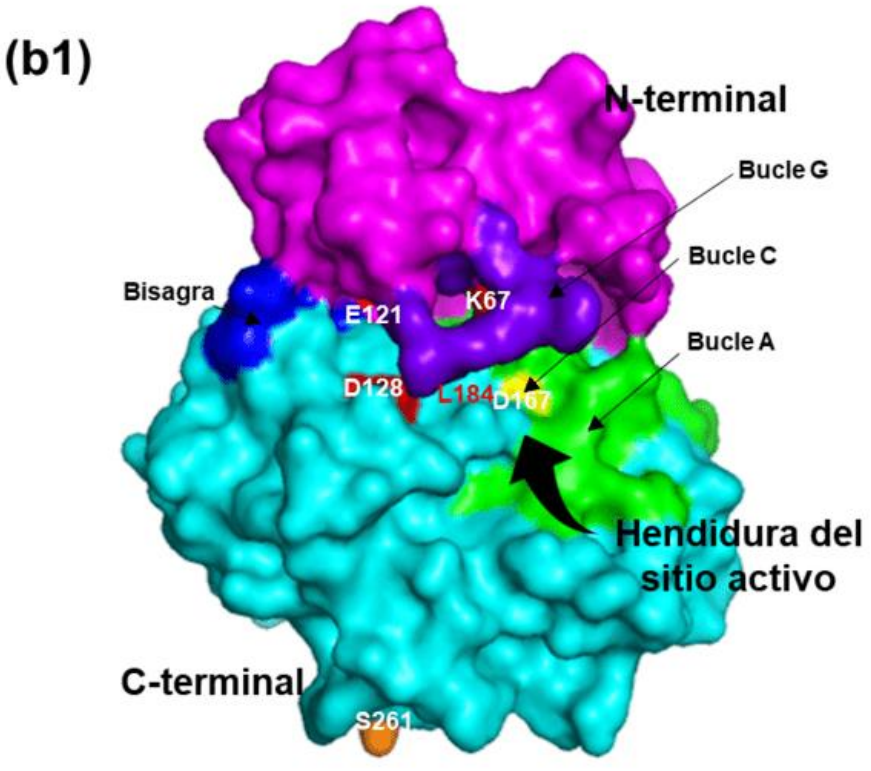
La estructura bilobulada de PIM-1, se encuentra unida por una región bisagra, presenta sitios de unión de ATP (K67, E121 y D128). La actividad de PIM-1 no depende de la fosforilación, ya que su estructura cristalina muestra actividad constitutiva debido a la configuración única de su región catalítica.

El sitio de unión de ATP en la región bisagra, está rodeado por bucles específicos que desempeñan un papel crucial en la catálisis de ATP y la transferencia de fosfato a los residuos de sustrato (Figura 2). Estos bucles incluyen el bucle de activación A (D186-P210), el bucle catalítico C (D167), formando el sitio catalítico, el cual se muestra como una hendidura en el sitio activo, y cubierto por el bucle G, rico en glicina (G45, S46, G47, G48, F49, G50, S51 y V52). La configuración única y la interacción precisa de estos elementos estructurales son esenciales para la actividad biológica de la enzima PIM-1 (Figura 2).



Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis





Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

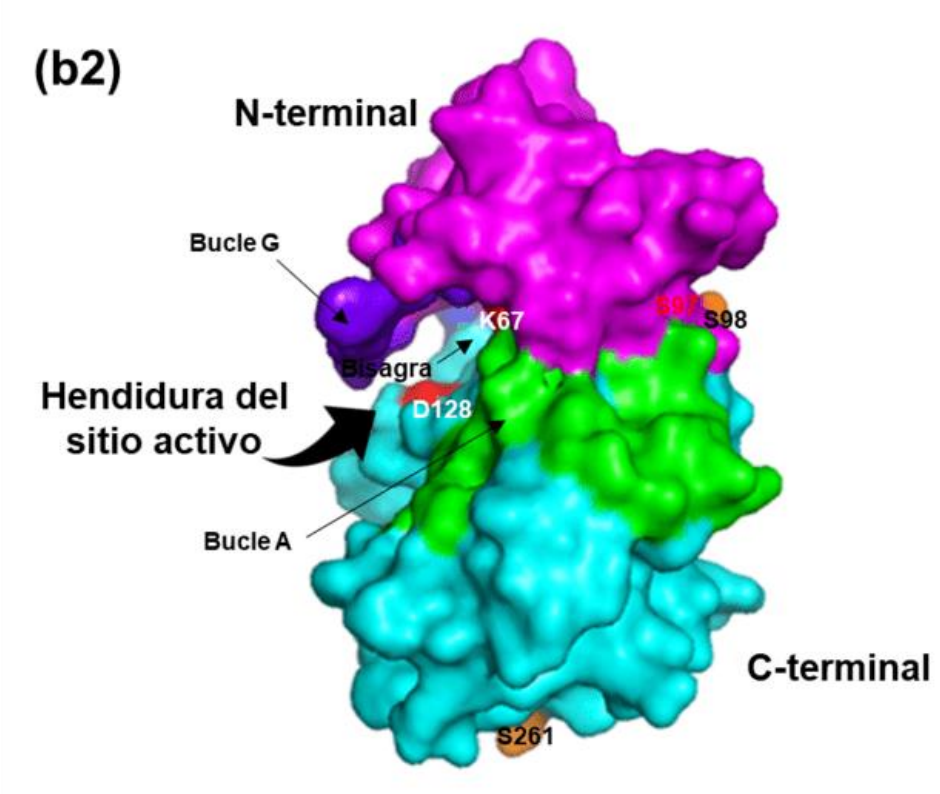


Figura 2. Caracterización de la estructura terciaria de la quinasa PIM-1.

(a) Visualización de los residuos funcionales de la quinasa PIM-1. (b) Visualización de la estructura terciaria de PIM-1. La estructura de la proteína PIM-1 se presenta con colores que representan distintos elementos estructurales: el dominio N-terminal se muestra en magenta, el C-terminal en cyan, la región de bisagra en azul, el bucle A en verde, el bucle C en amarillo y el bucle G en morado. Además, los residuos que se unen al ATP (K67, E121 y D128) aparecen en rojo, el residuo que acepta protones (D167) en amarillo y los residuos para la autofosforilación (S8, T23, S98 y S261) en naranja. Además, se resaltan en texto color rojo los residuos S97 y L184, los cuales son las posiciones donde ocurren las sustituciones que generan las mutaciones PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N}.

Las mutaciones PIM-1L184V y PIM-1S97N podrían tener repercusiones significativas en su dinámica molecular y, por ende, en la progresión del cáncer asociado a la quinasa PIM-1. La sustitución de la valina por leucina en la posición 184 (L184V) puede alterar la estructura del bucle de activación cercano, D186, comprometiendo la interacción con sustratos específicos y la regulación de la actividad enzimática. Por otro lado, la mutación S97N puede afectar el punto de autofosforilación en el residuo S98, crítico para la regulación de la actividad biológica de la PIM-1. Además, estas mutaciones podrían influir en la

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

estabilización del ATP, debido a cambios en el residuo K67 cercano, así como en la orientación de sustratos y iones metálicos por parte del residuo D167 en el bucle catalítico. Esto sugiere que estas mutaciones podrían tener un impacto considerable en la función y la regulación de la enzima PIM-1, lo que potencialmente contribuiría al desarrollo y la progresión del linfoma.

La tabla 1 proporciona un desglose detallado de las funciones y estructuras de los aminoácidos que participan en las actividades clave de la quinasa PIM-1. Este análisis incluye una descripción de los contextos funcionales en los que estos aminoácidos ejercen su influencia.

Tabla 2. Función de aminoácidos importantes de la PIM-1.

AMINOÁCIDO	FUNCIÓN	ESTRUCTURA
D167	Residuo que participan en la coordinación de iones metálicos y en la orientación de los sustratos y ATP durante la reacción de fosforilación. Contribuye a la especificidad de sustrato y a la eficiencia catalítica de la quinasa.	Bucle catalítico
D186, F187, G188, S189, G190, 191, L192, L193, K194, D195, T196, V197, Y198, T199, D200, F201, D202, G203, T204, R205, V206, Y207, S208, P209, P210	Residuos críticos para la interacción con sustratos específicos y para la modulación de la actividad enzimática de la PIM-1.	Bucle de activación
G45, S46, G47, G48, F49, G50, S51, V52	Residuos importantes para la flexibilidad estructural de la PIM-1 y para su capacidad de adaptarse a diferentes sustratos y condiciones celulares.	Bucle rico en glicina
S98, S261	Puntos de autofosforilación responsables de regular su actividad biológica	Bucle rico en glicina
S8, T23	Puntos de autofosforilación responsables de regular su actividad biológica	
K67, E121	Implicados en la unión y la estabilización del nucleótido de ATP, esencial para la actividad catalítica de la quinasa.	N-terminal
D128		C-terminal

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

6.3. Perfiles de flexibilidad entre estructuras terciarias homólogas de PIM-1 y su relación con el Linfoma

Usando el ID de PDB de una isoforma de la PIM-1 (1XQZ) en la pestaña BÚSQUEDA, se identificaron 1,184 estructuras similares a nivel de secuencia. Posteriormente, se eliminaron las estructuras redundantes y aquellas que carecían de ciertos residuos de aminoácidos. Finalmente, se seleccionaron 49 isoformas principales más relacionadas para su análisis de componentes principales (PCA) entre sus estructuras terciarias, lo que permitió evaluar las relaciones entre sus estructuras y así comprender mejor su variabilidad conformacional. El primer componente principal (PC1) capturó el 38.04% de la variabilidad total de las fluctuaciones estructurales, mientras que el segundo componente principal (PC2) contribuyó con el 15.67%, sumando un total de 53.71% de variabilidad entre ambos componentes (Figura 3a).

En la representación PCA de los dos primeros componentes principales, se pueden distinguir dos grupos de 24 estructuras terciarias en rojo y 25 en negro, que representan las distintas isoformas homólogas de la proteína PIM-1 (Figura 3a). Los grupos de isoformas de PIM-1 se clasificaron en dos categorías principales: estructuras abiertas y cerradas. Los criterios para separar estos grupos se basaron en la alineación de secuencias utilizando el algoritmo MUSCLE, que permitió identificar diferencias clave en las conformaciones de las estructuras. Para comparar varias isoformas, se utilizaron métodos de superposición estructural utilizando el ajuste de mínimos cuadrados de las coordenadas cartesianas de los átomos C-α en el dominio C-terminal. También se utilizó PCA, evaluando los vínculos de los conjuntos de confórmeros y las estructuras superpuestas, facilitando la clasificación basada en sus

