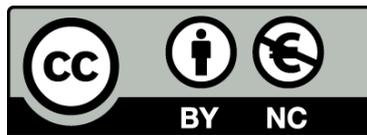




Interfaces proteína-proteína: un nuevo tipo de diana terapéutica

Montserrat Pujadas Lorente



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT

De FARMÀCIA

DEPARTAMENT

De FÍSICOQUÍMICA

INTERFACES PROTEÍNA-PROTEÍNA: UN NUEVO TIPO DE DIANA TERAPÉUTICA

MONTSERRAT PUJADAS LORENTE

2014

UNIVERSITAT de BARCELONA

FACULTAT de FARMÀCIA

DEPARTAMENT de FISICOQUÍMICA

PROGRAMA DE DOCTORAT en BIOMEDICINA

INTERFACES PROTEÍNA-PROTEÍNA: UN NUEVO TIPO de DIANA TERAPÉUTICA

Memòria presentada per Montserrat Pujadas Lorente per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Director y tutor

Doctoranda

Dr. Xavier Barril Alonso

Montserrat Pujadas Lorente

MONTSERRAT PUJADAS LORENTE

2014

Agradecimientos

Han sido 5 largos años de doctorado, digo largos, porque son cerca de 2.000 días, pero si giramos la vista atrás, han pasado en un suspiro. Y es que 5 años dan para mucho: muchas horas delante del ordenador, y otras tantas en la poyata! Tantas idas y venidas Bio/Farma/Parc, seminarios de grupo, pica-picas y sobretodo, afterworks!!!

De estos cinco años, me llevo muchos momentos memorables, muchos! Por eso, me gustaría agradecer el apoyo brindado a mi familia, en primer lugar, a Xavi y a mis amigos. Gracias por la paciencia, los ánimos, los vinitos terapéuticos, las barbacoas, y los ratos de relax.

También quisiera agradecer a mis compañeros de laboratorio, los Xavis y las Minoryxtas, a los que están y a todos aquellos con los que he coincidido en algún momento (no diré nombres, no quisiera olvidarme a nadie!!) los Javis, los Torriberos, las Curus, Ramón, Campa, los Peps... y sobretodo a Xavi, por la confianza depositada en mí. Gracias a todos, es mucho lo bueno que me llevo! Compis iguales, no encontraré!

De igual forma, me gustaría agradecer el apoyo recibido en el laboratorio de la Dra. Marian Martínez, durante nuestra colaboración para el proyecto HDAC8. Gracias, chicas, por vuestros conocimientos, vuestra ayuda y vuestro tiempo!

Me gustaría, además, agradecer a todos los miembros del grupo del Dr. Miquel Coll su ayuda con el proyecto de CheA/CheY. A todos los que han pasado por allí y he coincidido con ellos, por haberme ayudado en algún u otro momento y haberme solucionado dudas. Gracias a todos, por vuestra ayuda, vuestra paciencia y vuestro conocimiento!

Contenido (Índice)

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Contenido (Índice) | 7 |
| 1. Introducción | 13 |
| 1.1. <i>Historia del Descubrimiento de Fármacos</i> | 13 |
| 1.2. <i>Situación Actual del Descubrimiento de Fármacos.</i> | 14 |
| 1.2.1. <i>Dianas Farmacológicas</i> | 16 |
| 1.2.2. <i>El concepto de “Druggability”.</i> | 17 |
| 1.2.3. <i>Mecanismos Moleculares de Acción</i> | 18 |
| 1.2.4. <i>Diseño de Fármacos: Enfoques</i> | 20 |
| ➤ <i>Enfoque basado en diana terapéutica:</i> | 20 |
| ➤ <i>Enfoque fenotípico:</i> | 21 |
| ➤ <i>Otros enfoques:</i> | 21 |
| 1.2.5. <i>Diseño de Fármacos: Lecciones y direcciones futuras</i> | 23 |
| 1.3. <i>Aproximación Racional a los Mecanismos de Acción a Estudiar.</i> | 24 |
| 1.3.1. <i>Modulación de las PPI Mediante Moléculas Tipo Fármaco.</i> | 25 |
| 1.4. <i>Diseño de Moléculas “PP-glue”.</i> | 29 |
| 1.4.1. <i>Introducción</i> | 29 |
| 1.4.2. <i>CheA/CheY</i> | 30 |
| 1.4.3. <i>Trabajo Computacional Previo con CheA/CheY.</i> | 36 |
| 1.5. <i>Estudio de la Regulación por Alostерismo.</i> | 37 |
| 1.5.1. <i>Introducción.</i> | 37 |
| 1.5.2. <i>HDAC8</i> | 38 |
| 1.5.3. <i>Regulación Alostérica.</i> | 45 |
| 1.5.4. <i>Estudio Computacional Previo.</i> | 46 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2. Objetivos | 51 |
| <i>A) Objetivos Generales</i> | 51 |
| <i>B) Objetivos Específicos</i> | 51 |
| <i>Identificación de estabilizadores de IPPs.</i> | 51 |
| <i>Regulación de la actividad de HDAC8 por fosforilación.</i> | 53 |
| 3. Metodología | 55 |
| 3.1. <i>Estudio de las Interacciones Proteína-Proteína: CheA/CheY.</i> | 55 |
| 3.1.1. Constructos | 55 |
| 3.1.2. Expresión y Purificación | 60 |
| 3.1.3. Preparación de Compuestos | 64 |
| <i>ENSAYOS BIOFÍSICOS</i> | 67 |
| 3.1.4. Biacore (SPR) | 67 |
| 3.1.5. DSF | 78 |
| 3.1.6. Termoforesis a Microescala | 80 |
| 3.1.7. Cristalografía | 83 |
| <i>ENSAYOS IN VIVO</i> | 87 |
| 3.1.8. Ensayos de Motilidad | 88 |
| 3.1.9. Electroforesis PhosTag y Western-blot. | 90 |
| <i>ENSAYO IN VITRO</i> | 95 |
| 3.1.10. Ensayo de Fosforilación <i>in vitro</i> . | 95 |
| 3.2. <i>Mecanismos Alostéricos de Regulación en HDAC8 a Través de Mutantes.</i> | 97 |
| 3.2.1. Vector y Mutaciones | 97 |
| 3.2.3. Fosforilación por PKA | 103 |
| 3.2.4. Western blot | 103 |
| 3.2.5. Ensayo de Actividad | 104 |
| 4. Resultados | 107 |
| 4.1. <i>Diseño de Moléculas “PP-glue”.</i> | 107 |
| <i>MÉTODOS BIOFÍSICOS</i> | 107 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.1.1. Biacore | 107 |
| 4.1.2. Termoforesis Microescala | 127 |
| 4.1.3. Cristalografía | 131 |
| <i>ENSAYOS IN VIVO</i> | 135 |
| 4.1.4. Ensayos de Motilidad | 135 |
| <i>ENSAYO IN VITRO</i> | 143 |
| 4.1.5. Ensayo de Fosforilación <i>in vitro</i> | 143 |
| 4.2. Estudio de la Función Regulatoria por Alostereismo en HDAC8. | 147 |
| 4.2.1. Expresión de HDAC8 wt y Mutantes | 147 |
| 4.3.1. Ensayo de Fosforilación de HDAC8 por parte de PKA. | 149 |
| 5. Discusión | 153 |
| 6. Conclusiones | 165 |
| 6.1. Método Experimental de Diseño de Moléculas "PP-glue". | 165 |
| 6.2. Estudio de la Función Regulatoria por Alostereismo en HDAC8. | 169 |
| 7. Bibliografía | 173 |

1. Introducción

Esta tesis lleva por nombre: “Interfaces proteína-proteína: un nuevo tipo de diana terapéutica” y presenta las interfaces entre proteínas como espacios capaces de ser ocupados por moléculas tipo fármaco a fin de crear un efecto biológico, mediante una aproximación racional.

1.1. Historia del Descubrimiento de Fármacos

En los últimos siglos ha tenido lugar una revolución científica sin precedentes, el enorme desarrollo científico y técnico de los últimos años se ha traducido también en innumerables avances en el campo de la Medicina. Avances y descubrimientos fundamentales, algunos con nombre propio como los antibióticos de Alexander Fleming, las vacunas de Louis Pasteur o el conocimiento de la asepsia de Lister, y muchos otros fruto de redes cada vez más extensas de investigadores, tales como la anestesia, técnicas de hemostasia, la cirugía, el reconocimiento de los cromosomas como portadores de la información genética, la erradicación de enfermedades, el proyecto Genoma Humano... Estos y otros avances han contribuido a que la Medicina se haya ido consolidando como una disciplina cada vez más resolutiva y eficaz, hasta llegar al día de hoy, dónde se está empezando a implantar la Farmacogenómica en la Medicina del S.XXI, acompañando el diagnóstico del paciente de un test genético a fin de conseguir un tratamiento individualizado.

Un largo camino se ha recorrido hasta llegar a esta nueva era y la farmacología también ha contribuido decisivamente a este desarrollo, hasta el punto que el uso de fármacos se ha convertido en el principal recurso médico. Esto a sido posible gracias tanto al descubrimiento de los principios activos en productos naturales como al descubrimiento de nuevas sustancias. El desarrollo de nuevos fármacos se nutre constantemente de las nuevas tecnologías que aparecen constantemente en escena: la robótica, los ensayos celulares, los avances en óptica, la genómica... todas y cada una de ellas han contribuido al cambio en el

proceso del desarrollo de fármacos. También han sido de vital importancia los avances obtenidos en diferentes disciplinas, como por ejemplo a avances en química y fisiología gracias a los que se pudieron conocer los mecanismos de acción molecular de los fármacos. Este progreso tecnológico ha ido acompañado de cambios estructurales en las organizaciones dedicadas a la investigación farmacéutica, que además de investigar también se dedicaron a producir, obtener aprobación de las agencias regulatorias y comercializar los distintos fármacos que hoy en día conocemos.

1.2. Situación Actual del Descubrimiento de Fármacos.

En los últimos 60 años, la industria farmacéutica ha desarrollado más de 1.220 nuevos fármacos, que han jugado un papel muy importante en mejorar nuestra salud y que han contribuido a aumentar nuestra esperanza de vida en aproximadamente, unos dos meses por año. Sin embargo, pese a que lo que puedan parecer estos números la industria farmacéutica no ha conseguido aumentar su productividad: el número de nuevos fármacos aprobados por año, no es mayor ahora que hace 60 años¹. Parece paradójico, puesto que el capital invertido en I+D ha crecido de manera exponencial, y los nuevos avances tecnológicos parecen no tener fin. Hay que tener en cuenta que tras la introducción de nuevos descubrimientos, estrategias o tecnologías, es preciso un tiempo de margen para que podamos ver su repercusión en el ámbito farmacológico. Pese a todo, las grandes farmacéuticas siguen produciendo nuevos fármacos a la misma velocidad que cuando empezaron.

Dicho en números: actualmente hay más de 4.300 compañías implicadas en investigación farmacéutica, de estas, tan sólo 261 han registrado al menos un nuevo fármaco desde 1.950, y de estas 261, sólo 105 organizaciones existen hoy en día. Esta alta tasa de recambio se debe a que la mayoría de empresas no pueden mantener el elevado ritmo de producción necesario para crecer, estimado en entre 2 y 3 nuevas entidades farmacológicas al año. Cómo aumentar la productividad si parece que nada de lo que se ha hecho en innovación ha servido hasta el momento? Se constata que el dramático aumento en el coste de desarrollo de fármacos se debe tanto a un incremento de los costes como a una mayor tasa de errores, y el coste de los proyectos fallidos termina repercutiendo en el precio de los nuevos fármacos aprobados.

Para incrementar la productividad es fundamental reducir la tasa de errores¹ y para ello es necesario introducir cambios fundamentales en el diseño de fármacos. Uno de los aspectos a considerar, y que está relacionado con el objetivo de esta tesis, es la definición de las dianas terapéuticas puesto que actualmente solamente se considera para tales efectos una pequeña parte del *proteoma*^{2,3}.

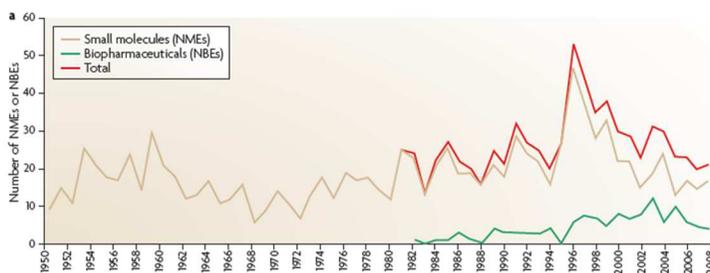


Imagen 1: Los orígenes de los nuevos fármacos. a) Número de nuevas entidades farmacológicas aprobadas durante los últimos 60 años.¹

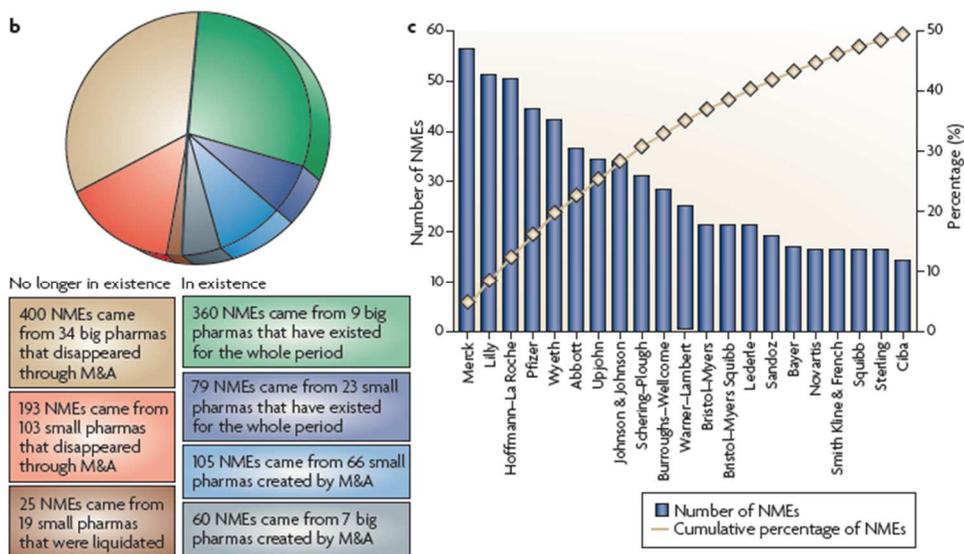


Imagen 2: b) detalle de las 1222 nuevas entidades farmacológicas y las 261 empresas que las produjeron. **c)** entre 21 compañías han producido el 50% de las nuevas entidades farmacológicas que se han introducido en el mercado desde de 1.950.¹

1.2.1. Dianas Farmacológicas

La **diana farmacológica**⁴ es la estructura molecular que hace de nexo entre los fármacos administrados para una determinada enfermedad o estado transitorio y el efecto clínico conseguido. Son proteínas que tienen un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Las dianas farmacológicas comprenden: enzimas, sustratos, metabolitos y proteínas, receptores, canales iónicos, transportadores de proteínas, DNAs/RNAs y ribosomas, y dianas de anticuerpos monoclonales; o lo que es lo mismo: todas aquellas estructuras capaces de ser modificadas por una molécula tipo fármaco. Aunque no todos los fármacos actúan vía interacción directa con productos del genoma humano, éste es el caso para la inmensa mayoría (88%).⁵ Cuantificar el número de dianas terapéuticas actualmente explotadas resulta, como veremos, un ejercicio complicado.