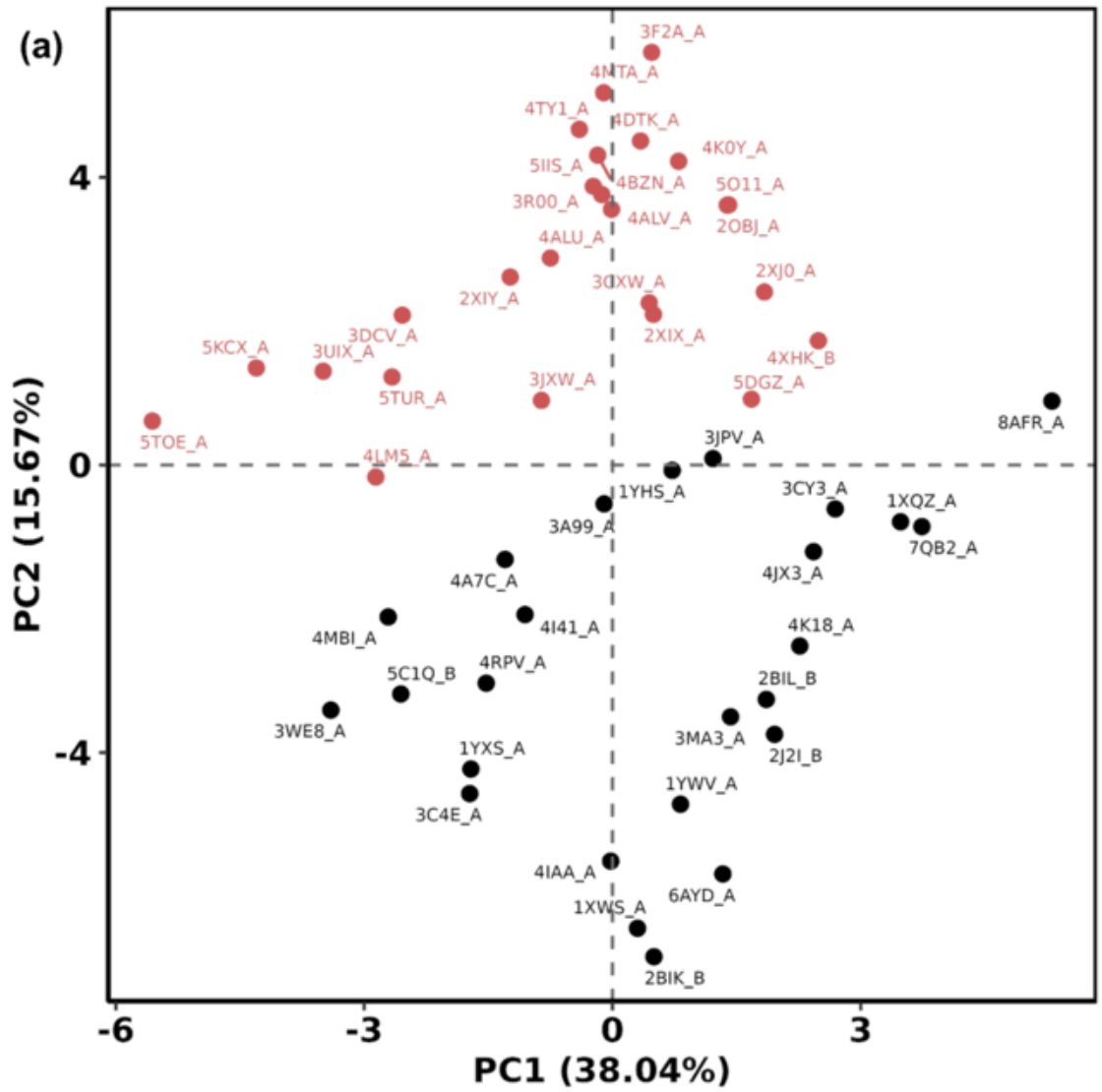
Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

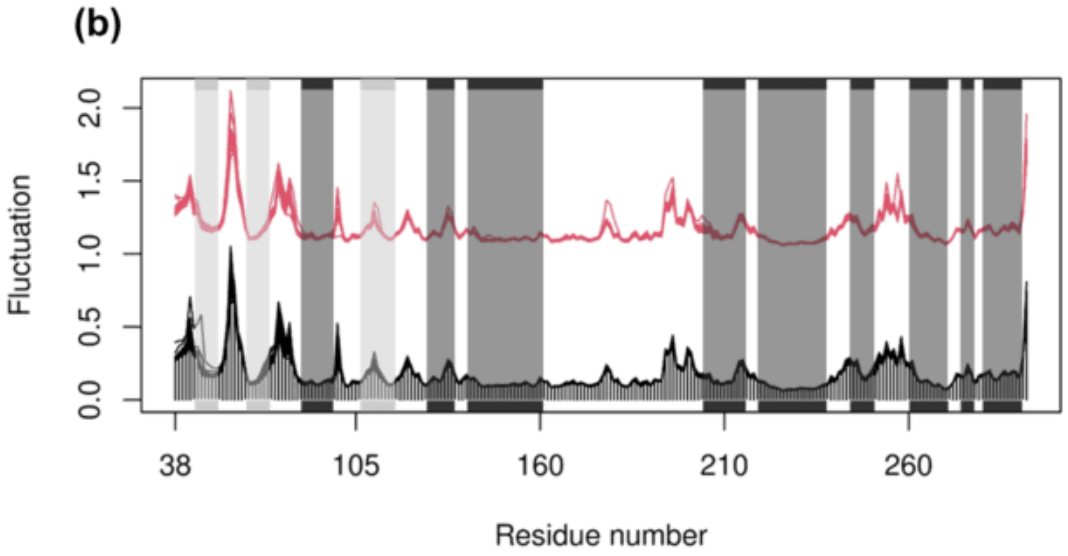
características conformacionales. Estos métodos permitieron identificar patrones de apertura o cierre en las estructuras, diferenciando los grupos de isoformas de PIM-1 según su grado de flexibilidad y exposición del sitio activo o regiones clave para la función enzimática.

Dado que las proteínas tienen función estrechamente ligada a su estructura y dinámica, es esencial comprender la flexibilidad intrínseca de las diferentes isoformas de PIM-1. Para evaluar esta flexibilidad, se utilizó un análisis de modo normal (NMA) y dinámica molecular (MD). El NMA reveló fluctuaciones de consenso entre las estructuras homólogas de PIM-1, resaltando un patrón conservado (Figura 3b-c).

Los análisis revelaron que las estructuras homólogas de PIM-1 muestran una mayor fluctuación en el dominio N-terminal, especialmente entre los residuos 37 y 122, con un pico notable en el bucle G (residuos G45 a V52). Por el contrario, el dominio C-terminal mostró una estabilidad relativa, con picos menores en el bucle A (residuos D186 a P210) y cerca del residuo 260, donde se encuentran puntos de autofosforilación (S8, T23, S98 y S261). El bucle catalítico (D167) y los sitios de unión a ATP (K67, E121 y D128) se mantuvieron relativamente estables (Figura 3b). Se observaron picos de fluctuación significativos (>0.8 Å) cerca de los residuos 50, en el dominio N-terminal, y 305, al final del dominio C-terminal (Figura 3c)

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis





Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

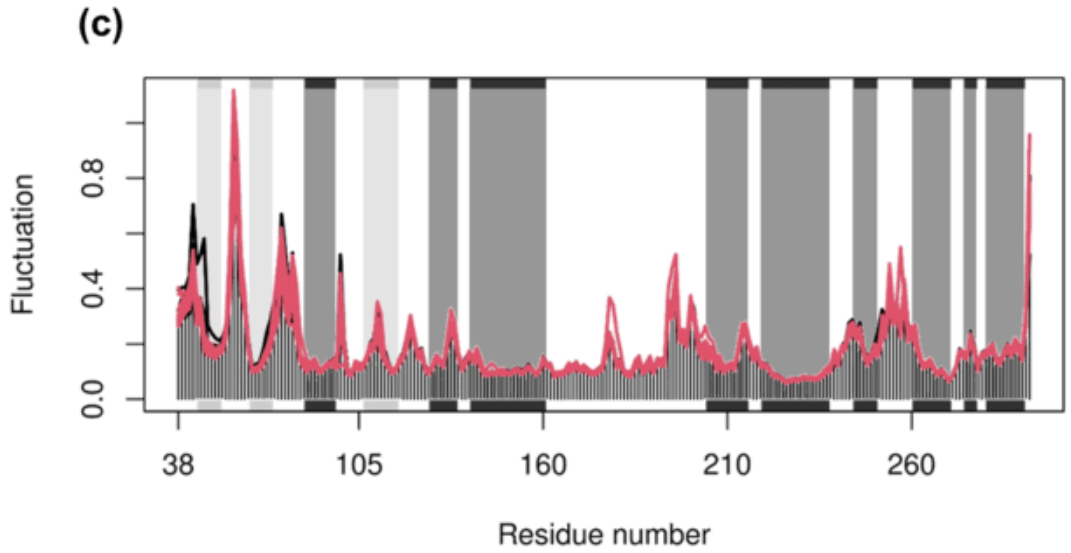


Figura 3. Evaluación de estabilidad y flexibilidad entre estructuras terciarias homólogas de la quinasa PIM-1.

(a) Análisis de componentes principales (PCA). Se ilustra la relación entre las 49 isoformas principales seleccionadas en función de sus principales regiones variables. Cada punto o estructura se coloreó según los resultados de agrupación derivados del PCA. PC1 captura el 38.04% de variabilidad, mientras que PC2 contribuye con el 15.67%. **(b-c)** Análisis de modo normal, fluctuaciones de consenso entre estructuras terciarias homólogas. Las hélices están en negro y las hebras en gris.

6.4. Disimilitud de la flexibilidad intrínseca de la proteína wildtype PIM-1 y los mutantes PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N}

La estructura y dinámica está determinada por la función de las proteinas, y las mutaciones pueden modificar estas propiedades. Por consiguiente, comprender la flexibilidad estructural inherente es fundamental. Se realizo análisis de dinámica molecular durante 100 nanosegundos (ns) para evaluar los cambios conformacionales. A lo largo de las simulaciones, se analizó la estabilidad estructural de la proteína utilizando la desviación cuadrática media (RMSD).

Los resultados de RMSD revelaron que la quinasa PIM-1 presentaba un valor medio ligeramente mayor, 0.108 ± 0.0534, lo que indica una menor estabilidad en comparación con sus mutantes, PIM-1L184V (0.102 ± 0.0519) y PIM-1S97N (0.105 ± 0.0537), a lo largo de la trayectoria (Figura 4a). La quinasa nativa PIM-

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

1 mostró una tendencia ligeramente mayor a la variabilidad estructural a lo largo de la trayectoria en comparación con sus variantes mutantes. Además, se observaron diferencias en la fluctuación de residuos específicos, especialmente en regiones cercanas a los extremos N-terminal y C-terminal, lo que sugiere que las mutaciones podrían afectar la dinámica localizada en estas áreas de la proteína.

Por otro lado, los resultados de la fluctuación cuadrática media (RMSF) indican diferencias en la rigidez y flexibilidad de la proteína PIM-1 y sus mutaciones, PIM-1L184V y PIM-1S97N. Consideramos una fluctuación significativa si el valor RMSF superaba los 0.3 nanómetros (nm).

La quinasa PIM-1 exhibió mayores fluctuaciones en el dominio N-terminal. Además, se observó una mayor flexibilidad (> 0.3 nm) en los residuos del bucle rico en glicina, 46S y 47G, así como en los residuos cercanos a los dominios N-terminal y C-terminal, 36S y 308S respectivamente (Figura 4b). En contraste, el bucle de activación y catalítico mostraron estabilidad (< 0.3 nm) (Figura 4b). Respecto a las mutaciones, la PIM-1L184V presentó mayores fluctuaciones en el dominio N-terminal y en el bucle rico en glicina, evidenciando mayor flexibilidad en los residuos 46S y 47G del bucle rico en glicina, así como en el residuo 308S próximo al dominio C-terminal. Del mismo modo, la PIM-1S97N exhibió su mayor fluctuación en el dominio N-terminal y en el bucle rico en glicina, con mayor flexibilidad en los residuos 47G, 48G y 49F del bucle rico en glicina, y en el residuo 308S próximo al dominio C-terminal (Figura 4b).

Se identificaron puntos de mayor fluctuación donde la RMSF entre la quinasa PIM-1 y sus mutantes fue más pronunciada que en otras regiones. Al comparar las fluctuaciones entre la PIM-1 y su mutante PIM-1L184V, se observó una

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

diferencia de 0.219 nm en el residuo 36, y diferencias mayores de 0.050 en los residuos 41, 42 y 55 del dominio N-terminal, así como en los residuos 137, 138, 275 y 291 del dominio C-terminal. Por otro lado, la discrepancia en las fluctuaciones entre la PIM-1 y su mutante PIM-1S97N fue más notoria en los residuos 36 y 49, con valores de 0.240 y 0.133 respectivamente. Además, los residuos 48 (bucle G), 188 y 204 (bucle A), 137, 138 y 169 (C-terminal) y 42 (N-terminal) exhibieron una diferencia de más de 0.050 (Figura 4b).

Los hallazgos sugieren que las mutaciones PIM-1L184V y PIM-1S97N pueden influir en la estabilidad conformacional de la quinasa PIM-1.

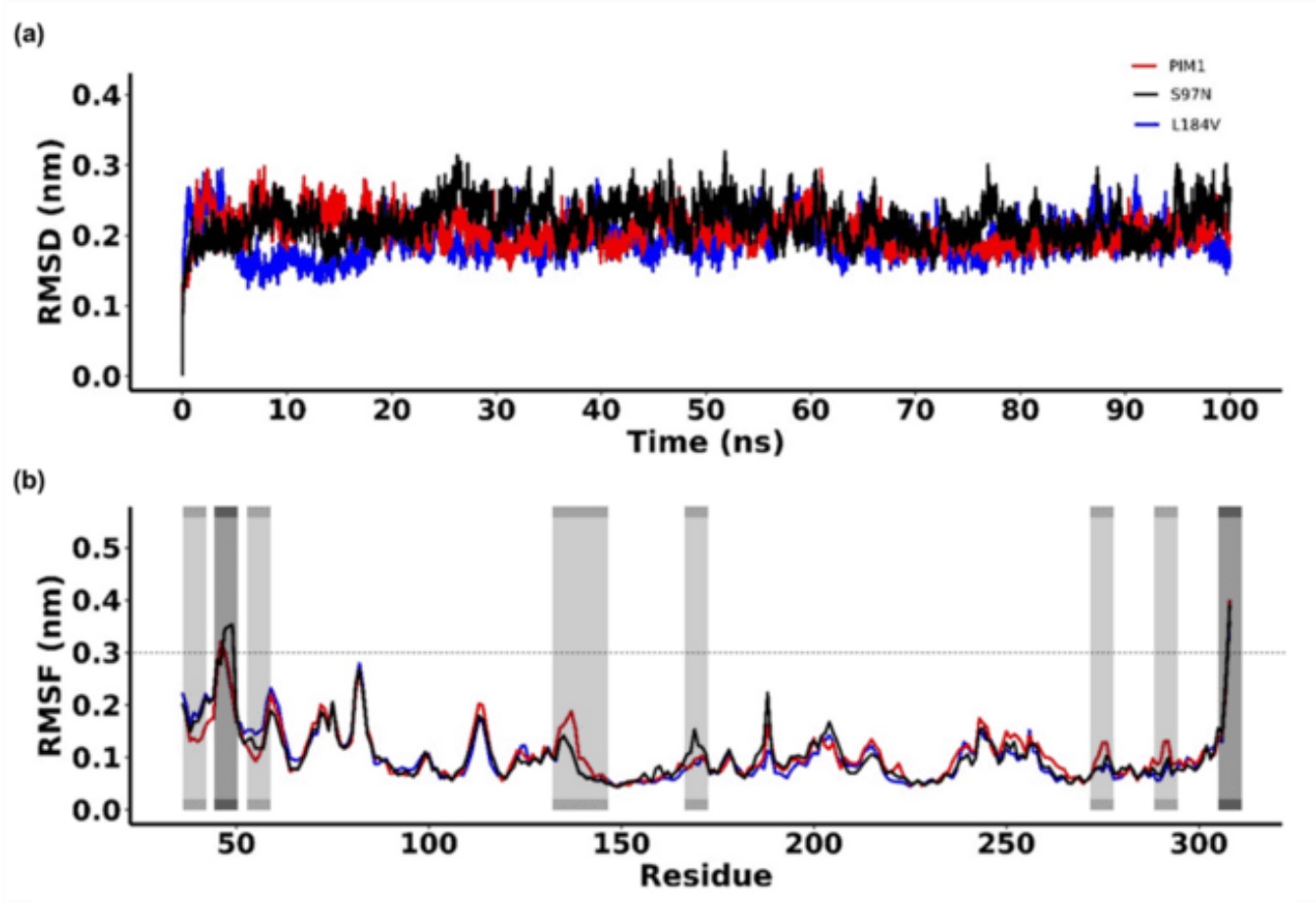


Figura 4. Perfiles RMSD y RMSF de PIM-1 y sus mutantes, PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N}.
(a) RMSD de 100 ns de PIM-1 y sus mutantes; (b) RMSF de los residuos de 3 proteínas. Se utilizó el RMSD para medir las desviaciones de la columna vertebral de la proteína desde su conformación estructural original hasta su conformación estructural final. Se utilizaron átomos de C-alfa para calcular RMSF. PIM-1 (rojo), PIM-1^{L184V} (azul) y PIM-1^{S97N} (negro). Las áreas de color gris claro indican regiones donde hay una diferencia de RMSF mayor de 0.050 entre la PIM-1 y sus mutaciones, mientras que las áreas de color gris oscuro señalan puntos de mayor flexibilidad, con valores superiores a 0.3 nm.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

La tabla 3 proporciona un desglose detallado la RMSD y la RMSF de los residuos que exhiben mayor rigidez y flexibilidad en la quinasa PIM-1 y sus mutantes.

Tabla 3. Promedio y desviación estándar de RMSD. Regiones seleccionadas por residuos con RMSF media más alta (0.3 nm).

Proteína	RMSD	Región ≥ 0.3 de RMSF	Secuencia	Estructura
L184V	0.102 ± 0.0519	46-47, 308	SG, S	Bucle rico en glicina, Residuo cercano a dominio C-terminal
S97N	0.105 ± 0.0537	47-49, 308	GGF, S	Bucle rico en glicina, Residuo cercano a dominio C-terminal
PIM-1	0.108 ± 0.0534	36, 46-47, 308	S, SG, S	Residuo cercano a dominio N-terminal, Bucle rico en glicina, Residuo cercano a dominio C-terminal

6.5. Desplazamiento colectivo de la proteína wildtype PIM-1 con las mutantes PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N}

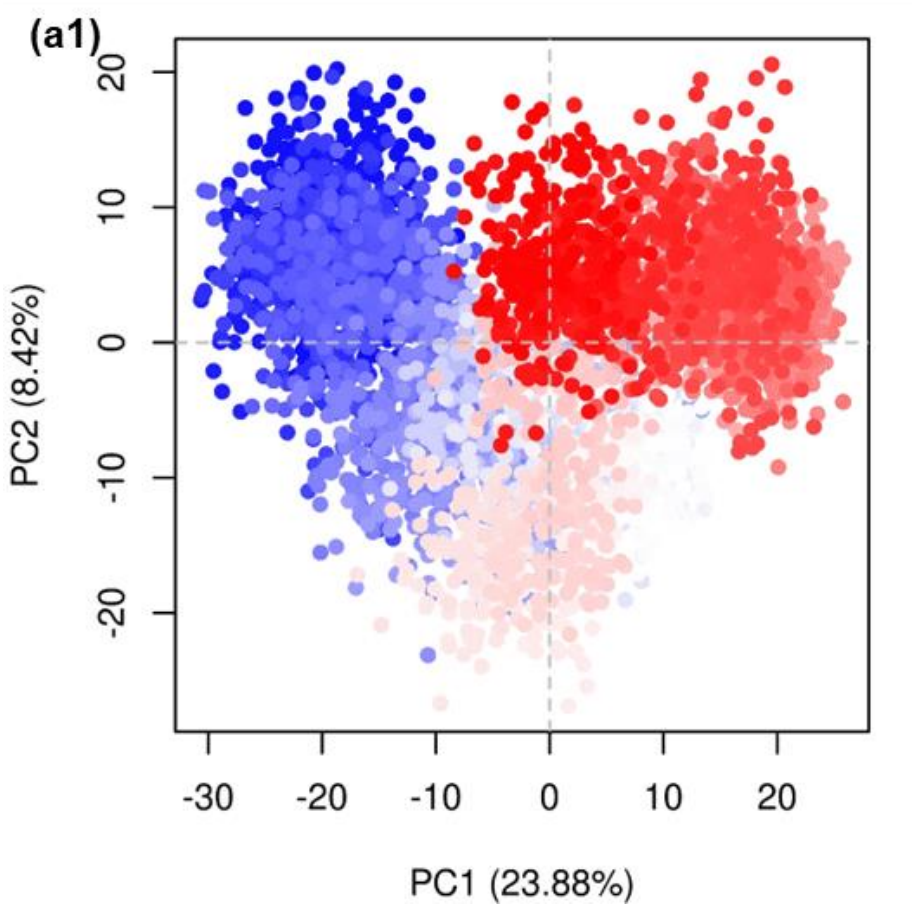
Se identificaron estados conformacionales sobre la quinasa PIM-1 y sus mutantes (PIM-1L184V y PIM-1S97N) mediante un análisis de componentes principales (PCA), que resultó ser una herramienta útil para este propósito. Se evaluaron los dos primeros componentes principales (PC 1 y 2) para esta investigación.

Las distribuciones conformacionales de las proteínas presentan variaciones, como se ilustra en la Figura 5, donde se destacan las transiciones periódicas entre conformaciones estructurales mediante puntos de color continuo que van desde el azul hasta el blanco y el rojo. Además, se observaron variaciones en las PC 1 y 2 de las trayectorias de dinámica molecular de los tres sistemas, lo que indica algunas diferencias en PIM-1 y en la movilidad y estabilidad de sus mutantes (Figura 5 a-c).

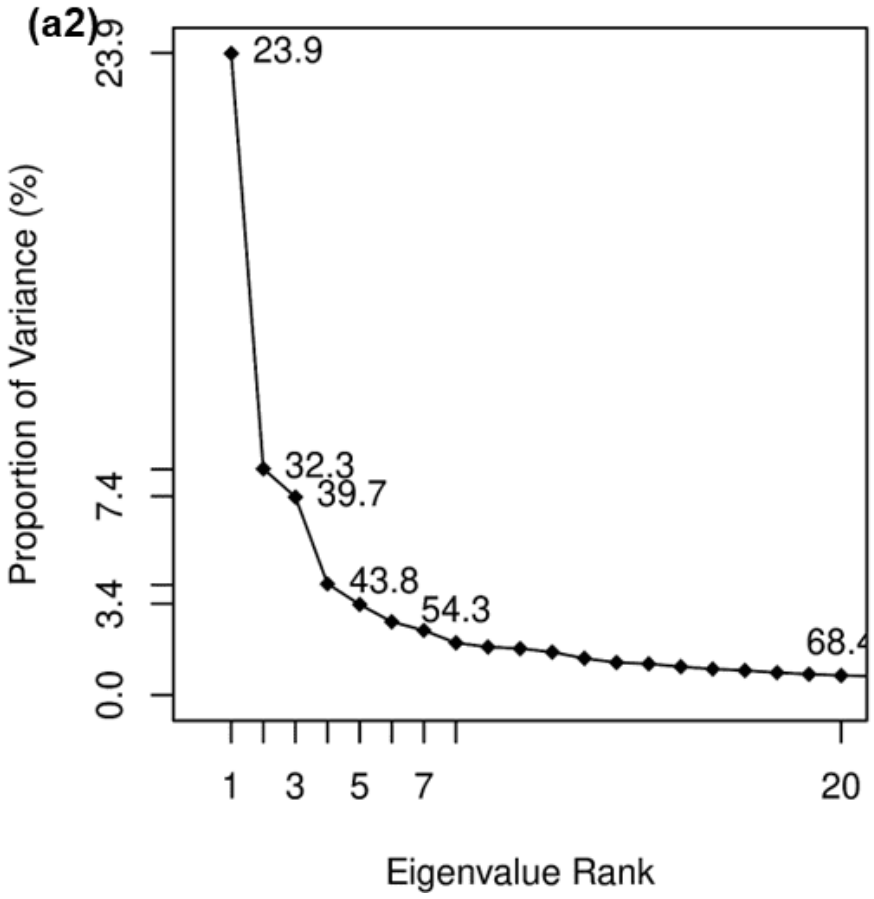
Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

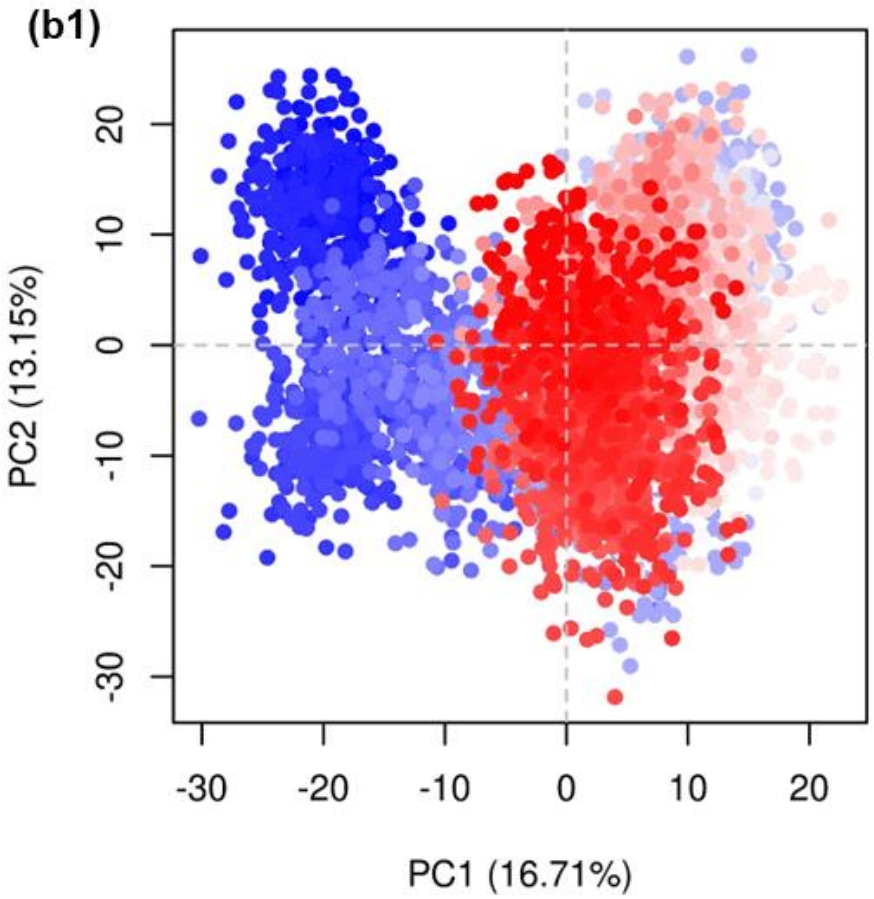
En los dos primeros componentes, se encontró que el sistema PIM-1S97N mostró el mayor porcentaje de movimiento correlacionado (37,19%; Figura 5c), seguido por PIM-1 (32,30%; Figura 5A) y PIM-1L184V (29,56%; Figura 5B).