Drews y Ryser fueron los primeros en estimar en 417 el número de receptores, enzimas, canales iónicos y otro tipo de dianas en el cuerpo humano para las cuáles la industria farmacéutica ha generado fármacos con acción terapéutica^{5,6}. Posteriormente, en 2.002, después de secuenciarse el genoma humano, Hopkins y Groom identificaron 120 dianas moleculares para productos farmacéuticos los cuáles ya se comercializaban. Analizando bases de datos y literatura, también identificaron 399 dianas que unían compuestos pequeños⁵. Poco más tarde, en el 2006, fue Imming quién estimó en 218 las dianas moleculares para fármacos ya aprobados⁷. Pero en el mismo año, Overington dio unos números algo mayores: 324 dianas moleculares para fármacos ya aprobados, 266 de las cuáles están codificadas en el genoma humano⁴. Actualmente, tras analizar el DrugBank, se identificaron 435 genes humanos que codifican para dianas tratables por fármacos en el mercado⁸. Recientemente, la FDA estima en unos 19, los nuevos fármacos anuales, los cuáles actúan sobre dianas codificadas por el genoma humano o el de agentes patógenos. De estas, se cree, que sólo unos 4 nuevos fármacos al año están dirigidos a dianas moleculares hasta entonces no explotadas. Esta cifra contrasta con las dimensiones del genoma y proteoma humanos, estimados en 300.000⁵ y más de 20.000 componentes, respectivamente. Además, si nos fijamos en la naturaleza de las dianas terapéuticas explotadas en la actualidad, vemos que se distribuyen de modo muy poco homogéneo, con algunas familias de proteínas - particularmente los receptores acoplados a proteína G (GPCRs), los receptores nucleares y los canales iónicos -copando proporciones muy elevadas (Figura 3).

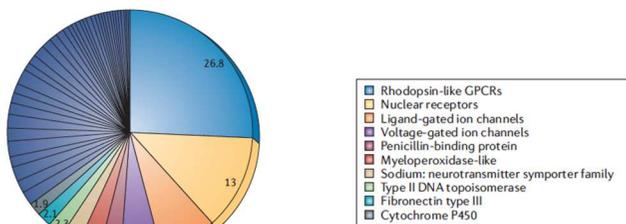


Imagen 3: distribución de las familias de dianas actuales según fármacos reguladores.

1.2.2. El concepto de “Druggability”.

Esta observación ha dado pie al concepto de "druggability", acuñado por Hopkins y Groom en una publicación del año 2002,⁹ donde se considera que solamente una pequeña fracción del genoma es tratable farmacológicamente ('*druggable genome*') y consiste en aquellas proteínas y complejos de proteínas, los cuáles reúnen una serie de características que los capaces de unir con alta afinidad a moléculas de tipo fármaco ('*drug-like*') y que, como resultado de dicha interacción modifican su actividad.

Se estima que en las últimas décadas, alrededor de un 60% de los proyectos de descubrimiento de fármacos fueron incapaces de identificar cabezas de serie optimizables y con capacidad para modular la actividad de la proteína diana debido a la falta de druggability de la misma^{10,11,12}. Esto ha llevado a una situación en que, si bien se reconoce la necesidad de explorar nuevas dianas terapéuticas, se tiende a tomar una visión restrictiva de druggability, frecuentemente asociándola a la pertenencia a ciertas familias de proteínas^{9,13}. Varios grupos, incluyendo el nuestro, han investigado la druggability desde un punto de vista estructural, lo que permite considerar la potencial utilidad de cada proteína en base a sus propiedades fisicoquímicas, pudiendo identificar sitios capaces de unir moléculas de tipo fármaco tan solo a partir de su estructura^{14,15,16}. Sin embargo el hecho de que una molécula pueda unirse a una determinada cavidad no implica necesariamente que vaya a generar un cambio apreciable *in-vivo*, ni tampoco que este vaya a ser el cambio terapéutico que nosotros esperamos.¹⁷ La respuesta biológica a un fármaco viene dada por su mecanismo de acción molecular, que es lo que detallaremos a continuación.

1.2.3. Mecanismos Moleculares de Acción

El mecanismo molecular de acción (MMOA) de un fármaco es el mecanismo biológico molecular a través del cuál se llevan a cabo las interacciones entre el fármaco y la diana, y que, como resultado de esta unión, genera una respuesta funcional. El MMOA es característico de cada fármaco, determina la eficiencia con la que la interacción con su diana se traduce en efecto terapéutico. Hay muchas facetas de esta interacción que generan el resultado terapéutico deseado, como el lugar de interacción, el impacto funcional o la especificidad de los resultados funcionales. Todos ellos contribuyen al MMOA y afectan a la final respuesta farmacológica. Los posibles MMOA de un fármaco sobre una diana son¹⁸:

Mecanismos cinéticos: la respuesta farmacológica del fármaco está mediada por la cinética de unión y el tiempo de residencia en la diana.

- Cinética lenta: mecanismos irreversibles y que no tienen lugar en el equilibrio que implican una asociación o disociación lenta, las cuáles no permiten que se alcance el equilibrio y son menos sensibles a la competición con sustratos y/o ligandos.

Mecanismos conformacionales: la unión del fármaco a la diana implica un cambio conformacional en la diana que relaciona la unión del fármaco a la respuesta farmacológica.

- Inhibición no-competitiva o antagonista: aquí el fármaco se une a un lugar de la diana que es diferente del sustrato fisiológico y resulta en una inhibición de la respuesta.
- Inhibición no-competitiva o antagonista: se diferencia del anterior porque requiere de una activación anterior de la diana por el efector fisiológico. Esto significa que la misma cantidad de fármaco bloquea mayores concentraciones con el efector fisiológico. Por ejemplo→ *la memantina es un agonista no-competitivo que se une a la forma activa del receptor de NMDA, y la inhibición por parte de la memantina aumenta en presencia de glutamato, que es el ligando fisiológico del receptor de NMDA.*
- Inhibición incompetitiva: se une de manera reversible pero altera el centro activo.
- Inhibición reversible: modifica de manera covalente las biomoléculas. En algunos casos, se une de manera no covalente con una disociación muy muy lenta.

- Agonista total: la máxima eficacia tiene lugar cuando el fármaco se une al receptor y este se activa.
- Agonista parcial: la eficacia se da de manera parcial cuando el fármaco se une al lugar ortostérico del receptor.
- Modulador alostérico: regula la actividad biológica de una diana a través de la unión de un fármaco a un lugar diferente del centro catalítico.
- Modulador ortostérico: se une a la diana molecular en el sitio activo donde los ligandos endógenos se unen de manera natural.

Mecanismos Redox: en este tipo de mecanismo de acción, la respuesta fisiológica que genera un fármaco, se da como consecuencia de la transferencia de electrones entre el fármaco y la diana.

A través del MMOA podemos diferenciar fármacos similares respecto las indicaciones terapéuticas. Por ejemplo→ *a nivel estructural, la aspirina es un inhibidor irreversible de la ciclooxigenasa, mientras que el ibuprofeno y el naproxeno son inhibidores reversibles también de la ciclooxigenasa. Mientras que las tres moléculas tienen el mismo sustrato, el MMOA de la aspirina diferencia su uso funcional como anti-agregante plaquetario, el efecto de la aspirina sobre las plaquetas es muy duradero, puesto que inhibe de manera irreversible la formación del tromboxano y esta inhibición enzimática dura entre 4 y 7 días.*

Vemos que hay una amplia diversidad de MMOAs, pero cabe remarcar que, cuando se investigan nuevas potenciales dianas terapéuticas, se tiende a simplificar el MMOA, generalmente buscando la inhibición competitiva con sustratos (para el caso de enzimas) o ligandos endógenos (para el caso de receptores). Como veremos a continuación, esta excesiva simplificación ha sido postulada como uno de los factores que ha limitado el éxito de las aproximaciones racionales al diseño de fármacos.

1.2.4. Diseño de Fármacos: Enfoques

Respecto al diseño de fármacos, hay dos enfoques principales, bastante diferentes entre sí: el primero se fundamenta en el punto de vista fenotípico, buscando aquella molécula que proporciona un cambio en la diana; este enfoque, a veces se empieza con un limitado conocimiento del mecanismo molecular de la enfermedad. En cuanto al segundo método, basado en la diana, ofrece una hipótesis biológica específica y un punto de partida para la identificación de moléculas activas. Lo que se pretende con ello es modificar la actividad de la diana y esto proporciona una base racional para el descubrimiento de nuevos fármacos. Pero, ¿cuál de estos dos enfoques es mejor? ¿cuál convendría utilizar en cada caso? En realidad cada uno de estos métodos presenta sus pros y sus contras:

➤ Enfoque basado en diana terapéutica:

Para identificarlas, nos basamos en datos que demuestran alguna conexión entre la interacción fármaco-diana y un posterior efecto clínico, pero en ocasiones demostrar una determinada interacción molecular puede ser un auténtico reto. Las herramientas biológicas y farmacológicas nos ayudan a entender esta unión; un ejemplo de ello son los *knock-out* en ratones, que han resultado ser muy útiles, y pueden proveer evidencias de que un determinado efecto está siendo mediado por una diana en concreto. Pero, en general presentan limitaciones, y es que un único fármaco, puede interactuar con muchas y diferentes dianas generando a su vez efectos deseados y efectos no deseados. Cuando un fármaco entra en el organismo hay múltiples y simultáneos cambios en diferentes señales bioquímicas, se desencadena un entramado de reacciones, una red que actúa a diferentes niveles, y en ocasiones, estas cascadas de reacción dificultan reconocer los efectos directos del fármaco. Todo esto se complica aún más cuando aparece en escena más de un fármaco, los efectos clínicos indirectos se multiplican...

Dentro del enfoque basado en la diana, encontramos otro tipo de enfoque, el llamado **basado en estructura**: que reúne la habilidad para aplicar el conocimiento químico y molecular a fin de investigar hipótesis específicas con una base molecular. También posee la habilidad para combinar la estrategia biológica y el cribado de pequeñas moléculas. Implica un acortamiento en el proceso de optimización del fármaco primario, y además, se ha estimado que puede llegar a reducir el coste hasta en un 50%. Por el contrario, su desventaja es que el fármaco

resultante, en ocasiones, puede no ser relevante para la patogénesis de la enfermedad y puede no llegar a producir un índice terapéutico considerable. En este tipo de enfoque se suele utilizar el diseño de fármacos asistido por ordenador, que se basa en la estructura cristal de una determinada proteína o complejo. Aún así, el conocimiento inicial de las dianas no conlleva necesariamente una vía fácil de descubrimiento de fármacos; si bien es cierto que, cuando hay éxito, también ayudan a dilucidar el MMOA, que en ocasiones, no se conoce desde el inicio.

➤ **Enfoque fenotípico:**

El enfoque **fenotípico**: es el método clásico y el que se ha estado utilizando durante años. En este tipo de enfoque los compuestos son probados en sistemas celulares con el fin de identificar aquellos que generan un cambio deseado en el fenotipo. Como ventajas, los ensayos no requieren de un conocimiento previo del mecanismo molecular de acción y los fármacos identificados por este método acostumbran a tener un impacto mayor en clínica. Lo cierto es que dada una determinada enfermedad, el enfoque fenotípico suele ser más efectivo que el enfoque basado en estructura; pero también presenta desventajas y es que, optimizar *a posteriori* las características de un determinado *hit* sin conocer los parámetros físicos y sin tener conocimiento del MMOA resulta muy complicado. Además, es un método más costoso que el basado en estructura.

➤ **Otros enfoques:**

En menor medida, también se han identificado fármacos de otras dos maneras:

Por modificación de sustancias naturales: históricamente, la mayoría de fármacos han sido sintetizados partiendo de sustancias naturales, y eso hace que en la actualidad sea uno de los medios de diseño de fármacos más utilizados en la industria. Observando que algunas sustancias naturales causaban efectos sobre alguna dolencia/enfermedad, se buscó explotar estas sustancias conocidas. En ocasiones han proporcionado un interesante punto de partida

para el método fenotípico. Por ejemplo → un fármaco diseñado a partir de sustancias naturales, en este caso, a partir de la melatonina, es “Ramelteon”, que se une al receptor de la melatonina y está indicado para pacientes con insomnio y/o alteraciones del sueño, ya que regula los ritmos circadianos.

La síntesis a partir de sustancias naturales modificadas puede ser de dos tipos:

- Síntesis total: mediante la cuál los productos finales se obtienen a partir de precursores originados por reacciones químicas, sin ayuda de procesos biológicos. Este método está principalmente está destinado para los compuestos que presentan una estructura relativamente sencilla.
- Síntesis parcial: los productos finales se obtienen a partir de sustancias o compuestos que provienen de fuentes naturales, se utiliza para la obtención de moléculas complejas.

Basándonos en su biología: son un tipo de fármacos basados en proteínas que tienen un efecto terapéutico. De aquí surgen ya moléculas de mayor tamaño, que básicamente son copias o versiones optimizadas de proteínas endógenas humanas. Estas se unen a receptores celulares específicos que están asociados con el proceso de la enfermedad a tratar. En los fármacos según biología, los aminoácidos de dicha proteína se van variando de manera sistemática, hasta conseguir que el candidato funcione incluso mejor que su variante natural, por ejemplo, logrando que se una de una manera más eficaz a su molécula diana. Los efectos farmacológicos de estos fármacos biológicos incluyen: reemplazo de la enzima, aumentar las vías de señalización ya existentes, interferir con actividades moleculares o el transporte de otros compuestos o proteínas. Un ejemplo son los anticuerpos monoclonales que reconocen una estructura muy específica de la superficie de la célula. Se han utilizado con éxito en terapia antitumoral: se unen de manera selectiva a los receptores celulares, haciendo posible marcar de manera diferencial las células tumorales de las sanas; de esta manera, las células sanas no son atacadas durante el proceso. Esto hace que la terapia biológica cause menos efectos secundarios que el tratamiento con quimioterapéuticos.

1.2.5. Diseño de Fármacos: Lecciones y direcciones futuras

Para plantear nuevas direcciones en el proceso de diseño de fármacos, resulta útil evaluar el éxito de las estrategias actuales. Los fármacos **primeros en su especie** o *first-in-class*¹⁹ en inglés, son aquellos fármacos que modulan una diana para la cuál todavía no hay precedentes farmacológicos, independientemente del mecanismo de acción. Si echamos un vistazo a cómo se han descubierto, vemos que de los 75 fármacos primeros en su especie que han surgido durante estos últimos 10 años, 50 son pequeñas moléculas y 25 son entidades biológicas. Dentro del primer grupo, dos tercios provienen de ensayos fenotípicos mientras que tan solo un tercio proviene de métodos basados en diana terapéutica (Figura 5). Esto resulta muy sorprendente puesto que durante este mismo periodo, la mayoría de proyectos de descubrimiento de fármaco seguían una aproximación basada en diana terapéutica. Pero las entidades farmacológicas que surgen *a posteriori* (los fármacos siguientes) como una mejora de estas primeras, surgen principalmente, a partir del enfoque basado en estructura. En los fármacos siguientes, la ratio se invierte: mientras el método fenotípico se presenta como punto fuerte, puesto que no hay necesidad de conocer de antemano el MMOA entre fármaco/diana, una vez que aparece un fármaco primero en su especie, este nos ayuda a conocer el MMOA, la diana terapéutica y el sistema en general, abriendo la puerta a la aparición de posteriores y mejorados fármacos que serán diseñados mediante el método basado en diana terapéutica, a menudo haciendo uso de su estructura¹⁸.

Esto parece indicar que, si bien las estrategias basadas en diana terapéutica, y especialmente las basadas en estructura, confieren ventajas significativas, la elección de diana terapéutica sigue siendo problemática. El éxito de los métodos fenotípicos y la diversidad de MMOAs que presentan los fármacos descubiertos por este método sugieren que debemos ser capaces de extender la aproximación racional a sitios no estándar para expandir con éxito las dimensiones del genoma druggable.

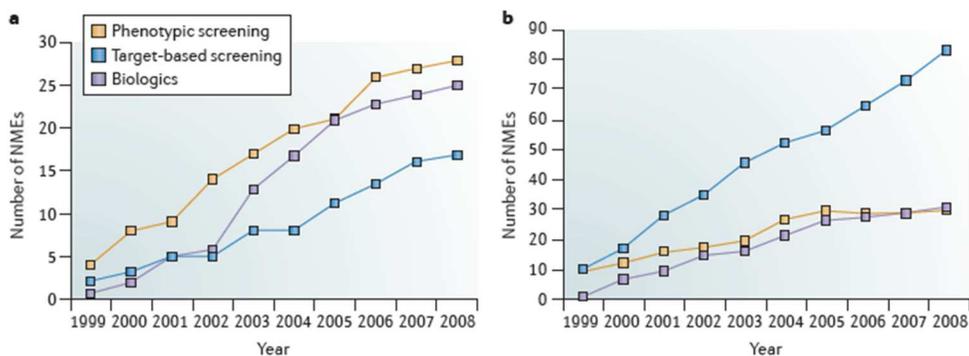


Imagen 4: a) Distribución de los fármacos primeros en su especie. b) Distribución de los fármacos siguientes. Se aprecia un aumento en el número de fármacos diseñados por el método basado en la diana.¹⁸

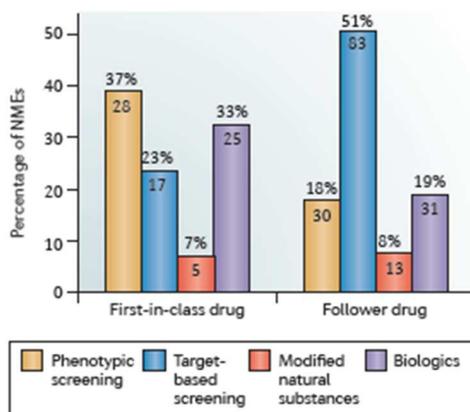


Imagen 5: Este gráfico muestra en porcentaje, las nuevas entidades farmacológicas divididas en dos, los fármacos *primeros en su especie* y los que se han descubierto *'a posteriori'*. Para cada uno de ellos, señala en porcentaje, a través de qué tipo de enfoque se han descubierto.¹⁸

1.3. Aproximación Racional a los Mecanismos de Acción No Estándar.

El propósito de esta tesis es demostrar la capacidad de las aproximaciones racionales para atacar sitios no estándar y para comprender en detalle los mecanismos moleculares implicados en la respuesta biológica. En primer lugar, buscaremos pequeñas moléculas capaces de estabilizar una interacción proteína-proteína particular. En segundo lugar,

estudiaremos la regulación negativa por alosterismo de una proteína tipo, con el objetivo de entender este tipo de fenómeno y hacerlo accesible a aproximaciones racionales.

1.3.1. Modulación de las PPI Mediante Moléculas Tipo Fármaco.

La modulación de las PPI se ha establecido como uno de los retos más difíciles y prometedores en la investigación farmacológica actual²⁰. Si bien, tanto el interés por este tipo de interacciones como el número de moléculas identificadas como reguladoras ha aumentado sustancialmente en estos últimos años, la mayoría de dichos moduladores son inhibidores de las PPI. Aunque la inhibición aparece como un mecanismo más evidente y es el objetivo perseguido en la mayoría de proyectos de descubrimiento de compuestos bioactivos que implican complejos proteína-proteína, en realidad las moléculas tipo fármaco pueden tanto cooperar como competir con dichos complejos, dando lugar a efectos estabilizadores e inhibidores, respectivamente (Figura 6).

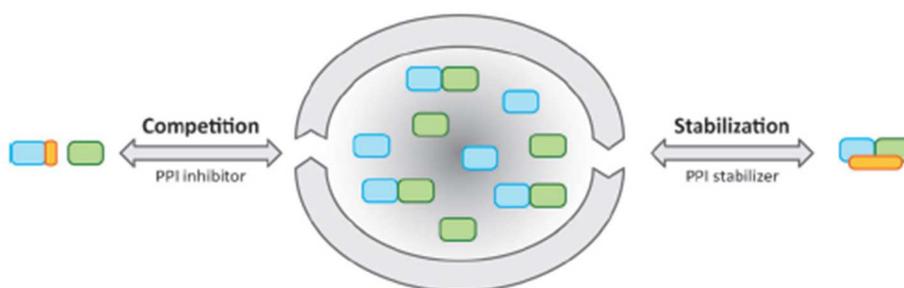


Imagen 6: La imagen muestra el equilibrio entre proteínas monoméricas y multiméricas regulados por los dos tipos mencionados de PPI, inhibidores y estabilizadores²¹.

Los estabilizadores de las interacciones PPI se unen a los bordes de la interfaz entre proteínas de manera no-competitiva y causan este efecto siempre que su afinidad por el complejo sea mayor que por los componentes individuales. Pueden actuar tanto por unión directa al dímero (sin alterar la interface), como por un mecanismo secuencial, en cuyo caso la molécula

estabilizadora se une primeramente a una de las proteínas, creando o modificando la superficie para favorecer la siguiente interacción. A pesar de ser un mecanismo de acción relativamente poco conocido, como veremos a continuación, puede ser muy eficaz, por lo que nos planteamos el reto de abrir este tipo de mecanismo a aproximaciones racionales.

➤ **Inhibidores de la Tubulina:** la tubulina es un componente indispensable del citoesqueleto de la célula eucariota. La dinámica de crecimiento/decrecimiento del microtúbulo, formado por dímeros de tubulina ensamblados, es crucial para la correcta mitosis y el transporte de proteínas durante esta. Por su papel clave en el ciclo celular, los microtúbulos han sido diana de terapias antitumorales desde hace décadas; actualmente existen 42 moléculas, algunas de ellas, naturales o derivados, que se unen a microtúbulos que, o bien han sido aprobadas ya, o bien están en fase clínica (datos del 2012²²). Los agentes que se unen a los microtúbulos se dividen en dos grupos:

- Estabilizadores: se unen al lugar de unión del taxano, y son, derivados del taxano como por ejemplo, paclitaxel (taxol) y docetaxel^{23,24}. Derivados del taxol, que se extrae de la corteza del tejo.
- Desestabilizadores: que se unen al dominio vinca o al dominio colchicina, y son derivados como la colchicina, vinblastina y vincristine. Estos dos últimos, son derivados de la vinca, un arbusto.

El efecto de estos, resulta en un bloqueo de la mitosis y deriva en apoptosis, muerte celular.

➤ **Inhibidores del VIH:** la integrasa del VIH es una de las dianas recientemente validadas para el tratamiento del SIDA. Actualmente están en desarrollo inhibidores de la integrasa de segunda generación, como por ejemplo: elvitegravir, dolutegravir o raltegravir^{25,16}, recientemente aprobado. La integrasa actúa en dos pasos consecutivos: primero activa el DNA viral, y el segundo paso resulta en la inserción del DNA viral en el cromosoma del huésped. Raltegravir se une en la interficie del complejo entre la integrasa-DNA-Mg²⁺, formando un complejo cuaternario e inhibiendo la unión con el DNA huésped. La estructura cristalina del complejo con elvitegravir y dolutegravir revela que también actúan como inhibidores interfaciales.

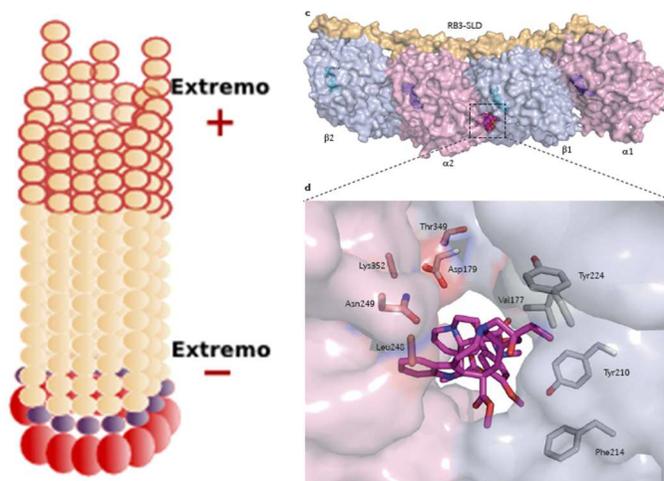


Imagen 7: izquierda: detalle del filamento de microtúbulo, donde se aprecia la *capping* o protección del extremo (-) y el recambio dinámico del extremo (+). **Derecha:** lugar de unión de la Vinblastina, detalle de las interacciones entre Vinblastina y los heterodímeros de tubulina²². Impide la polimerización del microtúbulo.

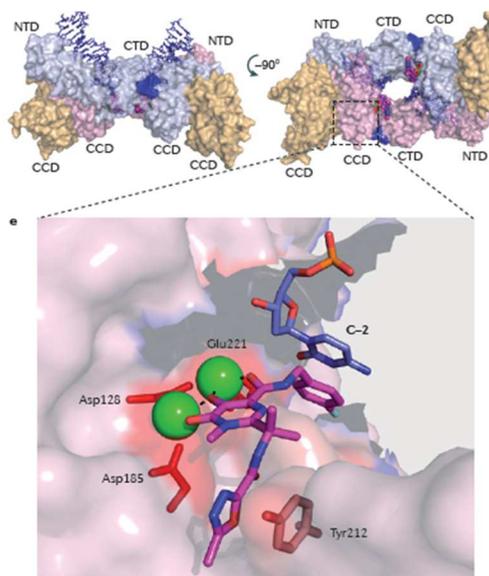


Imagen 8: arriba: representación de la superficie del intasoma que representa el lugar de integración en el DNA huésped, ocupado por dos moléculas de raltegravir. **Abajo** estructura del complejo ternario formado por la integrasa, el DNA y raltegravir¹⁵.