Por otro lado, la distribución de puntos del sistema PIM-1S97N en las PC 1 y 2 mostró saltos periódicos termodinámicamente diferentes (Figura 5c), lo que sugiere una alta estabilidad de las proteínas en este sistema. En contraste, las estructuras de PIM-1 y PIM-1L184V exhibieron una distribución más uniforme y se superpusieron en un subespacio de PC sin barreras de energía discernibles, lo que indica un estado más disperso (Figura 5a, 5b).

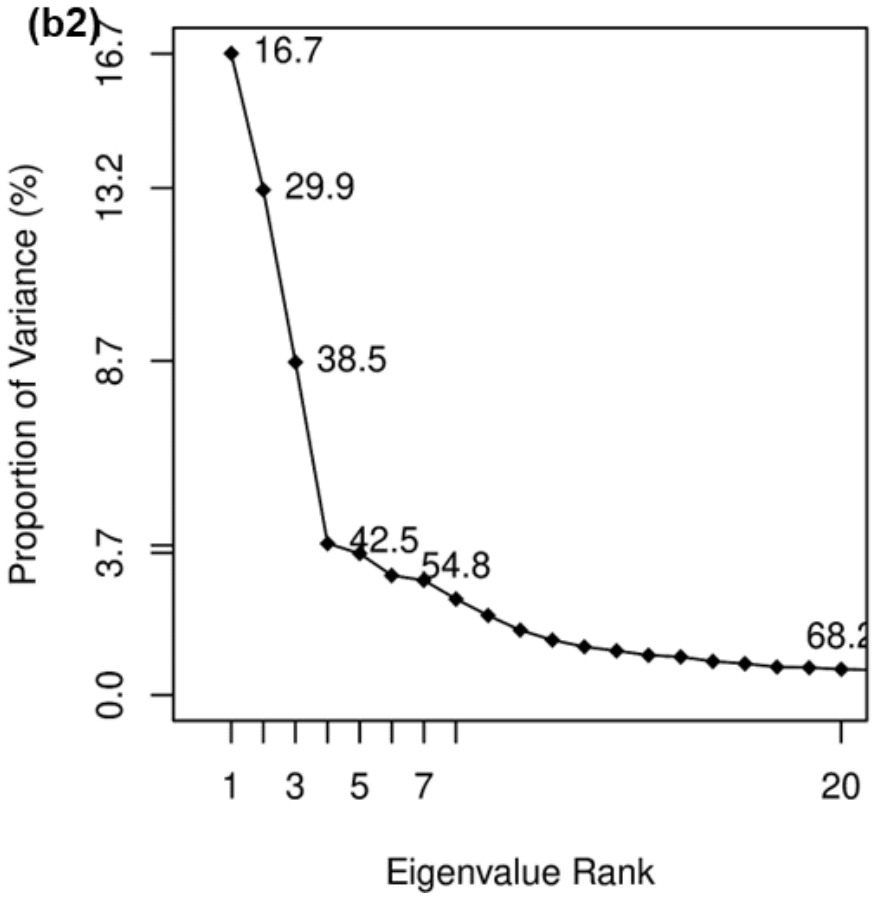


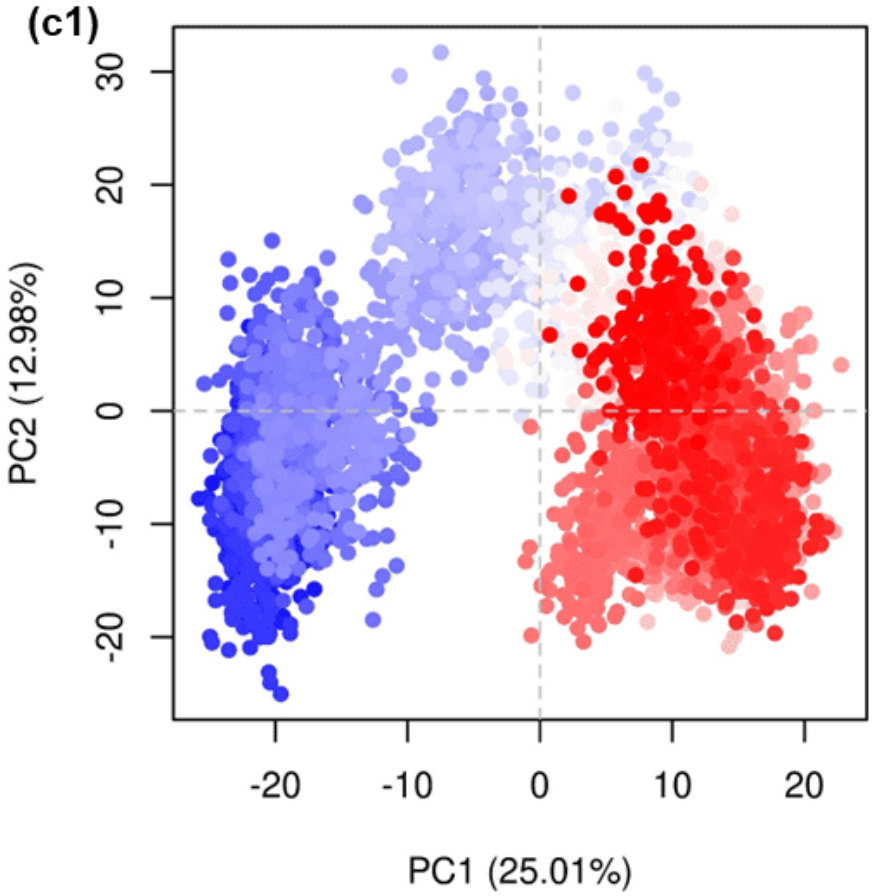
Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis





Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis





Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

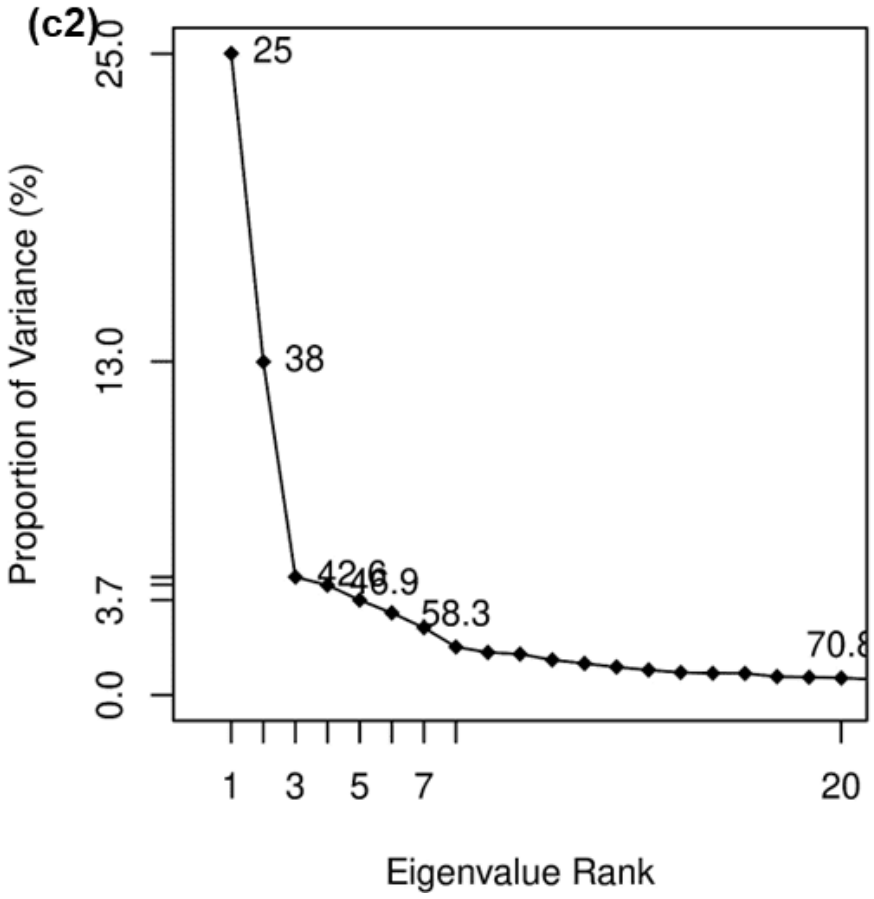


Figura 5. Análisis de componentes principales de la PIM-1 y sus mutantes.

(a) PC1 y PC2 para PIM-1. (b) PC1 y PC2 para PIM-1^{L184V}. (c) PC1 y PC2 para PIM-1^{S97N}.

6.6. Desplazamiento entre la correlación cruzada de los segmentos proteicos de la proteína wildtype PIM-1 con las mutantes PIM-1^{L184V} y PIM-1^{S97N}

Se llevó a cabo un Mapa Dinámico de Correlación Cruzada (DCCM) para explorar los desplazamientos de correlación entre las mutantes, PIM-1L184V y PIM-1S97N con los segmentos proteicos de la quinasa PIM-1. Los resultados revelaron patrones de correlación similares entre la proteína wildtype PIM-1 y sus mutantes (Figura 6). Esta observación sugiere la presencia de un mecanismo conservado en la dinámica conformacional entre la quinasa y sus variantes mutantes. Sin embargo, se destacó un movimiento correlacionado entre los residuos 186-261, que abarcan desde el bucle de activación (D186 a P210) hasta

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

el punto de autofosforilación S261, localizado en el dominio C-terminal. Este movimiento correlacionado se asoció con las estructuras comprendidas entre los residuos 37-185 en el dominio N-terminal. Este último segmento incluye características significativas como el bucle rico en glicina (G45 a V52), los sitios de unión de ATP (K67, E121 y D128), el punto de autofosforilación S98 y el bucle catalítico D167. Estas correlaciones en los movimientos entre regiones distantes de la proteína sugieren una interacción dinámica entre el dominio N-terminal y el dominio C-terminal, lo que podría ser relevante para su función biológica. Esta correlación es de particular importancia, ya que establece una conexión entre dos regiones críticas de la proteína PIM-1: el bucle rico en glicina, identificado como la región de mayor flexibilidad, y la región de la bisagra, así como, el bucle de activación y catalítico. Estas regiones son fundamentales tanto en la estructura como en la función de la proteína, desempeñando la regulación sobre la actividad enzimática y especificidad de sustrato en quinasa PIM-1. La correlación observada sugiere una interacción dinámica entre estas áreas distantes de la proteína, lo que podría ser esencial para coordinar y regular adecuadamente su función biológica.