→ Un tipo especial de inhibidores interfaciales son los inhibidores alostéricos. Los inhibidores alostéricos no se unen a la interficie de un complejo, sino que se unen a un lugar distinto del centro activo (ortostérico) y su unión influye en la posterior unión del ligando²⁶. Un ejemplo de inhibidor alostérico es la molécula de nicotina, la cuál se une al receptor neuronal de acetilcolina²² o los fármacos reguladores de PMK2 que hacen aumentar la afinidad de PMK2 por el sustrato²⁰. Es de esperar que los inhibidores alostéricos aumenten en su número en los próximos años, pues receptores de membrana, tirosina quinasas, receptores hormonales y factores de transcripción son buenos candidatos para el diseño de inhibidores alostéricos.

Es cierto que los estabilizadores PPI no son tan populares como los inhibidores, pero parece que empiezan a tomar el relevo que estos segundos empezaron hace diez años atrás. De igual manera que pasaba con los inhibidores, gran parte de los compuestos PPI estabilizadores son de origen natural; son moléculas pequeñas que se unen a los bordes de la interfaz entre proteínas y le confiere unas propiedades exclusivas. Se unen a la diana de manera no-competitiva, de manera que la afinidad no tiene que ser nanomolar para desencadenar un efecto fisiológico potente²⁷.

Por su importancia farmacológica, los ejemplos anteriores son particularmente conocidos. No obstante, estos ligandos explotan sitios interfaciales que unen moléculas orgánicas como parte de su acción biológica. En realidad, puesto que para conseguir un efecto estabilizador no hace falta una gran afinidad de unión, no es necesario que el sitio esté pre-diseñado para unir ligandos. En este sentido, Brefeldina A es un buen antecedente del tipo de efecto que queremos conseguir.

➤ Brefeldina A: es un metabolito fúngico aislado de *Eupenicilium brefeldianum* que inhibe de manera potente, la secreción de proteína a través de la estabilización del complejo formado entre ARF1-GEFs y Sec7²⁸. Esto conlleva el bloqueo de la actividad ARF-GEF y el consiguiente bloqueo de la actividad intercambiadora GDP/GFP²⁹, lo que en última instancia se traduce en el deterioro de la función de Golgi. A pesar de su IC50 modesta, la estabilización entre el complejo ARF-GDP y Sec7 proporciona severos efectos celulares debidos al modo de inhibición no competitiva. La visible fusión entre Golgi y el Retículo Endoplasmático ocurre ya dentro de los pocos minutos después de la administración del

fármaco. Si observamos la estructura cristalina del complejo muestra la molécula de Brefeldina A profundamente enterrada entre las proteínas, dos tercios de la superficie de la molécula establecen contacto con Sec7 y un tercio con ARF1.

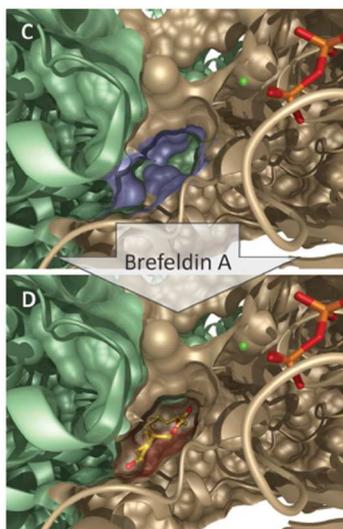


Imagen 9: Arriba vemos en lila, el lugar que ocupa Brefeldina A en la unión entre ARF (marón) y Sec7 (verde)²¹. La unión de BFA a ambas proteínas, es en su mayoría, de naturaleza hidrofóbica, con pocos contactos polares.

1.4. Diseño de Moléculas “PP-glue”.

1.4.1. Introducción

Las **interacciones proteína-proteína** (IPP) forman una enorme y compleja red conocida como *interactoma* la cuál sustancialmente contribuye a la ejecución y regulación de la mayoría de procesos biológicos. Recientemente, se ha estimado el tamaño del interactoma binario humano en alrededor de 130.000 PPIs, de las cuáles, de momento, sólo se han identificado un 8%. El conocimiento creciente sobre este campo confiere un novedoso punto de vista para el desarrollo de terapias alternativas²¹. No es de extrañar que las IPP se erijan como una nueva

familia de dianas. Hasta el momento, se ha puesto especial énfasis en inhibir dichas interacciones, en cambio, lo que nosotros proponemos es identificar compuestos (moléculas *PP-glue*) que estabilicen selectivamente determinadas IPPs, lo cual conferiría ventajas singulares. Este mecanismo requiere que la interfaz que se forma en la IPP presente una cavidad capaz de unir moléculas de tipo fármaco³⁰.

Estas moléculas, actuarían estableciendo interacciones favorables que estabilizarían el complejo, modificando así el comportamiento de este, con la consiguiente implicación en el sistema biológico^{31,32}. Para establecer prueba de concepto, se escogió un sistema modelo mediante un cribado en la base de datos de estructuras tridimensionales de proteínas (PDB, Protein Data Bank), buscando cavidades con potencial capacidad para unir moléculas de tipo fármaco (*druggable*) que se hallasen en la interfaz de complejos heterodiméricos no obligados y cuya superficie estuviese formada en partes aproximadamente iguales por las dos proteínas implicadas. Para ello usamos herramientas computacionales previamente desarrolladas en el grupo. Considerando aspectos prácticos y de viabilidad, se eligió de entre todas ellas, el dímero *CheA/CheY*, un sistema que está implicado en la motilidad bacteriana y sobre el que existe una extensa bibliografía³³.

Para localizar estas moléculas “PP-glue”, se ha realizado un buen número de experimentos con el fin de:

- identificar ligandos específicos de la cavidad interfacial *CheA/CheY*
- caracterizar a nivel biofísico el complejo ternario y las consecuencias de la unión del ligando sobre la constante de equilibrio del dímero
- evaluar las consecuencias funcionales de los ligandos en ensayos bioquímicos a nivel celular.

1.4.2. *CheA/CheY*

1.4.2.1. Selección del sistema *CheA/CheY*

Para seleccionar un sistema tipo con el que probar el método, se cribó el PDB (Protein Data Bank) en busca de un sistema que cumpliera con los requisitos adecuados. Para ello, se utilizó la herramienta *fpocket*³⁴, que se desarrolló en el grupo y que utiliza un algoritmo automático

para la identificación de cavidades. A continuación, se evalúa la druggability de cada cavidad mediante una fórmula que tiene en cuenta distintas propiedades fisicoquímicas de los átomos y los residuos que la definen. Este proceso tarda escasos segundos para cada estructura, lo que permite identificar todas las cavidades druggable en el PDB. Imponiendo como condiciones que las cavidades debían situarse en la interfaz entre heterodímeros, repartiendo su superficie de modo equitativo entre las dos proteínas que lo componen, que el sitio debía estar bien definido (todos los átomos presentes y sin una flexibilidad excesiva) y eliminando además multímeros, proteínas de membrana y complejos con muy alta afinidad de unión (tales como las que implican anticuerpos o toxinas), se obtuvo una lista de pocas decenas de sistemas que se consideraron individualmente. Entre ellos destacó el complejo CheA-CheY por presentar importantes ventajas prácticas: se trata de un sistema bacteriano muy bien caracterizado a nivel bioquímico, estructural y funcional, y su manipulación viene facilitada por tratarse de un sistema de *E.coli*,^{35,36,37} Además, por el hecho de estar implicado en la motilidad bacteriana, sería también posible montar ensayos *in vivo* donde el efecto de los eventuales compuestos pudiesen ser observados a nivel macroscópico.

Teniendo en cuenta que fpocket utiliza una aproximación empírica a la druggability y que sus predicciones pueden no ser válidas para cavidades muy distintas a las usadas para entrenar la función de puntuación, antes de proceder a trabajar con este sistema, se aplicó un segundo método de predicción de druggability, también desarrollado en el equipo de trabajo, al que llamamos MDmix.³⁸ En este método, la proteína en estudio se somete a dinámica molecular en presencia de un solvente mixto acuoso/orgánico. Los sitios por los que las moléculas orgánicas presentan una mayor afinidad (medida en base a su densidad observada) se consideran puntos preferentes de interacción (*binding hot spots*). De acuerdo con esta aproximación, un sitio en el que confluyen varios hot spots se considera que es druggable puesto que una molécula de tipo fármaco podría satisfacer simultáneamente todos estos hot spots i conseguir así una alta afinidad por el receptor.³⁸ El método, además, proporciona información muy valiosa sobre el tipo de grupos químicos que forman interacciones favorables en cada punto (farmacóforo) así como sobre la presencia de aguas estructurales no desplazables³⁸. Esta

información resulta muy útil en el proceso de cribado virtual de ligandos potenciales.

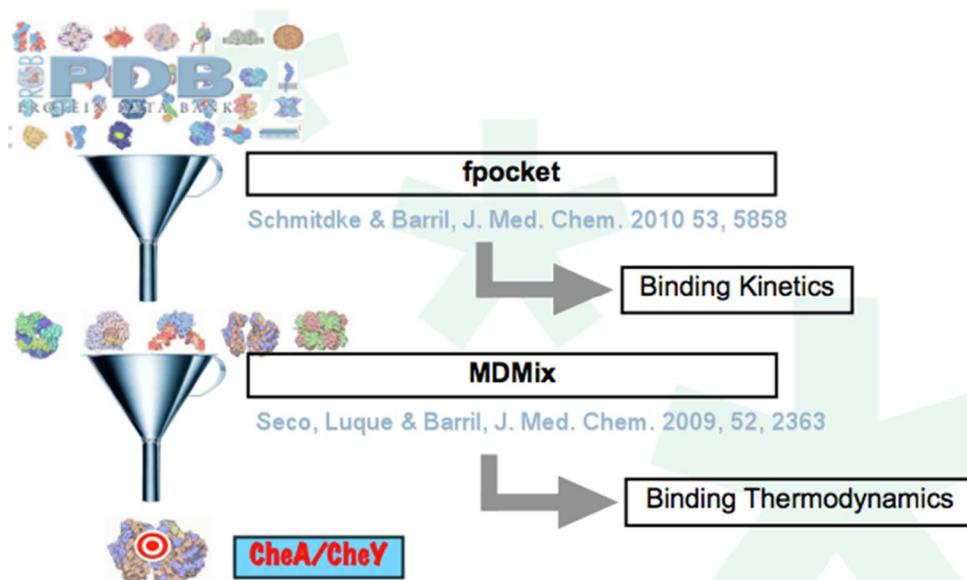


Imagen 10: Esquema de selección del sistema tipo a partir del escaneo del PDB, primero con *fpocket* y después con *MDMix*. Después del cribado, aparece como sistema tipo: CheA/CheY.

1.4.2.2. Quimiotaxis

La interacción entre las proteínas CheA y CheY es parte fundamental del sistema que regula la quimiotaxis. La **quimiotaxis**^{39,40} es el fenómeno por el cuál la bacteria dirige sus movimientos en base a la presencia de ciertos compuestos químicos en el entorno^{35,36,37}.. Es importante para la bacteria encontrar nutrientes en el entorno así, en presencia de un atrayente ⁴¹, la se dirigirá hacia la zona de mayor concentración de este; de igual manera, en presencia de un repelente, su movimiento será direccionado para alejarse de él. En el primer caso, la quimiotaxis se denomina “positiva”, puesto que el movimiento es hacia una concentración mayor, y en el segundo caso es “negativo” puesto que la bacteria se mueve para alejarse y dirigirse a la zona de menor concentración del repelente^{42,43,44,45}. En ausencia de estímulos, sin atrayentes ni repelentes en el medio, o bien, con una concentración constante y uniforme de estos, *E.coli* presenta un patrón de movimiento (motilidad^{46,47}), puesto que es una bacteria que posee flagelos, y este movimiento es bien conocido: la bacteria nada en el medio de manera suave dibujando una línea recta durante unos segundos, lo que se llama “run”, seguido de un

giro o “tumble” durante una fracción de segundo, al que le sigue un abrupto cambio de dirección. Después vuelve a nadar en línea recta, la nueva dirección elegida al azar⁴⁸. En contraposición, cuando una bacteria detecta la presencia de atrayente en el medio, realiza giros con una frecuencia mucho menor; y al revés, realizan un mayor número de giros en el tiempo, cuando la concentración de atrayente es menor. Lo opuesto, también es cierto: en presencia de un repelente, la bacteria gira más frecuentemente al encontrarse con concentraciones mayores de este, y a la que disminuye la concentración del repelente, los giros cesan.

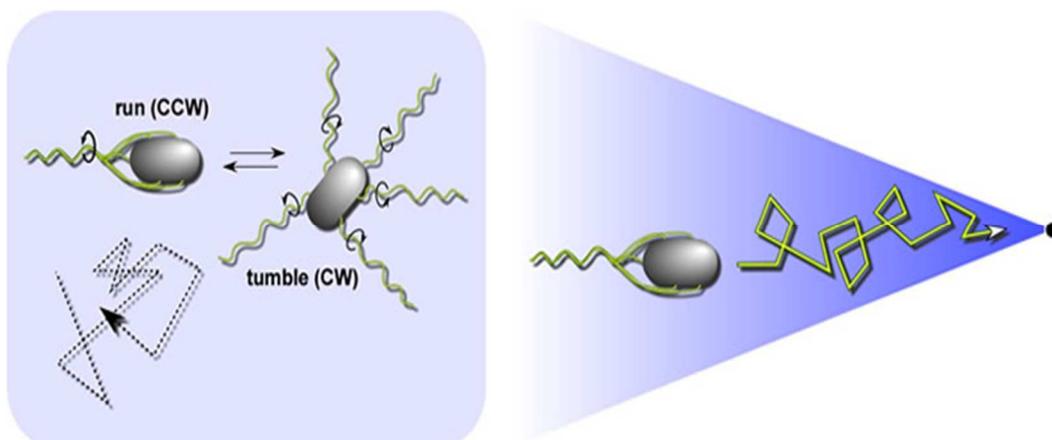


Imagen 11: Esquema de los dos movimientos bacterianos: aleatorio y dirigido. En la **izquierda**: movimiento aleatorio, cuando los motores de los flagelos rotan CW (en el sentido de las agujas del reloj). Cuando uno o más flagelos inicia el movimiento CCW (en el sentido opuesto de las agujas del reloj), y se para el movimiento aleatorio para iniciar el movimiento dirigido. En la **derecha**: movimiento dirigido por el inicio de un gradiente químico⁴⁹.