Los diagramas DCCM para la proteína PIM-1 muestran que los residuos 223-261 se mueven en la misma dirección (correlación positiva, >0) que los residuos 100-152, que incluyen los puntos de unión de ATP (E121 y D128) y la región de la bisagra (123 a 125). Específicamente, se observan movimientos altamente correlacionados (>0.5) entre los residuos 106-122 en el extremo N-terminal cercano a la bisagra y los residuos 233-248 en el dominio C-terminal (Figura 6a). Por otro lado, los residuos del bucle de activación (D186-P210) muestran un movimiento en dirección contraria (correlación negativa <0), especialmente entre

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

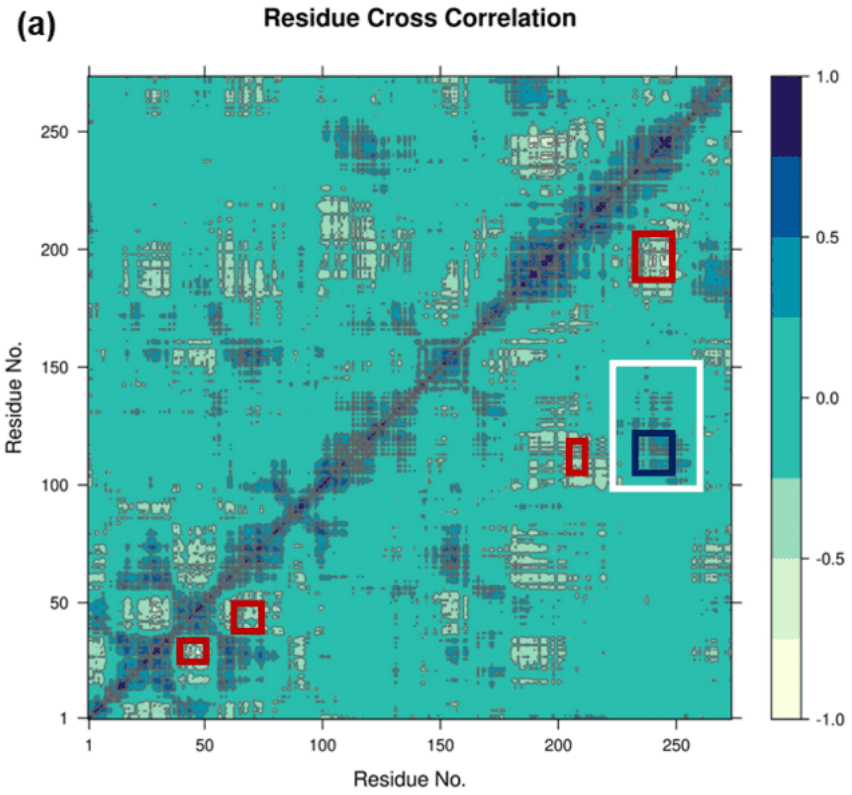
los residuos 188-207 del bucle de activación y los residuos 233-248 en el dominio C-terminal. También se observan movimientos altamente anti-correlacionados (<-0.5) entre los residuos 106-119 en el extremo N-terminal, cerca de la bisagra, y los residuos 205-211 en el dominio C-terminal, que incluye residuos del bucle de activación. Además, se observan correlaciones altamente negativas entre los residuos 39-50 del bucle rico en glicina y los residuos 62-73 en el extremo del dominio N-terminal, así como entre los residuos 26-34 en el dominio N-terminal y los residuos 39-50 del bucle rico en glicina.

Al comparar la PIM-1 con su mutante PIM-1L184V (Figura 6b), se observó la ausencia de regiones de alta correlación negativa entre los residuos 39-50 y 62-73, así como entre los residuos 26-34 y 39-50. Aunque la mutante PIM-1L184V aún exhibía un movimiento opuesto en esta región, la correlación negativa no fue tan pronunciada como en la quinasa PIM-1. Por otro lado, se observó una correlación negativa mucho más fuerte entre los residuos 188-207 y 233-248 en la mutante. Esta disminución en la correlación negativa en la mutante PIM-1L184V podría indicar una alteración en la dinámica de la proteína en esa región específica, posiblemente debido a la mutación. Respecto al mutante PIM-1S97N (Figura 6c), se encontró que las regiones descritas aún mostraban un movimiento similar, pero ninguna de ellas presentaba una correlación significativa, ni positiva (>0.5) ni negativa (<0.5). La falta de correlación significativa en el mutante PIM-1S97N podría sugerir cambios más drásticos en la dinámica de la proteína en comparación con la quinasa PIM-1 wildtype, lo que podría tener implicaciones funcionales importantes.

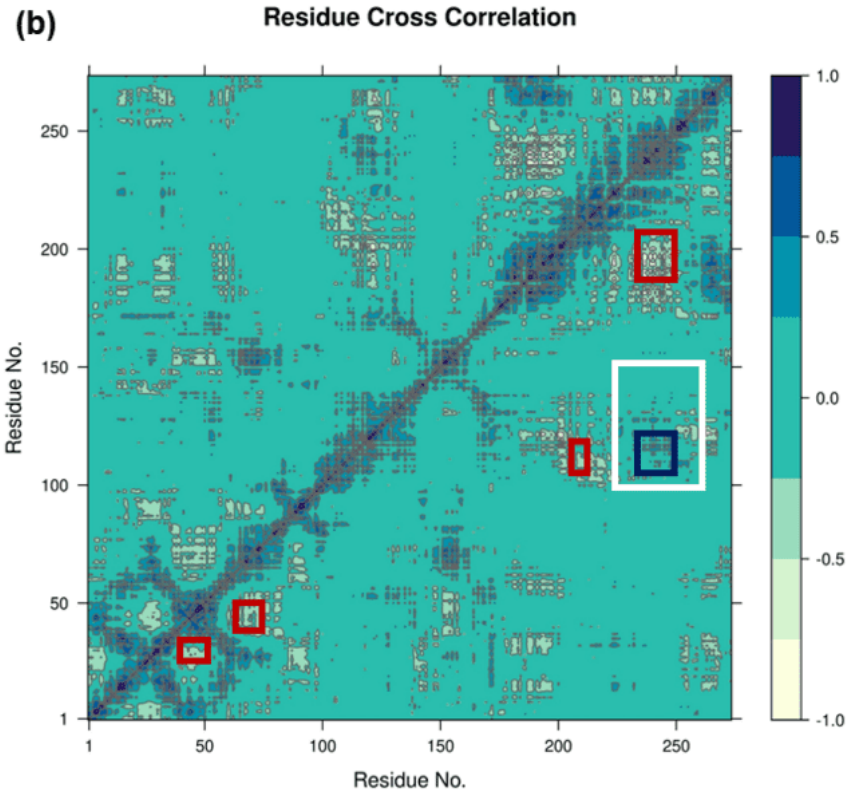
Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

PIM1



L184V



Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

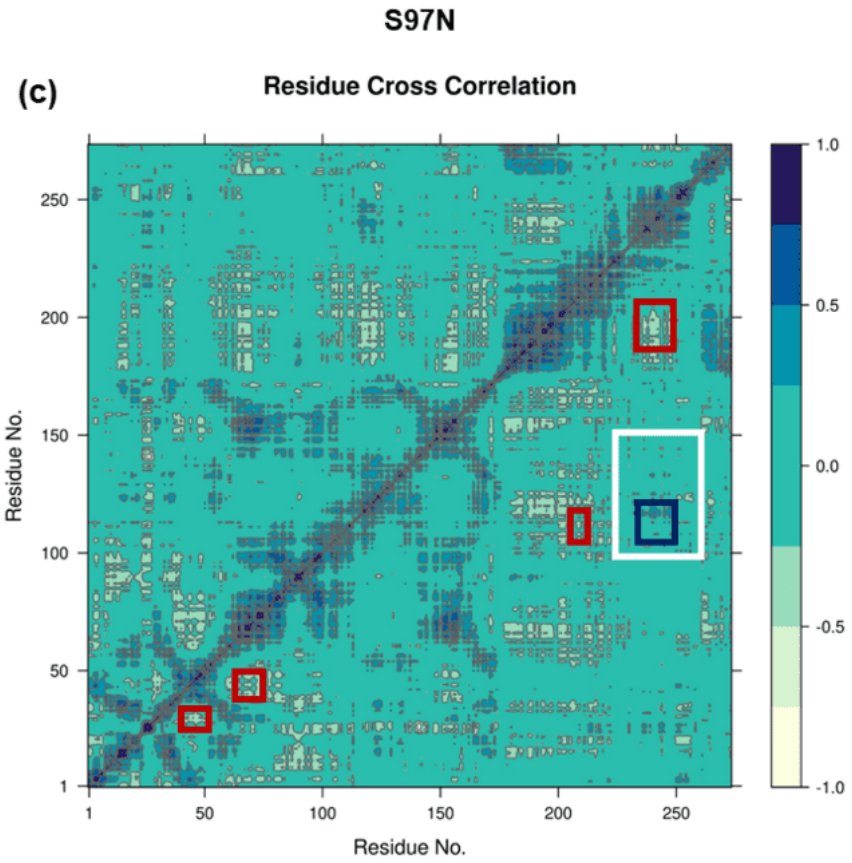


Figura 6. Análisis de correlación cruzada (DCCM).

(a) PIM-1. **(b)** PIM-1^{L184V}. **(c)** PIM-1^{S97N}**.** El valor de los movimientos correlacionados y anti correlacionados se muestran en base al color. Los colores amarillo y verde pastel indican movimientos anti correlaciones y el azul marino indica movimientos correlacionados. El área encerrada en líneas blancas representa movimiento correlacionados, las áreas en líneas azules representan movimientos altamente correlacionados y las áreas en líneas rojas representan movimientos altamente anti correlacionados.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

VII. DISCUSIONES

El análisis de las mutaciones PIM-1L184V y PIM-1S97N en la dinámica molecular de la enzima PIM-1 asociada al cáncer linfoma indica que, a pesar de las alteraciones en regiones clave de la proteína, como las regiones N-terminal y C-terminal, las funciones fundamentales de la enzima, incluyendo los puntos de unión de ATP, el sitio activo aceptor de protones y los puntos de autofosforilación, se mantienen conservadas. Esto sugiere que la capacidad catalítica y la regulación biológica de la proteína PIM-1 podrían no verse sustancialmente afectadas por estas mutaciones, aunque se necesita más investigación para determinar su impacto específico en la progresión del linfoma. El estudio de Wang (43) muestra una relación positiva entre la quinasa PIM1 y la mutación MYD88 en el linfoma difuso de células B grandes, destacando la importancia de esta mutación en la enfermedad y su posible influencia en la supervivencia y proliferación celular. Además, la expresión de toda la familia de quinasas PIM en tejidos de linfoma difuso de células B grandes apunta a un papel potencialmente importante de estas quinasas en la patogénesis de la enfermedad. La investigación de Casillas (44) resalta la relevancia de la sobreexpresión de PIM-1 en el crecimiento de células cancerosas y la resistencia a tratamientos, subrayando su papel crucial en el desarrollo de varios tipos de cáncer, incluidos linfoma, leucemia, y cáncer de próstata y mama. El análisis de Rathi (45) resalta la conservación evolutiva de sitios clave en PIM-1, como los sitios de unión de ATP y el sitio activo aceptor de protones, fundamentales para su función catalítica. También se observa la conservación de sitios de autofosforilación, que regulan la actividad biológica de PIM-1. La falta de enlaces disulfuro en la estructura terciaria sugiere la existencia de otras funciones

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

estructurales o funcionales de la enzima. La estructura bilobulada de la proteína PIM-1, unida por una región bisagra, presenta sitios de unión de ATP clave en las posiciones K67, E121 y D128. Esta configuración única y la actividad constitutiva de PIM-1, incluso sin fosforilación, destacan la importancia de su región catalítica en la función de la enzima. Los bucles específicos que rodean el sitio de unión de ATP, como el bucle de activación A y el bucle catalítico C, son esenciales para la catálisis de ATP y la transferencia de fosfato a los residuos de sustrato, lo que afecta la actividad biológica de PIM-1. Las mutaciones PIM-1L184V y PIM-1S97N pueden tener un impacto significativo en la dinámica molecular de la enzima y, por lo tanto, en la progresión del cáncer asociado a PIM-1. La mutación L184V podría alterar la estructura del bucle de activación cercano a D186, comprometiendo la interacción con sustratos específicos y la regulación de la actividad enzimática. La mutación S97N podría afectar el punto de autofosforilación en el residuo S98, importante para la regulación de la actividad biológica de PIM-1. Además, estas mutaciones podrían influir en la estabilización del ATP y la orientación de sustratos y iones metálicos por parte del residuo D167 en el bucle catalítico, lo que sugiere que podrían tener un impacto considerable en la función y regulación de la enzima, contribuyendo al desarrollo y la progresión del linfoma. Rathi (45) también analizó la estructura de la quinasa PIM-1, destacando su bolsillo de unión de ATP en la región bisagra, con aminoácidos específicos que sirven como objetivos para inhibidores miméticos de ATP. Su análisis también reveló la afinidad de PIM-1 por diferentes inhibidores, que pueden unirse al bolsillo de unión de ATP a través de un modo de ajuste inducido. Diferentes inhibidores, como DHPCC-9, AZD1208, CX-4945, Ro-3306 y CX-6258, han sido identificados y muestran patrones de inhibición

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

competitiva con ATP en la quinasa PIM-1, estabilizándose mediante enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Estos hallazgos sugieren la necesidad de un mayor desarrollo y caracterización de inhibidores selectivos que se dirijan a los sitios de unión de péptidos en PIM-1 para tratar enfermedades relacionadas. Sus hallazgos coinciden en la importancia de la estructura de PIM-1, su actividad constitutiva sin fosforilación y el papel del sitio de unión de ATP y la función de la proteína. Por otro lado, Arrouchi (46) destaca que la región bisagra única de Pim-1, caracterizada por la ausencia de un donante de enlace de hidrógeno en la posición 123, es un objetivo clave para el avance de inhibidores de moléculas pequeñas. Esta región única permite una selectividad alterada hacia las moléculas pequeñas en comparación con otras quinasas de serina/treonina. Esto sugiere que las mutaciones en PIM-1 podrían influir en la eficacia y especificidad de los inhibidores desarrollados para atacar a la enzima. Los cambios en la estructura y función de la enzima, causados por las mutaciones, pueden tener implicaciones importantes en el diseño de tratamientos precisos para linfomas y leucemias humanos. El análisis de dinámica molecular de la quinasa PIM-1 y sus mutantes PIM-1L184V y PIM-1S97N durante 100 ns muestra que las variantes mutantes son más estables estructuralmente que la quinasa nativa, con valores de RMSD más bajos. Sin embargo, se observan mayores fluctuaciones en el dominio N-terminal y el bucle rico en glicina en todas las proteínas, especialmente en las mutantes, lo que indica una mayor flexibilidad en estas áreas. Además, las diferencias en fluctuaciones entre la quinasa PIM-1 y sus mutantes, especialmente en residuos clave de los dominios N-terminal y C-terminal, sugieren que estas mutaciones pueden influir en la dinámica estructural y funcional de la proteína, con posibles

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

implicaciones para la actividad enzimática y la progresión del cáncer asociado a PIM-1. Se realizó un estudio de las isoformas de la quinasa PIM-1 mediante PCA, que reveló dos grupos distintos de isoformas clasificadas como estructuras abiertas y cerradas, tras un proceso de selección y eliminación para reducir el conjunto de datos a 49 isoformas principales más relevantes. Además, se utilizó un NMA y MD para evaluar la flexibilidad intrínseca de estas isoformas. Se observó una mayor fluctuación en el dominio N-terminal en comparación con el dominio C-terminal, con picos notables en regiones específicas como el bucle G y cerca de los puntos de autofosforilación, mientras que el bucle catalítico y los sitios de unión a ATP mostraron una estabilidad relativa. Estos hallazgos resaltan la importancia de comprender la dinámica molecular de PIM-1 para entender su función en procesos biológicos y su relevancia con el cáncer. Para facilitar el avance de inhibidores de PIM1 específicos, en este estudio informamos tres estructuras cristalinas de inhibidores competitivos de ATP en el bolsillo de unión de ATP de PIM1. Dos de las estructuras informadas (CX-4945 y Ro-3306) explican el efecto fuera del objetivo sobre PIM1 de los inhibidores dedicados de la caseína quinasa 2 y la quinasa 1 dependiente de ciclina, respectivamente. A su vez, la estructura con CX-6258 demuestra un modo de unión de un potente inhibidor selectivo de las quinasas PIM1, PIM2, PIM3 y Flt-3. La diversidad en la estructura química de los inhibidores de la quinasa PIM1 es evidente, a pesar de que todos apuntan al bolsillo de unión de ATP, presentando desafíos y oportunidades para el desarrollo de fármacos. Según Bogusz(22), los candidatos a inhibidores se clasifican en tres clases principales según su modo de interacción con la quinasa, lo que puede influir en su especificidad, eficacia y perfiles de efectos secundarios. Además, la relación entre la conformación y la

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

actividad de los inhibidores, especialmente en regiones como el bucle G, destaca la importancia de las modificaciones estructurales para mejorar su afinidad y selectividad hacia PIM1. La posibilidad de optimizar inhibidores desarrollados para otras quinasas para que sean específicos de PIM1, sugiere que los resultados obtenido podrían guiar el diseño de nuevos compuestos con propiedades mejoradas, lo que abre perspectivas para el desarrollo de inhibidores más eficaces y con menos efectos secundarios. El DCCM de la quinasa PIM-1 y sus mutantes PIM-1L184V y PIM-1S97N muestra que existe un mecanismo conservado en la dinámica conformacional entre la proteína wildtype y sus mutantes. Se observan movimientos correlacionados entre el bucle de activación y el punto de autofosforilación S261, lo que indica una interacción dinámica entre los dominios N-terminal y C-terminal relevante para la función biológica de la proteína. Los mutantes PIM-1L184V y PIM-1S97N presentan diferencias notables en las correlaciones. Mientras que PIM-1L184V exhibe una correlación negativa más fuerte entre los residuos 188-207 y 233-248, PIM-1S97N muestra una falta de correlaciones significativas en las mismas regiones. Esto sugiere que ambas mutaciones afectan la dinámica de la proteína de diferentes maneras, lo que puede impactar en su función y actividad enzimática. Estos resultados son clave para comprender cómo las mutaciones pueden alterar las interacciones dinámicas y, por lo tanto, la función de la proteína PIM-1.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

VIII. CONCLUSIONES

El análisis de las mutaciones PIM-1L184V y PIM-1S97N en la dinámica molecular de la enzima PIM-1 asociada al cáncer linfoma sugiere que, aunque estas mutaciones generan alteraciones en regiones clave de la proteína, como las regiones N-terminal y C-terminal, las funciones fundamentales de la enzima, incluyendo los puntos de unión de ATP, el sitio activo aceptor de protones y los puntos de autofosforilación, se mantienen conservadas. Esto indica que la capacidad catalítica y la regulación biológica de la proteína PIM-1 podrían no verse sustancialmente afectadas por estas mutaciones. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para determinar su impacto específico en la progresión del linfoma.

El análisis de dinámica molecular reveló que las mutaciones pueden tener un impacto significativo en la dinámica estructural y funcional de la enzima, lo que puede influir en la progresión del cáncer asociado a PIM-1. Las mutaciones afectan las correlaciones cruzadas en regiones específicas de la proteína. Por ejemplo, PIM-1L184V muestra una correlación negativa más fuerte entre los residuos 188-207 y 233-248, mientras que PIM-1S97N carece de correlaciones significativas en las mismas regiones. Estos resultados sugieren que ambas mutaciones impactan de diferentes maneras la dinámica de la proteína, lo que puede repercutir en su función y actividad enzimática.

Estos hallazgos son esenciales para comprender cómo las mutaciones en PIM-1 pueden alterar las interacciones dinámicas y, por lo tanto, la función de la enzima. Esto tiene importantes implicaciones para el diseño de tratamientos precisos para linfomas y leucemias humanas. Por lo tanto, es fundamental continuar investigando el papel específico de estas mutaciones en la progresión

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

del cáncer y el desarrollo de inhibidores selectivos que se dirijan a los sitios de unión de péptidos en PIM-1, lo que podría ofrecer nuevas oportunidades terapéuticas para estas enfermedades.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

IX. RECOMENDACIONES

se sugiere continuar con investigaciones más profundas que evalúen el impacto específico de las mutaciones PIM-1L184V y PIM-1S97N en la progresión del cáncer asociado a PIM-1. Dado que estas mutaciones pueden alterar la dinámica estructural y funcional de la enzima de maneras diferentes, es crucial comprender a fondo cómo afectan las interacciones entre regiones clave de la proteína y su actividad enzimática. Este conocimiento detallado podría proporcionar nuevas perspectivas sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la progresión del cáncer.

Asimismo, se recomienda desarrollar inhibidores selectivos que se dirijan a los sitios de unión de péptidos específicos en PIM-1, especialmente considerando las diferencias en la dinámica de la enzima causadas por las mutaciones. Los inhibidores de moléculas pequeñas diseñados para atacar regiones específicas de PIM-1, como el sitio de unión de ATP o el bucle de activación, podrían ofrecer enfoques terapéuticos novedosos para tratar linfomas y leucemias humanas relacionados con PIM-1.

Finalmente, es importante explorar estrategias combinadas de tratamiento que involucren la inhibición de PIM-1 junto con otras terapias dirigidas para maximizar la eficacia en el manejo de los linfomas y leucemias relacionados con esta enzima. Los estudios futuros deben considerar la influencia de las mutaciones PIM-1L184V y PIM-1S97N en la resistencia a tratamientos y su posible impacto en el pronóstico de los pacientes.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pérez Zuñiga JM, Aguilar C, Álvarez JL, Augusto M, Baéz PE, Bates R, et al. Generalidades sobre linfoma. Rev Hematol Mex. 19(4):174-88.

2. Müller AMS, Ihorst G, Mertelsmann R, Engelhardt M. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. Ann Hematol. 1 de enero de 2005;84(1):1-12.

3. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Boletín epidemiológico del Perú. Volumen 32 - SE 08 semana epidemiológica (del 19 al 25 de febrero del 2023) [Internet]. Perú: Ministerio de Salud; 2023. Disponible en: https://www.dge.gob.pe/epipublic/uploads/boletin/boletin_20238_23_092046.pdf

4. Garcés Ortega JP, González Bracho JR, Ortiz Benavides RE, Quijije Castro JJ, Cajas JI, Vázquez Maita EG, et al. Linfoma de Hodgkin y no Hodgkin: desde una perspectiva molecular, diagnóstica y terapéutica. Arch Venez Farmacol Ter. 2021;40(3):310-21.

5. Nawijn MC, Alendar A, Berns A. For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis. Nat Rev Cancer. enero de 2011;11(1):23-34.

6. Kumar A, Mandiyan V, Suzuki Y, Zhang C, Rice J, Tsai J, et al. Crystal Structures of Proto-oncogene Kinase PIM-1: A Target of Aberrant Somatic Hypermutations in Diffuse Large Cell Lymphoma. J Mol Biol. 1 de abril de 2005;348(1):183-93.

7. Magnuson NS, Wang Z, Ding G, Reeves R. Why target PIM-1 for cancer diagnosis and treatment? Future Oncol Lond Engl. septiembre de 2010;6(9):1461-78.

8. Kuo HP, Ezell SA, Hsieh S, Schweighofer KJ, Cheung LW, Wu S, et al. The role of PIM-1 in the ibrutinib-resistant ABC subtype of diffuse large B-cell lymphoma. Am J Cancer Res. 1 de noviembre de 2016;6(11):2489-501.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

9. Wang J, Kim J, Roh M, Franco OE, Hayward SW, Wills ML, et al. PIM-1 kinase synergizes with c-MYC to induce advanced prostate carcinoma. Oncogene. 29 de abril de 2010;29(17):2477-87.

10. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation. Immunity. 23 de marzo de 2007;26(3):371-81.

11. Lahera Alonso A. La desregulación de STAT5 en las neoplasias linfoblásticas de células T: bases moleculares subyacentes y posibles líneas de tratamiento [Internet] [Tesis doctoral]. [Madrid]: Universidad Autónoma de Madrid; 2022 [citado 27 de septiembre de 2023]. Disponible en: https://repositorio.uam.es/handle/10486/704771

12. Machado Cobas B, Santana Galano A, Guilbeaux Cantillo D, Sanamé Columbié O. Biología molecular de leucemia mieloide aguda. Rev Inf Científica. 2011;72(4):1-12.