Los atrayentes pueden ser azúcares y aminoácidos; y los repelentes, ácidos grasos, alcoholes e iones metálicos. Puesto que los repelentes son detectados por la bacteria a concentraciones muy inferiores de las que serían dañinas para esta, se cree que el valor de supervivencia de la quimiotaxis reside en dirigir a la bacteria hacia entornos nutritivos, y alejarse así, de medios nocivos^{48,50}.

Pero, ¿cómo se inicia esta señal a nivel molecular? En la membrana bacteriana se localizan diferentes tipos de receptores llamados MCPs (proteínas metil-aceptoras quimiotácticas)^{51,52}, la familia de estos receptores MCPs, en *Escherichia coli*, utilizan todo un set de proteínas señalizadoras para controlar la rotación flagelar y la adaptación sensorial. Hay tres tipos de MCPs, para atractantes, para repelentes y para proteínas periplasmáticas; estas transmiten la señal en el citosol, reaccionando, con CheW y CheA para formar complejos ternarios los cuáles generarán señales que se transmitirán a CheY, CheZ, CheR y CheB. Esta vía de señalización quimiotáctica en *E.coli* es reversible por fosforilación^{53,54,37}.

En presencia de un repelente en el entorno: este es captado por los receptores de membrana (MCPs), que reclutan a CheA, esta dimeriza y se autofosforila activándose; una vez activa, pasará este fosfato a CheY, CheY-P se dirige a la base del flagelo para interaccionar con las proteínas del sistema motor (FliG, FliM, FliN). La ratio CheY-P/CheY es la que determina que la rotación del flagelo sea en un sentido o en otro^{55,56,57,58}, en este caso, cuando aumenta la cantidad de CheY fosforilada se activa el movimiento del flagelo en el sentido de las agujas del reloj (CW), lo que según hemos visto, aumenta la frecuencia de giros (tumbles) y al final se consigue que la bacteria se dirija en dirección opuesta al repelente. La presencia de un attractante en el entorno, en última instancia, hace que la cantidad de CheY sea mayor que la de CheY-P, los runs son más largos y la bacteria se mueve así, en dirección hacia el attractante. Para que se pueda producir la transferencia del grupo fosfato, CheA tiene que formar un complejo transitorio con CheY. Por tanto, la afinidad tiene que ser relativamente baja (valores cercanos a 1 μ M, según datos publicados⁵⁹) y una sobreestabilización del dímero causaría una modificación en la transmisión de señal, por lo cual esperamos que los eventuales ligandos interfaciales modifiquen la motilidad de las células. Es interesante resaltar que el sistema regular de la quimiotaxis es un paradigma de la biología de sistemas, puesto que se conocen todos los componentes y el modo en que interaccionan entre sí, de modo que se pueden prever las consecuencias funcionales de una alteración concreta del sistema^{35,60,61,62,63}.

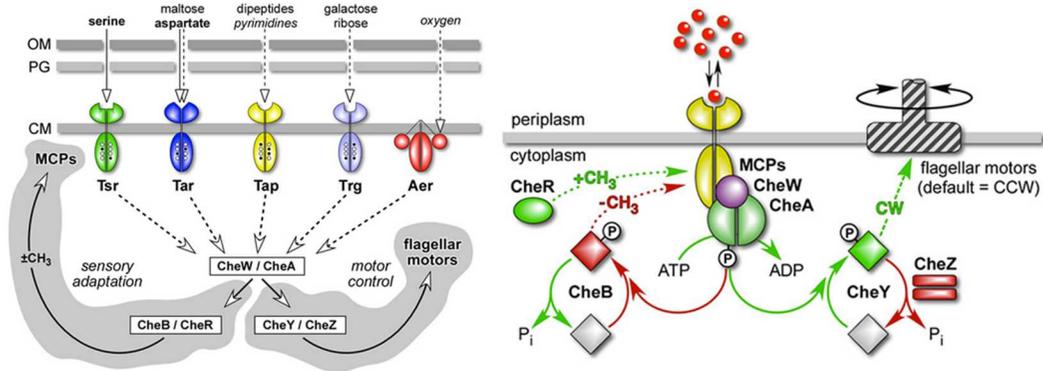


Imagen 12: A la izquierda: componentes de señalización y circuito: los receptores *E.coli* emplean un set de proteínas señalizadoras citoplasmáticas llamadas CheW y CheA que interaccionan con moléculas receptoras para formar un complejo ternario estable que genera señales. CheY transmite esas señales hacia los motores flagelares. A la derecha: regulación reversible por fosforilación: los motores flagelares de *E.coli* giran por defecto CCW, la cascada de señalización puede modificar los niveles de CheY fosforilada y con esto, la señal para iniciar el movimiento CW. Cuando aumentan los componentes marcados en verde, se da la rotación CW, mientras que, cuando los que aumentan son los que están en rojo, se da la rotación CCW. (Images from: [Parkinson Lab](#))^{49,64,59}

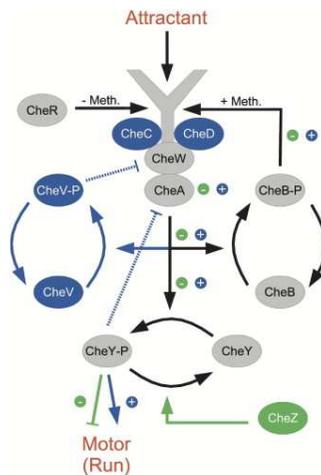


Imagen 13: La imagen detalla la cascada de señalización que tiene lugar desde que aparece un atrayente o repelente en el medio, hasta que esto hace variar la proporción de CheY fosforilada, y según la concentración de esta, se activa el movimiento flagelar en un sentido u otro⁴¹.

1.4.3. Trabajo Computacional Previo con CheA/CheY.

En el grupo se llevó a cabo un trabajo computacional previo, en base a la estructura ya conocida del dímero CheY/CheA·P2, que tiene como código PDB: 1A00³⁶.

- Primeramente, a través de las simulaciones MDmix descritas más arriba, se delimitó el tamaño de la cavidad y se identificaron puntos de interacción particularmente importantes (hot spots o puntos farmacofóricos).
- Se preparó el sistema para poder realizar cálculos de Docking molecular con rDock, incluyendo como sitio de unión (receptor) la cavidad definida previamente e introduciendo restricciones farmacofóricas para obligar a los posibles ligandos a satisfacer las interacciones más importantes, según predicciones de MDmix.
- Una vez se definió el sistema, se seleccionaron los compuestos con los que realizar el Docking. En el grupo tenemos una base de datos formada por alrededor de 7 millones de compuestos comerciales disponibles. Después de aplicar los pertinentes filtros de druggability, limitándonos a un conjunto de inco proveedores preferidos (por criterio de precio y fiabilidad), acotamos la búsqueda en poco más de un millón de compuestos, que tienen propiedades *drug-like*.
- Posteriormente, una vez tenemos el sistema definido por un lado, y los ligandos en la otra, llevamos a cabo un cribado virtual para optimizar identificar potenciales ligandos. El protocolo fue optimizado para obtener al final, alrededor de un 5% de compuestos del input de 1.2millones. De aquí resultaron 64.000 compuestos.
- Estos se agruparon por clases, se eliminaron los redundantes, y mediante un proceso de selección visual, se seleccionaron un total de 68 compuestos iniciales 'tipo'.

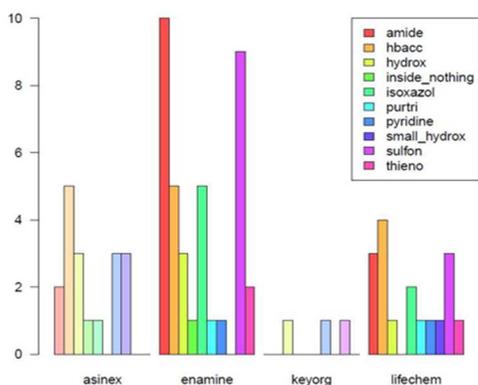


Imagen 14: Este gráfico detalla los compuestos que se seleccionaron, por grupos, y por casas comerciales.

1.5. Estudio de la Regulación por Alostерismo.

1.5.1 Introducción.

Otro tipo de dianas terapéuticas a explotar serían los **centros alostéricos**. Los enzimas alostéricos son aquellos que cambian su conformación al unirse un efector.

En la **regulación alostérica**, la actividad enzimática de una proteína está regulada por la unión de una molécula efectora en el llamado “centro alostérico”, siendo éste diferente del centro catalítico de la enzima y con la propiedad de modificar las condiciones de unión de otra molécula en dicho centro catalítico, sin importar cuánto disten entre sí estas regiones^{65,66,67}. La unión de este efector modifica la estructura 3D de la enzima y llega a afectar la configuración del centro activo. Es por esto, que los centros alostéricos pueden ser buenas dianas terapéuticas, ya que son regiones capaces de ser tratables por moléculas tipo fármaco y presentan ventajas importantes tales como: modulación no competitiva, posibilidad tanto de activar como inhibir o mayor selectividad, puesto que los sitios alostéricos no suelen estar conservados entre proteínas de la misma familia. Un posible resultado de esta interacción, es que la unión del sustrato resulte cooperativa, es decir, que la unión de un determinado fármaco en el centro alostérico facilite la unión de otros sustratos en el centro activo de la misma proteína, como por ejemplo: las estatinas⁶⁸. Sin embargo, otros fármacos actúan uniéndose al centro alostérico de las enzimas, impidiendo la unión de sustratos, como por ejemplo: los inhibidores de la transcriptasa inversa^{26,69}. En los últimos años, los inhibidores alostéricos están en auge: recientemente se han desarrollado con éxito inhibidores para IGFs⁷⁰, tirosinas-quinásas^{71,72}, y proteínas implicadas en la tumorigénesis como por ejemplo mTOR⁷³.

En nuestro caso, planteamos que no es solamente importante identificar potenciales sitios de unión de moléculas tipo fármaco, sino también anticipar cómo la unión de un ligando va a afectar a la proteína y predecir qué consecuencias va a tener sobre la actividad enzimática.⁷⁴ La transmisión de efectos entre dos sitios distantes en una proteína viene mediada por sutiles modificaciones estructurales y dinámicas de la matriz proteica que a menudo resultan difíciles

de vislumbrar. Por esta razón, actualmente no es posible predecir cuales van a ser las consecuencias de la unión de un ligando en un sitio alostérico sobre la actividad de una enzima. Sin embargo, la regulación por modificaciones posttraduccionales en sitios alostéricos, es un mecanismo ampliamente utilizado y bien documentado en los sistemas biológicos. Es por ello que abordamos el estudio del mecanismo de regulación alostérico de HDAC8, para evaluar la eficacia de las herramientas computacionales existentes y como paso previo al estudio de regulación alostérica en complejos ligando-proteína.

1.5.2. HDAC8

1.5.2.1. Organización del DNA (en la célula eucariota)

Para la correcta distribución del material genético a las células hijas durante la mitosis y la meiosis, este material genético debe estar condensado, de manera que la cromatina se supercompacta, así, el material genético será más fácilmente manejable y segregable. El mecanismo de supercompactación de la cromatina en los eucariotas se basa en enrollar el DNA alrededor de unos “core” proteícos durante la Metafase. Estos “core” proteícos se denominan **nucleosomas** y están constituidos por **histonas** y el DNA asociado a ellas.

1.5.2.2. Las Histonas

Las histonas son un grupo de proteínas básicas ricas en arginina y lisina. Están especialmente bien adaptadas a la unión con el DNA, ya que este está cargado negativamente. Hay cinco tipos de histonas: H1, H2A, H2B, H3 y H4. La histona H1 es esencial en el empaquetamiento de estructuras de orden superior, ya que forma parte tanto del nucleosoma como del espacio entre nucleosomas que constituye la región de enlace. La doble hélice de DNA se enrolla al exterior del octámero de histonas (de la H2 a la H4) a razón de 145 pares de bases por nucleosoma y dando 1,65 vueltas. Forman el primer nivel de empaquetamiento del DNA: reducen la longitud y permiten el enrollamiento y la compactación de la hebra de DNA más

eficazmente. El paso siguiente de la supercompactación es pasar de la formación en collar de perlas, al solenoide y en el último punto de la condensación de la cromatina tenemos al cromosoma metafásico, que encierra el nivel máximo de compactación del DNA.

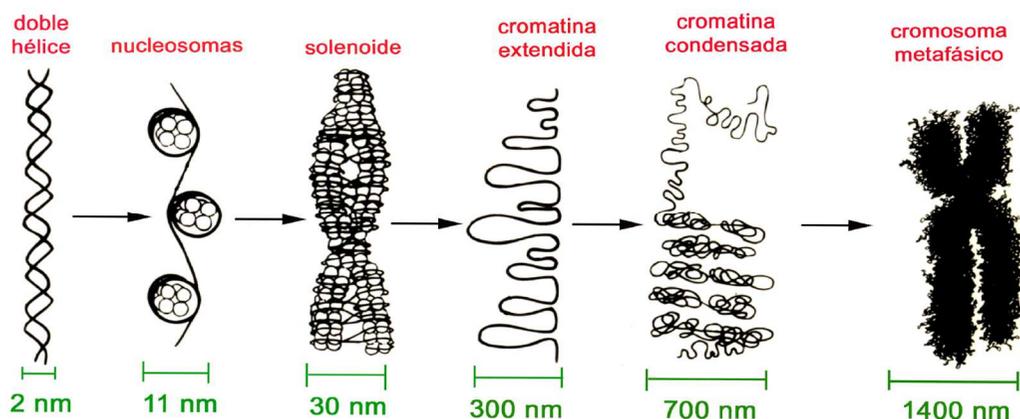


Imagen 15: Esquema de los distintos niveles de **empaquetamiento del DNA** hasta formar el cromosoma. La fibra de 2nm de DNA envuelve un octámero de histonas para construir el nucleosoma. Estos forman filamentos de 11nm que se empaquetan para formar la fibra de cromatina de 30nm. El siguiente nivel de empaquetamiento es ya la fibra condensada de cromosoma (700nm) y el propio cromosoma (1.400nm).

1.5.2.3. Moduladores de la Cromatina.

El empaquetamiento del genoma eucariótico en la cromatina tiene gran influencia en la transcripción génica. La regulación de la expresión génica requiere de factores de transcripción que, unidos en las secuencias reguladoras, inician una cascada de modificaciones que resultan en la expresión o el silenciamiento de un gen. Algunas modificaciones de la cromatina se han asociado a la activación y otras a la represión génica. Aquí es donde entran en juego las colas de las histonas⁷⁵. Estas colas son largas y no tienen estructura secundaria. Por ejemplo: las colas de las histonas H3 y H2B se proyectan hacia el exterior del nucleosoma,

y una de las colas protuberantes de la H4 llega a hacer numerosos contactos con el dímero H2A-H2B del nucleosoma vecino.

Según postula, la teoría del “código de Histonas”, acuñado en 1.933 por Todera, Sendra y Perez-Ortin⁷⁶, las modificaciones sobre las colas amino-terminales de las histonas pueden tener consecuencias en cuanto a la facilidad con la que proteínas asociadas a la cromatina podrían acceder al DNA; en cierta manera, estas modificaciones actuarían como marcas o señales de reconocimiento para proteínas reguladoras, y las distintas formas modificadas serían relevantes para la regulación génica. Estas modificaciones podrían extender la información potencial del material genético, es lo que llamamos **epigenética**.

Entre las principales modificaciones post-traduccionales que se realizan de manera covalente en las colas de las histonas, podemos encontrar:

- Metilaciones: las modificaciones post-traduccionales por metilación tienen lugar en el nitrógeno en las cadenas laterales de lisinas y argininas. Hay ocasiones en las que un gen precisa ser inactivado de manera permanente, para ello se recurre a la metilación. Las lisinas pueden aceptar uno, dos y hasta tres grupos metilo, y los diferentes estados de metilación de un residuo darán lugar a diferentes respuestas, activadoras o represoras, según el lugar en el que se den.
- Fosforilaciones: la fosforilación es la adición de un grupo fosfato a una molécula. Estudios recientes, vieron que cuando las histonas H1 son modificadas por la adición de un grupo fosfato, esta modificación se asocia a cambios en la actividad genética en las inmediaciones de la histona fosforilada. En general, asociado a los genes que están siendo transferidos.
- Ubiquitinizaciones: la ubiquitinización en H2 está asociada a la activación de genes.
- Acetilaciones, siendo la más estudiada hasta la fecha y la que nos interesa, ahora. La acetilación consiste en la introducción de un grupo acetilo, habitualmente en los residuos de lisina de las colas. Los residuos de lisina de las histonas son acetilados y desacetilados en el extremo N-terminal como parte del proceso de regulación génica. Estas reacciones suelen ser catalizadas por enzimas como HAT o HDAC (acetilasa/desacetilasa).

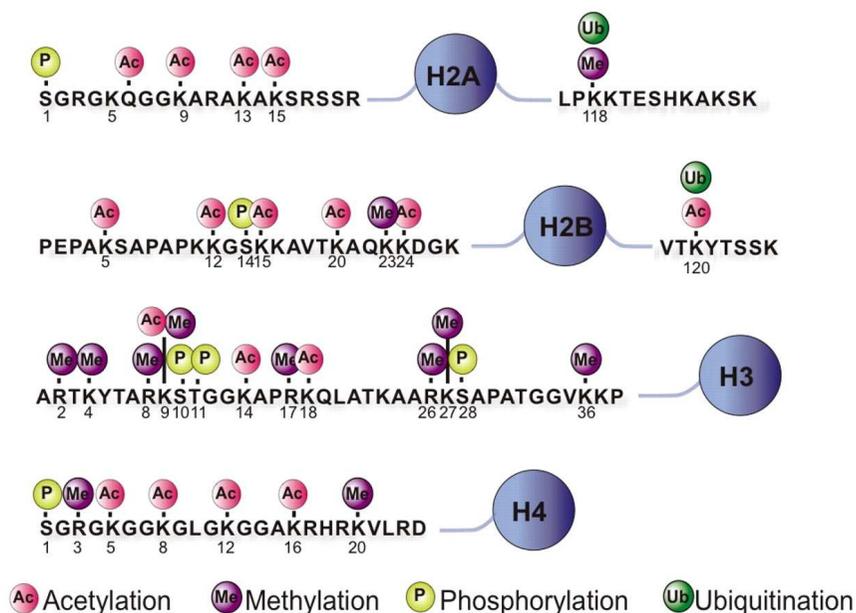


Imagen 16: La imagen muestra las diferentes colas de las histonas, y las diferentes modificaciones post-traduccionales que estas pueden albergar: en rosa, acetilaciones; en lila, metilaciones; en amarillo, fosforilaciones; en verde, ubiquitinizaciones. *Emergence of the osteo-epigenome in bone biology. Nature, IBMS BoneKEy Kato, S, et.al, 2010.*

1.5.2.4. Desacetilasas de Histonas (HDACs)

Como hemos visto, durante la recombinación, la replicación y la transcripción, la estructura de la cromatina cambia y las histonas colaboran de manera temporal con las proteínas heterogéneas que también forman parte de la cromatina y que las modulan estructuralmente. Distintos factores de transcripción facilitan estos cambios estructurales en las histonas que permiten la activación/represión génica. Por ejemplo: un aumento en la **acetilación** de las colas de las histonas se asocia con una cromatina más descondensada (eucromatina), con la consiguiente accesibilidad del DNA y con una transcripción activa, mientras que una baja tasa de acetilación (**desacetilación**), promueve la compactación de la cromatina y por tanto, la

represión génica. Entre las proteínas que promueven la desacetilación, se encuentran las acetiltransferasas y las desacetilasas⁷⁵.

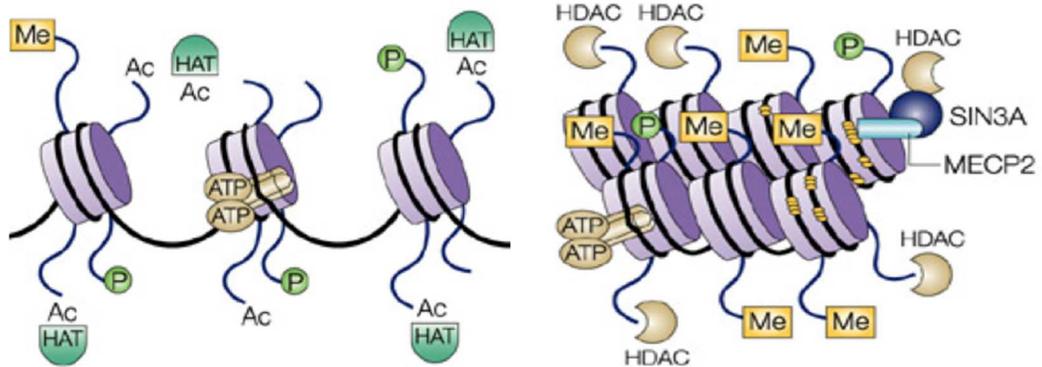


Imagen 17: En la izquierda de la imagen, vemos la cromatina transcripcionalmente activa, la cuál está más desplegada y presenta acetilaciones llevadas a cabo mediante HAT. Por el contrario, en la derecha, vemos la cromatina transcripcionalmente inactiva, después de la llegada de proteínas como HDACs, la cromatina se presenta más condensada, lo que inactiva la transcripción.

Hay varias familias de **Desacetilasas de Histonas** en mamíferos:

- **Clase I:** HDAC 1, 2, 3 y 8. Son la clase de HDAC más conocidas, son ubicuas y presentan localización nuclear. Tienen una elevada homología estructural y contienen zinc en el sitio activo, el cuál es esencial para su actividad. Tienen el dominio desacetilasa en el C-terminal⁷⁷.
- **Clase II:** HDAC 4,5,6,7,9 y 10. Entran y salen del núcleo según las señales. Tienen el dominio desacetilasa en el N-terminal.
- **Clase IV:** HDAC 11. Las HDACs de Clase IV reúnen las características de las HDACs de clase I y de las de clase II. Están relacionadas con enzimas dependientes de Zn^{2+} .
- **Clase III:** o también llamadas Sirtuinas: son una clase de enzimas que se encuentran en procariontes como en eucariotes. Afectan al metabolismo celular regulando la expresión de ciertos genes. Su nombre proviene de *Silent mating type information Regulation two*.

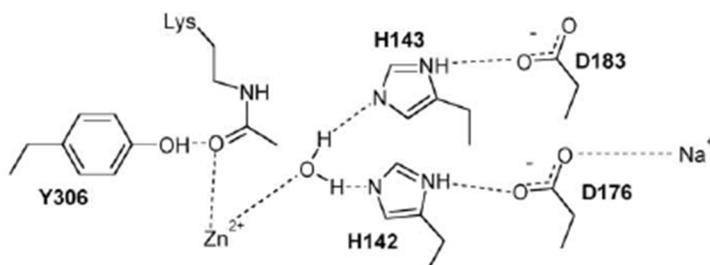


Imagen 18: Diagrama esquemático que muestra el modelo propuesto para la reacción catalítica de HDAC8.

Dada la dificultad en obtener información estructural de las HDACs, se han investigado proteínas homologas en organismos procariontas. Así, la primera estructura del core catalítico desacetilasa que se resolvió fue la de HDLP (Histone Deacetylase like-protein), de *Aquifex aeolicus*. Años después se resolvió la estructura de HDAC8 y muy recientemente la de HDAC2. La tabla siguiente muestra las similitudes de secuencia entre las diferentes HDAC y HDLP. La figura 4 muestra las tres estructuras superimpuestas. Como se puede observar, las distintas HDACs muestran una gran similitud tanto a nivel de secuencia como de estructura. No obstante, es poco lo que se sabe todavía sobre su comportamiento dinámico y su especificidad de sustrato. Por ello es que se han realizado estudios de dinámica molecular que puedan aportar algo de luz sobre su función y regulación. Se escogió HDAC8 como modelo de las HDAC de Clase I, por disponer de estructura cristalográfica y para intentar esclarecer el mecanismo de regulación post-traduccional ⁷⁸.

| | | Class-I | | | | Class-II | | | | | | |
|-------|-------|---------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| | HDAC8 | HDLP | HDAC1 | HDAC2 | HDAC3 | HDAC4 | HDAC5 | HDAC6 | HDAC7 | HDAC9 | HDAC10 | HDAC11 |
| HDAC8 | | | 43/66 | 43/66 | 43/64 | 27/46 | 26/46 | 28/46 | 34/48 | 25/46 | 26/45 | 25/40 |
| HDLP | 34/55 | | 36/54 | 35/53 | 35/51 | 29/44 | 27/43 | 28/47 | 27/43 | 28/45 | 27/48 | 24/43 |

Imagen 19: Arriba: Detalle de la tabla de similitudes, que compara HDAC8 y HDLP con todas las desacetilasas de histonas, de Clase I y de Clase II.

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|--|--|----|
| | | | 39 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| HDAC8 | K | R | A | S | M | V | H | S | L | I | E | A | Y | A | L | | | | 50 |
| HDLP | P | R | V | S | L | L | L | R | F | K | D | A | M | N | L | | | | 40 |
| HDAC1 | H | R | I | R | M | T | H | N | L | L | L | N | Y | G | L | | | | 47 |
| HDAC2 | H | R | I | R | M | T | H | N | L | L | L | N | Y | G | L | | | | 42 |
| HDAC3 | H | R | L | A | L | T | H | S | L | V | L | H | Y | G | L | | | | 41 |

Imagen 20: Alineamiento de secuencias entre HDAC8, HDLP y otras HDACs donde se muestra la secuencia entorno la Ser39 de HDAC8. Tabla publicada por Finnin et.al.

1.5.2.6. Desacetilasa de Histonas 8 (HDAC8)

La desacetilasa de histonas 8 (**HDAC8**)⁷⁸, pertenece a la clase I de las HDACs y como el resto, son un tipo de enzimas que están implicadas en la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina en el N-terminal de las histonas del core, silenciando así la transcripción génica. Sin embargo, HDAC8 se diferencia un poco de las desacetilasas de su clase, y es que a HDAC8 no sólo la fosforila PKC2, sino que PKA también la puede fosforilar regulándola así negativamente, según un estudio del 2004 de Lee, et.al. Sin embargo, *in vitro*, sólo PKA fosforila a HDAC8⁷⁹.

HDAC8 forma un complejo represor transcripcional, asociándose con diferentes proteínas y juega un papel muy importante en la regulación transcripcional y la progresión del ciclo celular. Y aquí reside la importancia de HDAC8, por su capacidad de regular la expresión génica. Recientemente se ha visto que está implicada en enfermedades, como por ejemplo la Leucemia Mieloide Aguda, la proliferación de tumores derivados de células T o la tumorigénesis del neuroblastoma^{80,81}.