13. Elinos-Báez CM, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. Gac Médica México. 2003;139(5):493-9.

14. Serrano S. La inactivación de PIM quinasas potencia la muerte celular medida por el ligando de muerte trail en glioblastoma [Internet] [Tesis Doctoral]. [España]: Universidad de Granada; 2019. Disponible en: https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/55755/88284.pdf?sequence=4&isAllowed=y

15. Mizuno K, Shirogane T, Shinohara A, Iwamatsu A, Hibi M, Hirano T. Regulation of Pim-1 by Hsp90. Biochem Biophys Res Commun. 2 de marzo de 2001;281(3):663-9.

16. Kim O, Jiang T, Xie Y, Guo Z, Chen H, Qiu Y. Synergism of cytoplasmic kinases in IL6-induced ligand-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells. Oncogene. marzo de 2004;23(10):1838-44.

17. Warfel NA, Kraft AS. PIM kinase (and Akt) biology and signaling in tumors. Pharmacol Ther. julio de 2015;151:41-9.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

18. Weizmann Institute of Science, LifeMap Science sds. GeneCards The human gene database. 2023. PIMS gene - Pim-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase. Disponible en: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PIM-1

19. Martínez Silva AV, Dinkova T. Mecanismos de regulación traduccional mediados por el factor de inicio 4E: Las dos caras de la moneda. Rev Educ Bioquímica. 2010;29(3):82-91.

20. Jacobs MD, Black J, Futer O, Swenson L, Hare B, Fleming M, et al. Pim-1 ligand-bound structures reveal the mechanism of serine/threonine kinase inhibition by LY294002. J Biol Chem. 8 de abril de 2005;280(14):13728-34.

21. Qian KC, Wang L, Hickey ER, Studts J, Barringer K, Peng C, et al. Structural basis of constitutive activity and a unique nucleotide binding mode of human Pim-1 kinase. J Biol Chem. 18 de febrero de 2005;280(7):6130-7.

22. Bogusz J, Zrubek K, Rembacz KP, Grudnik P, Golik P, Romanowska M, et al. Structural analysis of PIM-1 kinase complexes with ATP-competitive inhibitors. Sci Rep. 17 de octubre de 2017;7(1):13399.

23. Mansour B, Salem YA, Attallah KM, El-kawy OA, Ibrahim IT, Abdel-Aziz NI. Cyanopyridinone- and Cyanopyridine-Based Cancer Cell Pim-1 Inhibitors: Design, Synthesis, Radiolabeling, Biodistribution, and Molecular Modeling Simulation. ACS Omega. 6 de junio de 2023;8(22):19351-66.

24. Lee B, Lee H, Cho J, Yoon SE, Kim SJ, Park WY, et al. Mutational Profile and Clonal Evolution of Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Front Oncol. 11 de marzo de 2021;11:1-17.

25. Skjærven L, Yao XQ, Scarabelli G, Grant BJ. Integrating protein structural dynamics and evolutionary analysis with Bio3D. BMC Bioinformatics. 10 de diciembre de 2014;15(1):1-11.

26. Grant BJ, Skjaerven L, Yao XQ. The Bio3D packages for structural bioinformatics. Protein Sci Publ Protein Soc. enero de 2021;30(1):20-30.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

27. Kalenkiewicz A, Grant BJ, Yang CY. Enrichment of druggable conformations from apo protein structures using cosolvent-accelerated molecular dynamics. Biology. 21 de abril de 2015;4(2):344-66.

28. Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC Bioinformatics. 2004;5:1-19.

29. Williams CJ, Headd JJ, Moriarty NW, Prisant MG, Videau LL, Deis LN, et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. Protein Sci. 2018;27(1):293-315.

30. Lüthy R, Bowie JU, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. Nature. 1992;356(6364):83-5.

31. Bowie JU, Lüthy R, Eisennberg D. A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure | Science. Ciencia. 1991;253(5016):164-70.

32. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. SoftwareX. 1 de septiembre de 2015;1-2:19-25.

33. Huang J, MacKerell AD. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. J Comput Chem. 30 de septiembre de 2013;34(25):2135-45.

34. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. diciembre de 2013;30(12):2725-9.

35. Guinot A de M. Structural studies of different form I Rubiscos using molecular dynamics simulations [Internet] [Tesis Doctoral]. [Inglaterra]: Imperial College London; 2016 [citado 27 de septiembre de 2023]. Disponible en: http://spiral.imperial.ac.uk/handle/10044/1/51422

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

36. Siqueira AS, Lima ARJ, Dall'Agnol LT, de Azevedo JSN, da Silva Gonçalves Vianez JL, Gonçalves EC. Comparative modeling and molecular dynamics suggest high carboxylase activity of the Cyanobium sp. CACIAM14 RbcL protein. J Mol Model. 2 de marzo de 2016;22(3):68.

37. Hess B, Bekker H, Berendsen HJC, Fraaije JGEM. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. J Comput Chem. 1997;18(12):1463-72.

38. Bakan A, Meireles LM, Bahar I. ProDy: Protein Dynamics Inferred from Theory and Experiments. Bioinformatics. 1 de junio de 2011;27(11):1575-7.

39. Bakan A, Dutta A, Mao W, Liu Y, Chennubhotla C, Lezon TR, et al. Evol and ProDy for bridging protein sequence evolution and structural dynamics. Bioinformatics. 15 de septiembre de 2014;30(18):2681-3.

40. Lesgidou N, Eliopoulos E, Goulielmos GN, Vlassi M. Insights on the alteration of functionality of a tyrosine kinase 2 variant: a molecular dynamics study. Bioinformatics. 1 de septiembre de 2018;34(17):i781-6.

41. Wang RR, Ma Y, Du S, Li WY, Sun YZ, Zhou H, et al. Exploring the reason for increased activity of SHP2 caused by D61Y mutation through molecular dynamics. Comput Biol Chem. 2019;78:133-43.

42. Li WY, Wei HY, Sun YZ, Zhou H, Ma Y, Wang RL. Exploring the effect of E76K mutation on SHP2 cause gain-of-function activity by a molecular dynamics study. J Cell Biochem. 2018;119(12):9941-56.

43. Wang C, Chen Q, Luo H, Chen R. Role and mechanism of PIM family in the immune microenvironment of diffuse large B cell lymphoma. World J Surg Oncol. 2023;21(1):76. Published 2023 Mar 4. doi:10.1186/s12957-023-02947-5

44. Casillas AL, Chauhan SS, Toth RK, et al. Direct phosphorylation and stabilization of HIF-1α by PIM1 kinase drives angiogenesis in solid tumors. Oncogene. 2021;40(32):5142-5152. doi:10.1038/s41388-021-01915-1

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

45. Rathi A, Kumar D, Hasan GM, Haque MM, Hassan MI. Therapeutic targeting of PIM KINASE signaling in cancer therapy: Structural and clinical prospects. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2021;1865(11):129995. doi:10.1016/j.bbagen.2021.129995

46. Arrouchi H, Lakhlili W, Ibrahimi A. A review on PIM kinases in tumors. Bioinformation. 2019;15(1):40-45. Published 2019 Feb 3. doi:10.6026/97320630015040

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

ANEXOS

Anexo 01. Secuencia de aminoácidos

Secuencia de la quinasa PIM-1

MLLSKINSLAH	LRAAPCNDLH	ATKLAPGKE	KEPLESQYQV	GPLLGSGGFG
SVYSGIRVSD	NLPVAIKHVE	KDRISDWGEL	PNGTRVPMEV	VLLKKV**S**SGF
SGVIRLLDWF	ERPDSFVLIL	ERPEPVQDLF	DFITERGALQ	EELARSFFWQ
VLEAVRHCHN	CGVLHRDIKD	ENILIDLNRG	ELK**L**IDFGSG	ALLKDTVYTD
FDGTRVYSPP	EWIRYHRYHG	RSAAVWSLGI	LLYDMVCGDI	PFEHDEEIIR
GQVFFRQRVS	SECQHLIRWC	LALRPSDRPT	FEEIQNHPWM	QDVLLPQETA
EIHLHSLSPG	PSK			

Secuencia de la mutación PIM-1^{L184V}

MLLSKINSLAH	LRAAPCNDLH	ATKLAPGKE	KEPLESQYQV	GPLLGSGGFG
SVYSGIRVSD	NLPVAIKHVE	KDRISDWGEL	PNGTRVPMEV	VLLKKV**S**SGF
SGVIRLLDWF	ERPDSFVLIL	ERPEPVQDLF	DFITERGALQ	EELARSFFWQ
VLEAVRHCHN	CGVLHRDIKD	ENILIDLNRG	ELK**V**IDFGSG	ALLKDTVYTD
FDGTRVYSPP	EWIRYHRYHG	RSAAVWSLGI	LLYDMVCGDI	PFEHDEEIIR
GQVFFRQRVS	SECQHLIRWC	LALRPSDRPT	FEEIQNHPWM	QDVLLPQETA
EIHLHSLSPG	PSK			

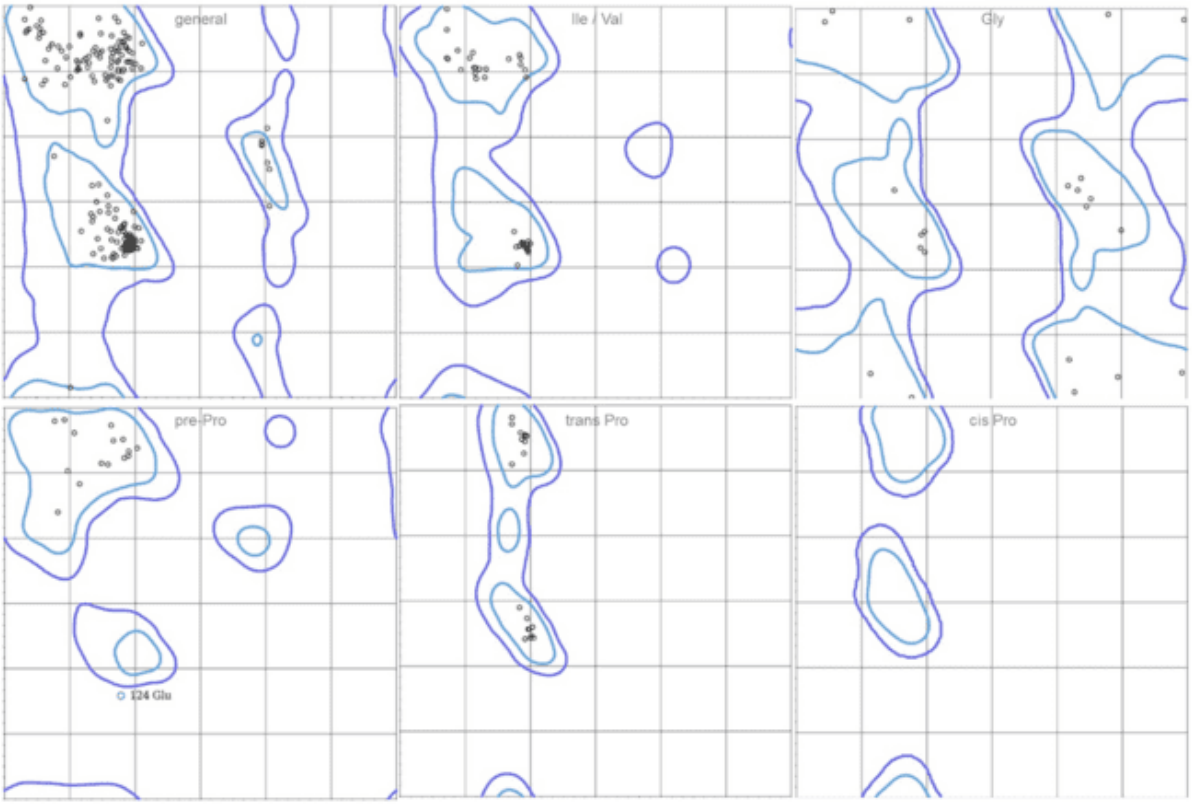
Secuencia de la mutación PIM-1^{S97N}

MLLSKINSLAH	LRAAPCNDLH	ATKLAPGKE	KEPLESQYQV	GPLLGSGGFG
SVYSGIRVSD	NLPVAIKHVE	KDRISDWGEL	PNGTRVPMEV	VLLKKV**N**SGF
SGVIRLLDWF	ERPDSFVLIL	ERPEPVQDLF	DFITERGALQ	EELARSFFWQ
VLEAVRHCHN	CGVLHRDIKD	ENILIDLNRG	ELK**L**IDFGSG	ALLKDTVYTD
FDGTRVYSPP	EWIRYHRYHG	RSAAVWSLGI	LLYDMVCGDI	PFEHDEEIIR
GQVFFRQRVS	SECQHLIRWC	LALRPSDRPT	FEEIQNHPWM	QDVLLPQETA
EIHLHSLSPG	PSK			