Debido a la importancia que las HDACs tienen en la regulación del ciclo celular, son una diana ideal para tratar en diferentes tipos de tumores. Dos inhibidores de HDACs han sido aprobados recientemente como tratamiento para diferentes tumores y enfermedades neurodegenerativas, el SAHA y el ácido valproico^{82,80}. Además, se ha observado que inhibidores de HDACs, inhiben acetilaciones y reactivan genes suprimidos, también tienen

efectos celulares pleiotrópicos que inhiben el crecimiento de células tumorales y su supervivencia.

1.5.3. Regulación Alostérica.

La regulación de HDAC8 está mediada de manera post-traducciona por PKA: inhibe a HDAC8 de manera reversible por fosforilación en Ser39, una posición lejana al centro catalítico, como se observa en la estructura 3D descrita por Vannini y su equipo, y Somoza^{83,84}. Se sabe que esta Ser39, está localizada en un alfa hélice en el N-terminal, y está rodeada de residuos polares y se espera que cuando un fosfato entre en el entorno, cree una disrupción estructural a nivel local que se propague por la matriz proteica causando de este modo una disminución de su actividad enzimática. Se sabe que la mutación de Ser39 por Alanina aumenta la actividad desacetilasa de HDAC8, en contraste con la mutación por Glutamico, que disminuye la actividad enzimática. Estructuralmente queda patente que Ser39 es un centro alostérico en HDAC8 y la fosforilación controla la actividad enzimática de HDAC8.

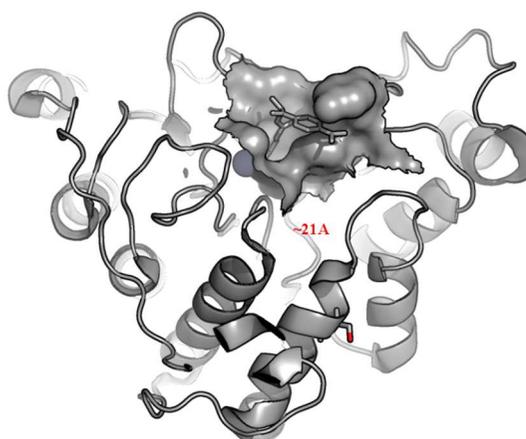


Figura 21: Estructura cristal de HDAC8 (PDBcode: IT64) mostrando la distancia espacial entre el centro catalítico y la Ser39 (lugar de unión del fosfato).

1.5.4. Estudio Computacional Previo.

Con la idea de dilucidar la funcionalidad y la regulación alostérica de HDAC8 tras su fosforilación, compañeros del grupo realizaron dinámicas moleculares sobre HDAC8 con y sin fosforilación en el residuo Ser39, a fin de mejorar nuestro conocimiento de las funciones y regulación de otras HDACs a través del estudio molecular de HDAC8, puesto que es la primera estructura de las desacetilasas de Clase I que ha sido cristalizada⁸³. Una vez realizadas las dinámicas de las formas con y sin fosforilar, desarrollamos un estudio mutacional dual, que será computacional y experimental sobre HDAC8 que nos ayudará desde dos puntos de vista:

- A entender y establecer nuestra hipótesis de propagación del alosterismo, que envuelve el loop distante en la actividad desacetilasa y la inhibición de actividad tras la fosforilación.
- Investigar y confirmar el alosterismo propuesto, activado tras la fosforilación y la vía para propagar el alosterismo por la HDAC8 fosforilada.

Para explorar la vía alostérica, comparamos las diferentes preferencias conformacionales de HDAC8 wt con su forma fosforilada. Los resultados obtenidos reflejan que la transmisión alostérica es una perturbación a efecto global; se observa que en la estructura de HDAC8 humana hay un loop distante a Ser39, llamado K-F loop, el cuál se abre, alejándose del core, en la forma no fosforilada, mientras que en presencia del fosfato, dicho loop permanece cerrado. Cuando el loop permanece cerrado concuerda con una menor actividad desacetilasa, esto sería debido a que la fosforilación causa una menor flexibilidad estructural de HDAC8 dificultando la entrada del sustrato.

Las premisas iniciales del trabajo eran estudiar el alosterismo en HDAC8 y proteínas relacionadas, utilizando Dinámica Molecular para observar si hay diferencias en el comportamiento que la proteína adopta en función de su estado de activación: fosforilada (inactiva) y desfosforilada (activa). Dichos estudios han permitido generar una hipótesis sobre el mecanismo de control de la actividad, que se describen a continuación:

- La fosforilación sobre el residuo Ser39 tiene un doble efecto: proximal y distal.
- El efecto proximal se debe a un desplazamiento de la helice X, a resultas de la cual Arg37 se desplaza y ocupa la cavidad interna del centro activo, impidiendo la salida del grupo acetilo como resultado de la reacción enzimática.

- En su forma activa (desfosforilada), los loops que circundan el sitio de unión a sustrato se abren, facilitando el reconocimiento molecular HDAC-péptido.
- En la forma inactiva (fosforilada), los loops permanecen cerrados y el reconocimiento molecular sería menos efectivo (efecto alostérico distal).
- El efecto alostérico distal está mediado por:
 - a) repulsión entre el grupo fosfato de Ser39 y Asp29 y Glu335 de los loops 20-48 y 330-345 respectivamente
 - b) incremento de movilidad de Phe336
 - c) desplazamiento del loop 346-356
 - d) modificación del patrón de interacción del triple Arg353-Asp233-Lys202; y, finalmente, repulsión entre Lys202 y Phe207, lo que conllevaría la apertura del loop 202-212.

Partimos de estos resultados, y montamos los experimentos pertinentes para dilucidar si la vía de propagación alostérica de regulación negativa con la llegada del fosfato, es la predicha. El objetivo del estudio que aquí se presenta es el de verificar dichas hipótesis, particularmente la que se refiere al mecanismo alostérico distal. Para ello se introducirán varias mutaciones diseñadas racionalmente y se evaluará si modifican la actividad y/o regulación de HDAC8. Las mutaciones elegidas son las siguientes:

- F207A y K202M, situadas ambas en el K-F loop. Estas mutaciones están destinadas a estudiar la función del K-F loop en la actividad desacetilasa.
- El mutante 202, donde Lisina fue mutado a Metionina para añadir estabilidad, con la idea de contribuir a una interacción hidrofóbica más favorable entre Metionina y F207. Esto debería añadir rigidez al K-F loop, lo que se traduciría en una menor actividad.
- Por el contrario, la mutación en el residuo 207, de Fenilalanina a Alanina, debería disminuir la barrera hidrofóbica y facilitar así la apertura del loop, lo que daría igual o mayor actividad que la Wt.

- D233A y R353A que interaccionan con el loop en K202M. Estas dos mutaciones están destinadas a estudiar la propagación de la regulación alostérica en HDAC8.
- El mutante 233, de Aspártico a Alanina nos servirá para probar si la fosforilación puede tener un efecto en la dinámica del K-F loop. La mutación D233A tiene un efecto directo en la flexibilidad del loop.
- El mutante 353 en el cambio de Arginina a Alanina, se pretende mantener la actividad catalítica. Esta mutación deja un espacio disponible para que D233 se mueva de manera libre en la forma fosforilada, para que tenga un comportamiento similar a Wt.

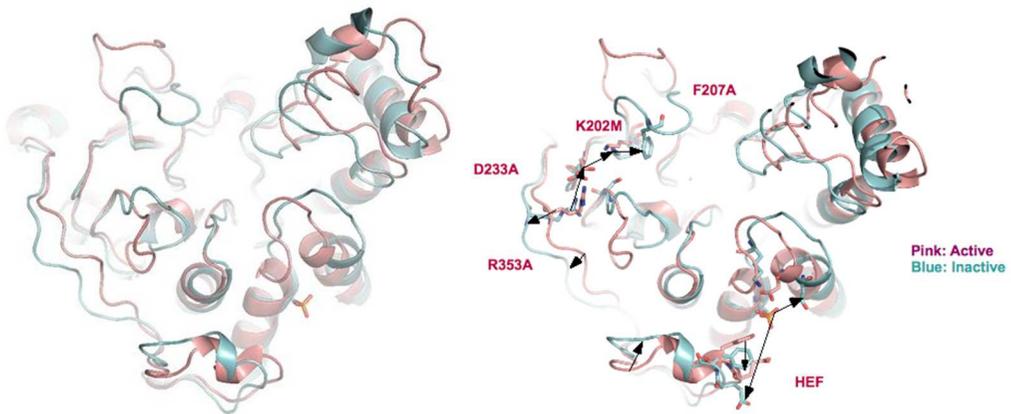


Imagen 22: Izquierda: Comparación de la conformación final de HDAC8 activa (desfosforilada; en rosa) e inactiva (fosforilada, en azul). Derecha: Mecanismo propuesto de transmisión alostérica. También aquí localizadas las diferentes mutaciones efectuadas sobre HDAC8.

A través de simulaciones de Metadinámica se obtuvieron las barreras energéticas requeridas para abrir el loop en las formas mutadas y fosforiladas o no. Los resultados computacionales muestran que:

- Ambas formas de K202M son inactivas, tanto la fosforilada como la no fosforilada. Eso es porque el mutante K202M no puede establecer unión con F207 y R353 el loop es inestable.
- El mutante F207A es menos activo que el Wt en su forma no fosforilada, pero la forma fosforilada es más activo que la forma Wt también fosforilada. Esto puede ser atribuido a que, para ser catalíticamente activo el K-F loop necesita ser reorganizado

alrededor del sustrato, y si F207A no puede formar el enlace estabilizador, el loop es menos estable.

- El mutante D233A tiene más actividad desacetilasa que su forma Wt. El cambio por un residuo más pequeño, deja espacio para que 233 se mueva libremente en la forma fosforilada, proporcionando la actividad similar que la forma no fosforilada.
- El mutante R353A muestra un perfil de actividad similar al Wt, lo que refleja que la fosforilación minimiza el efecto de la actividad catalítica del mutante. La forma mutante de R353 aumenta la flexibilidad de L202 y facilita la rotura de la interacción con F207, es por eso que tiene actividad similar a la forma Wt, porque el loop es más abierto, más flexible y permite un mayor acceso del sustrato.

| SISTEMA de ESTUDIO | BARRERA ENERGÉTICA para ABRIR el K-F loop | ACTIVIDAD DESACETILASA (PERFIL) |
|---------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| HDAC8 Wt | 4.5Kcal/mol | Activa |
| K202M | 6Kcal/mol | Inactiva |
| K202M (P) | >6Kcal/mol | Inactiva |
| F207A | No conformación cerrada | Menos activo que Wt |
| F207A (P) | No conformación cerrada | Más activo que Wt (P) |
| D233A | 2.5Kcal/mol | Más activo que Wt |
| D233A (P) | No conformación cerrada | Más activo que Wt (P) |
| R353A (P) | 2.5Kcal/mol | Similar al Wt |

Tabla 1: la tabla resume los resultados obtenidos tras las simulaciones.

2. Objetivos

A) Objetivos Generales

Esta tesis, tiene dos objetivos generales, que son:

1. **Establecer prueba de concepto de la viabilidad de una aproximación racional al mecanismo de acción consistente en estabilizar Interacciones Proteína-Proteína (IPPs).**
2. **Entender el mecanismo de regulación alostérica, tomando como modelo la inactivación por fosforilación de HDAC8.**

B) Objetivos Específicos

Los objetivos específicos que se engloban dentro de cada uno de los objetivos generales son:

Identificación de estabilizadores de IPPs.

- Producción y purificación de las proteínas CheY y CheA en *E.coli* (de esta última, dos constructos distintos: CheA proteína total, CheYBSCheA, que comprende sólo el dominio P2 de CheA).
- Elección de un método de ensayo *label-free* que nos permita observar y determinar la unión de ambas proteínas y sea reproducible: SPR.
- Ensayo de los diferentes pares de proteínas con SPR para poner a punto el método.

- Determinación de las constantes de afinidad de cada par de proteínas: CheA/CheY y CheY/CheYBSCheA mediante SPR.
- Ensayo de los distintos compuestos con el mismo método e identificación de moléculas activas.
- Caracterización de los compuestos activos y cuantificación de su capacidad para modificar la constante de afinidad entre ambas proteínas mediante SPR.
- Cuantificación de la capacidad de estos compuestos para modificar la constante de afinidad entre ambas proteínas mediante Termoforesis.
- Poner a punto un método de comprobación *in vivo* que permita observar la motilidad bacteriana con células de *E.coli* BL21 y/o TolC-, en placas de agar semi-líquido.
- Comprobación *in vivo* de la acción de estas moléculas activas mediante ensayos de viabilidad y motilidad celular con *E.coli* TolC- y placas de agar semi-líquido.
- Ensayos de viabilidad celular, determinando el crecimiento bacteriano en cultivos control de las mismas células utilizadas en agar semi-líquido, en presencia de los diferentes compuestos.
- Estudio *in Vitro* de CheA y CheY mediante Western Blott con anticuerpos específicos para dichas proteínas.
- Utilización de geles de electroforesis que contienen PhosTag, una molécula que retrasa la migración de proteínas fosforiladas, para el estudio *in Vitro* de estas moléculas activas sobre el nivel de fosforilación de CheA y CheY mediante Western Blott con anticuerpos específicos para dichas proteínas.
- Estudio de cómo afectan los compuestos a la capacidad quinasa de CheA mediante ensayos *in vitro* de fosforilación y de actividad.
- Determinación estructural del complejo mediante cristalografía.
- Determinación estructural de los posibles complejos ternarios mediante co-cristalización.
- Determinación estructural de los posibles complejos ternarios mediante soaks.

Regulación de la actividad de HDAC8 por fosforilación.

- Producción de proteína wt i mutantes cuidadosamente seleccionados, en células HEK293T.
- Ensayo *in Vitro* de fosforilación de HDAC8 por PKA, tanto en la proteína wt y de los diferentes mutantes.
- Medición de la actividad enzimática mediante ensayos de actividad *in Vitro* y posterior revelado en fluorímetro.
- Cuantificación de HDAC8 total y fracción fosforilada mediante Western Blott con anticuerpos específicos.
- Evaluación del efecto de las mutaciones y su relación con la cantidad de proteína fosforilada.
- Descripción del mecanismo de regulación alostérica en HDAC8, una vez conocidos los datos experimentales.

3. Metodología

Pasaré a detallar la metodología utilizada en cada uno de los dos proyectos en los que se divide esta tesis:

3.1. Estudio de las Interacciones Proteína-Proteína: CheA/CheY.

3.1.1. Constructos

Pedimos a Mr.Gene® los constructos para CheA y CheY, con el doble His tag, en el N-terminal para CheY y en el C-terminal para CheA. Decidimos añadir un doble His tag, en vez de un His tag simple, puesto en el paper de Khan, K. et.al. del 2006 de Anal. Chem⁸⁵. se presentan las proteínas a ensayar con Biacore acopladas a un doble His tag, cosa que permite reutilizar el chip de NTA. Ambas proteínas se encuentran en un pTriex1.1.

Cada constructo contiene además: la secuencia de corte para la trombina, a fin de escindir el doble His-tag una vez purificada la proteína; una secuencia espaciadora entre la proteína y el tag; así como enzimas de restricción al final de la secuencia y el poly-A.

A continuación se muestra la secuencia aminoacídica del doble His-tag.:

REs: restriction enzymes

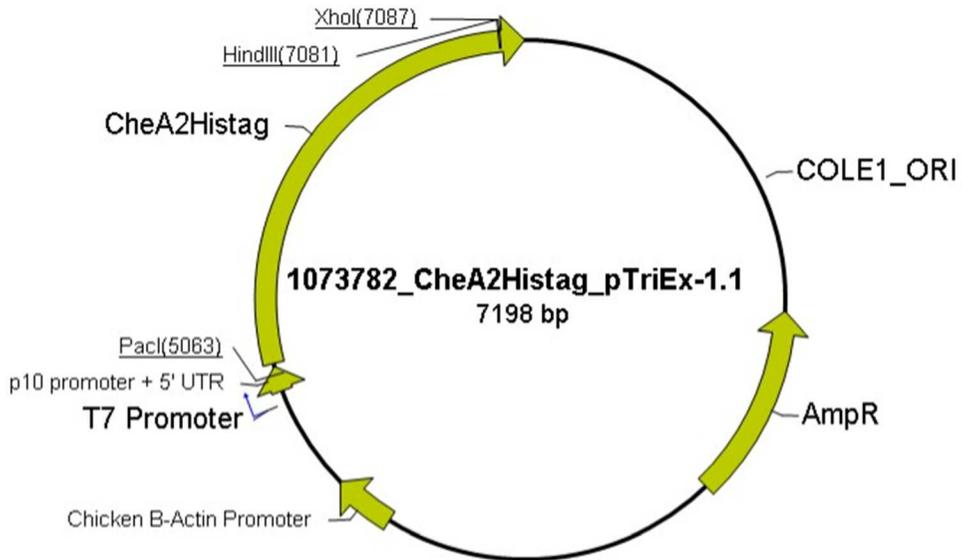
Green: Thrombin restriction site

Blue: (His)₆ + 11aa

(A)28: poly-A (28 residues)

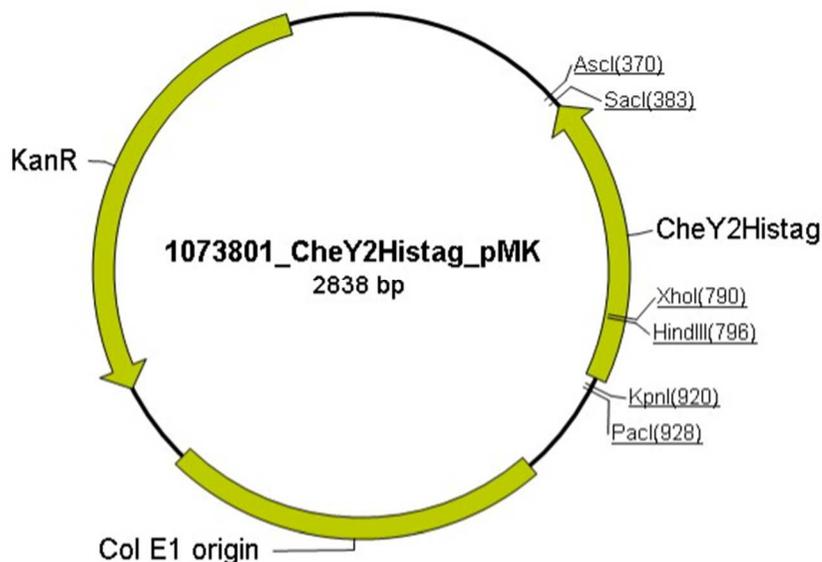
GGS: linker seq, between met and the His-tag.

HHHHHHSRAWRHPQFGGHHHHHHH: double His-tag.



Chemotactic signal transduction A (CheA) 78.750Da

Met VS **Met** DISDFYQTFDEADELLAD **Met** EQHLLVLQPEAPDAEQLNAIFRAAHSIKGGA
 GTFGFSVLQETTHL **Met** ENLLDEARRGE **Met** QLNTDIINLFLETKDI **Met** QEQLDAYKQSQ
 EPDAASFYICQALRQLALEAKGETPSAVTRLSVVAKSEPQDEQSRSQSPRRIILSRLKA
 GEVDLLEELGHLTTLTDDVVKGADSLSAILPGDIAEDDITAVLCFVIEADQITFETVEVSP
 KISTPPVLKLAEEQAPTGRVEREKTTRSNESTSIRVAVEKVDQLINLVGELVITQS **Met** LA
 QRSSELDPVNHGDLITS **Met** GQLQRNARDLQESV **Met** SIR **Met** **Met** P **Met** EYVFSRYPRLVLD
 LAGKLGKQVELTLVGSSTELDKSLIERIIDPLTHLVRNSLDHGIELPEKRLAAGKNSVGNL
 ILSAEHQGGNICIEVTDDGAGLNRERILAKAASQGLTVSEN **Met** SDDEVAMet LIFAPGFST
 AEQVTDVSGRGVGMet DVVKNRIQKMet GGHVEIQSKQGTGTTIRILLPLTLAILDGMet SV
 RVADEVFILPLNAVMet ESLQPREADLHPLAGGERVLEVRGEYLPIVELWKVFNVAGAKT
 EATQGIVVILQSGRRYALLVDQLIGQHVVVKNLESNYRKVPGISAATILGDGGSVALIVD
 VSALQAINREQRMet ANTAA **K** **L** **L** **E** **L** **V** **P** **R** **G** **S** **S** **G** **H** **H** **H** **H** **H** **S** **R** **A** **W** **R** **H** **P** **Q** **F** **G** **G** **H** **H** **H** **H** **H**
Stop Stop

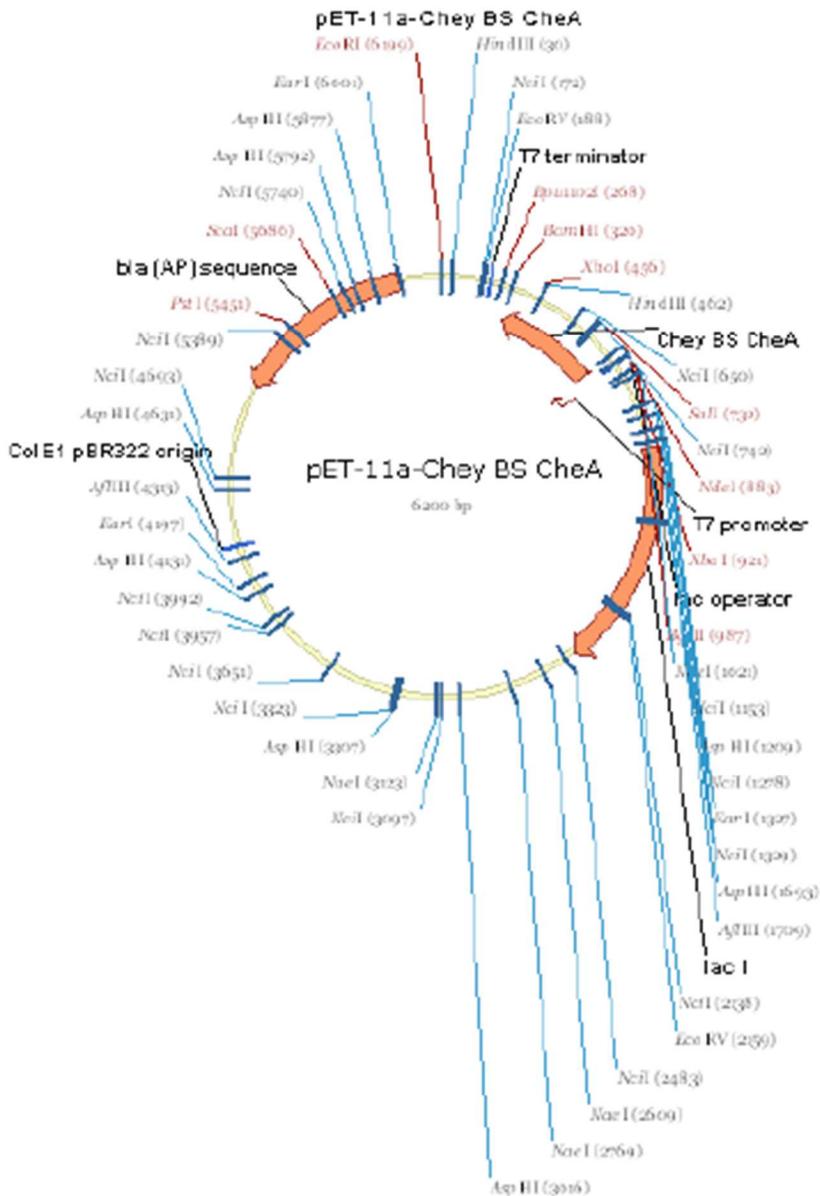


Chemotactic signal transduction Y (CheY) 18.734Da

Met HHHHHH SRAWRHPQFGG HHHHHH SGG L V P R G S K L L E Met ADKELKFLVDDFST
 Met RRIVRNLLKELGFNNVEEAEDGVDALNKLQAGGYGFVISDWN Met PN Met DGLELLK
 TIRADGA Met SALPVL Met VTAEAKKENIIAAAQAGASGYVVKPFTAATLEEKLNKIFEKL
 G Met Stop Stop

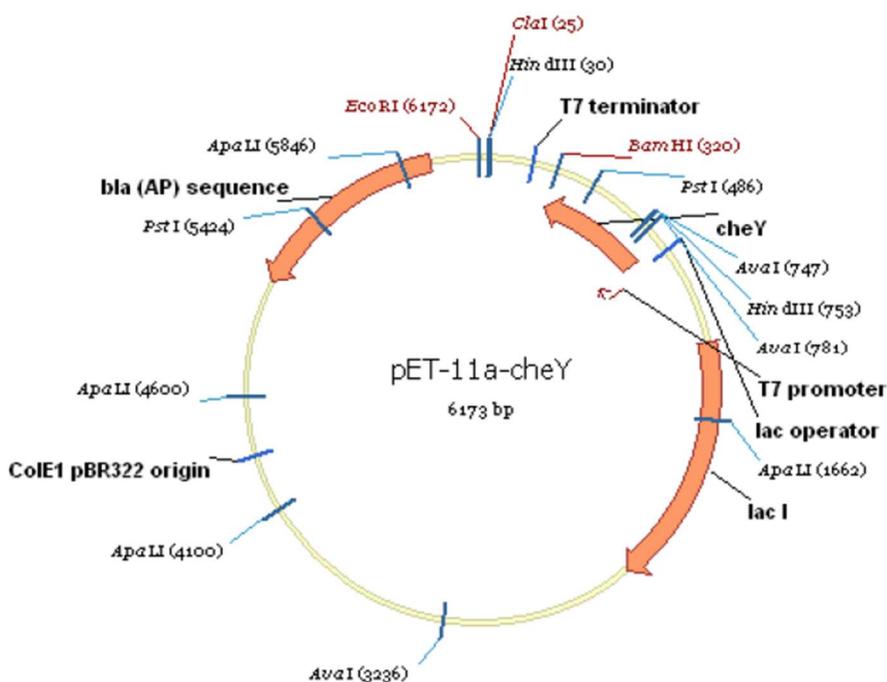
Las simulaciones sobre el sistema CheA/CheY, están realizadas con el código PDB:1a0o³³. Es la estructura que surgió del cribado con *fpocket*¹⁵, que se caracterizó con *MDMix*³⁸, y con la que se ha seguido trabajando. En esta estructura se aprecian CheY y CheA·P2, sólo el dominio P2 de CheA, que es el lugar de unión, la región de CheA que interacciona con CheY³⁶, no con CheA entera, puesto que al tener casi 80kDa, su gran tamaño dificulta su cristalización. Esta es la secuencia que se ha tenido en cuenta para el constructo de CheYBSCheA; se adquirió de Biomatik y fue subclonado en un pET-11 con el doble His tag en el C-terminal.

RES: BamHI/XbaI



CheYBSCheA 20.140Da Met RQLALEAKGETPSAVTRLSVVAKSEPQDEQSRSQSPRRIILSRK
 AGEVDLLEELGHLTTLTDVVKGADSLSAILPGDIAEDDITAVLCFVIEADQITFETVEVS
 PKISTPPVLKLA AEQAPTGRVEREKTTRNTAA **KLLELVPRGSSGGHHHHHHS**RAWRHP
 QFGG **HHHHHH** Stop