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Anexo 02. Análisis de Ramachandran

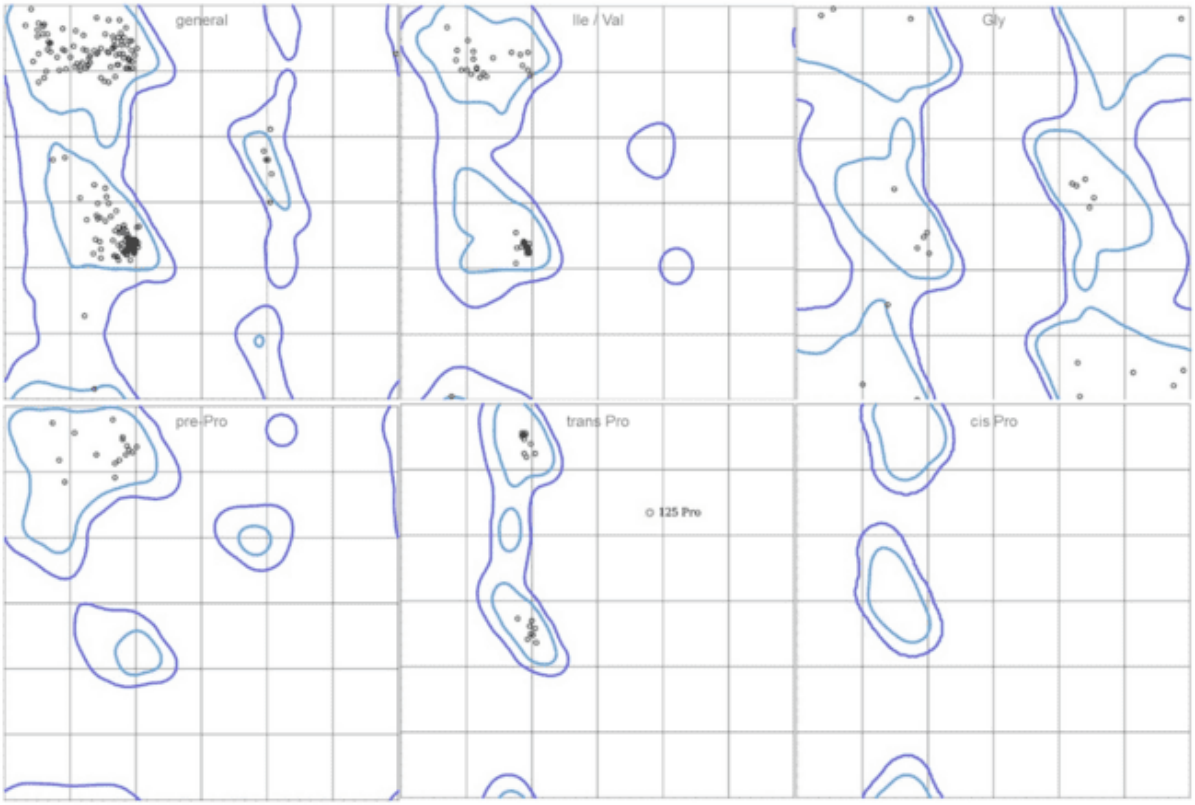
PIM-1



Gráficos de Ramachandran por MolProbity, utilizados para la validación de la columna vertebral. El 98,7% (307/311) de todos los residuos se encontraban en regiones favorecidas (98%). El 99,7% (310/311) de todos los residuos se encontraban en regiones permitidas (>99,8%). Hubo 1 valor atípico (phi, psi): 124 glu (-73,4, -85,5)

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

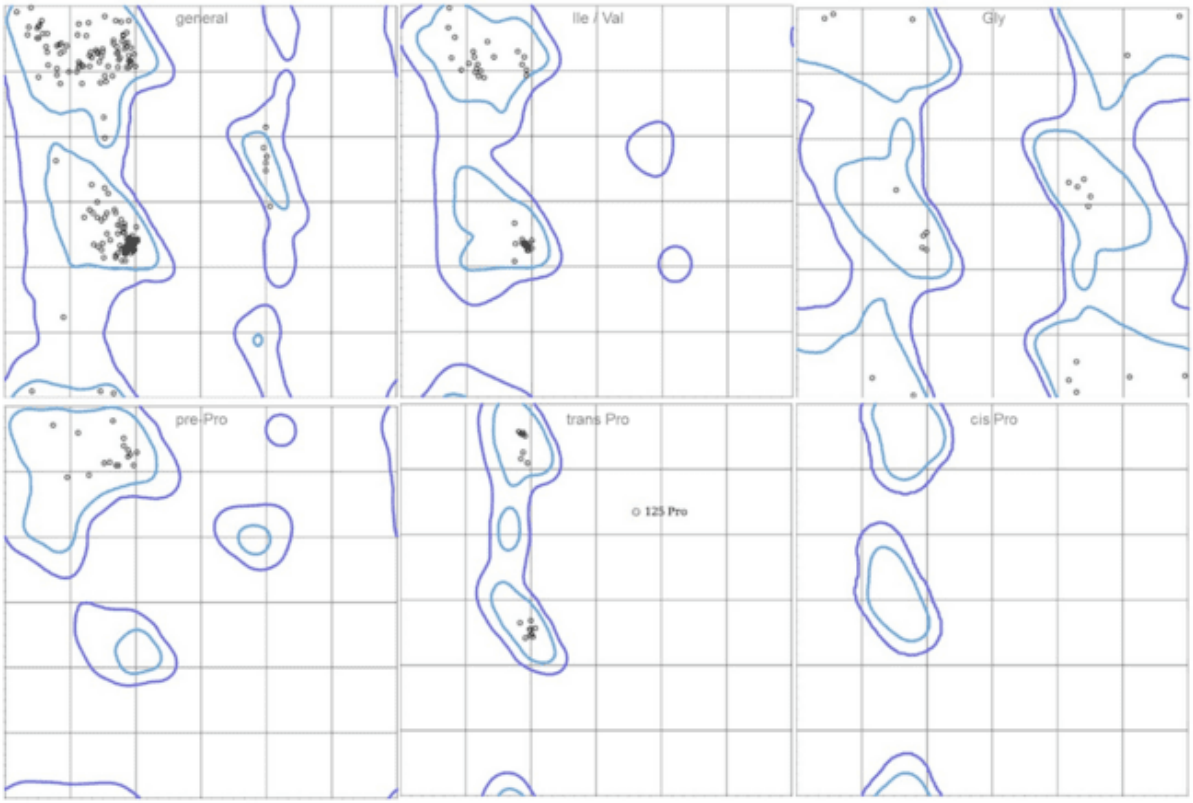
PIM-1^{L184V}



Gráficos de Ramachandran por MolProbity, utilizados para la validación de la columna vertebral. El 98,1% (305/311) de todos los residuos se encontraban en regiones favorecidas (98%). El 99,7% (310/311) de todos los residuos se encontraban en regiones permitidas (>99,8%). Hubo 1 valor atípico (phi, psi): 125 Pro (48,9, 81,1)

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

PIM-1^{S97N}



Gráficos de Ramachandran por MolProbity, utilizados para la validación de la columna vertebral. El 98,7% (307/311) de todos los residuos se encontraban en regiones favorecidas (98%). El 99,7% (310/311) de todos los residuos se encontraban en regiones permitidas (>99,8%). Hubo 1 valor atípico (phi, psi): 125 Pro (37,3, 81,6)

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Resolución de proyecto aprobado

CIENTÍFICA
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

RESOLUCIÓN DIRECTORAL ACADÉMICA DE CARRERA No. 155- DACMH-DAFCS-U. CIENTIFICA-2024

Villa el Salvador, 22 de febrero del 2024

VISTO:

El informe de revisión independiente académica del Proyecto de Investigación titulado: **"EFECTO DE LAS MUTACIONES PIM-1L184V Y PIM-1S97N EN LA DINÁMICA MOLECULAR DE LA ENZIMA PIM-1 ASOCIADO A CÁNCER LINFOMA".**

CONSIDERANDO:

Que, de acuerdo al Reglamento General de la Universidad Científica del Sur y el reglamento y Procedimientos de trabajos de Investigación para obtener el **Título Profesional De Médico Cirujano.**

Que, de acuerdo a la Resolución Directoral No. 012-DGIDI-Cientifica-2021, con fecha 16 de agosto del 2021, que no requiere evaluación ética, según descrita en el numeral 4 y por no incluir a seres humanos ni animales en su análisis.

Que, de acuerdo a la normativa vigente de la Universidad Científica del Sur, en uso de las atribuciones conferidas al Director Académico de la Carrera.

SE RESUELVE:

ART. 1° Aprobar, en vías de regularización e inscribir el Proyecto de Investigación titulado: **"EFECTO DE LAS MUTACIONES PIM-1L184V Y PIM-1S97N EN LA DINÁMICA MOLECULAR DE LA ENZIMA PIM-1 ASOCIADO A CÁNCER LINFOMA"** presentado por los alumnos: Claudia Sofia Vargas Quiroz y Cristopher Jose Edmundo Enriquez Saenz.

ART. 2° Nombrar al Docente Vladimir Fernando Camel Paucar, como asesor para el desarrollo delProyecto de Investigación en cuestión.

Regístrese, comuníquese y archívese.

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD – Decano de la Carrera de Medicina Humana – UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

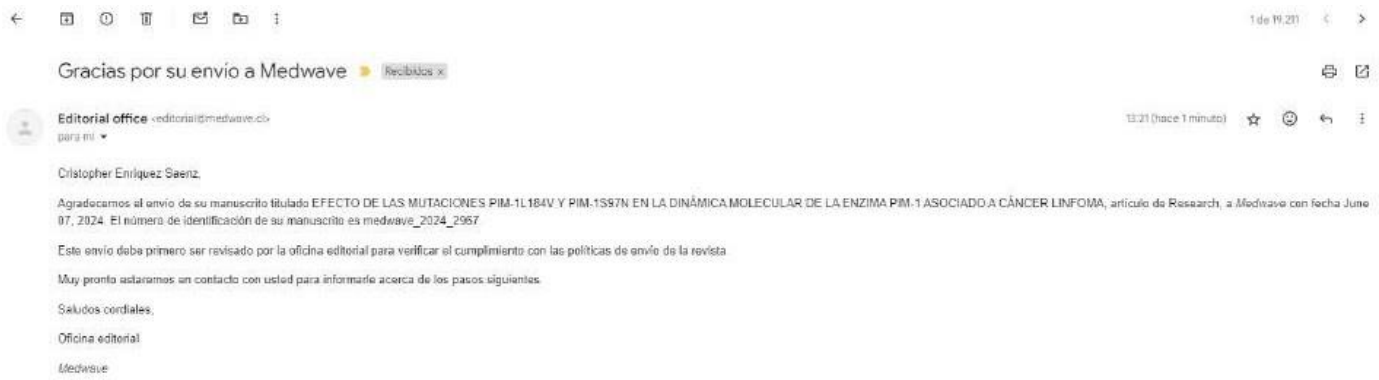
Mg. JORDI GRAU MONGE
Decano
Carrera de Medicina Humana

c.c. Archivo

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Evidencia de envío: REVISTA MED

WAVE https://www.medwave.cl/



Gracias por su envío a Medwave

Recibidos x

Editorial office <editorial@medwave.cl>
para mí

13:21 (hace 1 minuto)

Cristopher Enriquez Saenz,

Agradecemos el envío de su manuscrito titulado EFECTO DE LAS MUTACIONES PIM-1L184V Y PIM-1S97N EN LA DINÁMICA MOLECULAR DE LA ENZIMA PIM-1 ASOCIADO A CÁNCER LINFOMA, artículo de Research, a *Medwave* con fecha June 07, 2024. El número de identificación de su manuscrito es medwave_2024_2967.

Este envío deba primero ser revisado por la oficina editorial para verificar el cumplimiento con las políticas de envío de la revista.

Muy pronto estaremos en contacto con usted para informarle acerca de los pasos siguientes.

Saludos cordiales,

Oficina editorial

Medwave

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis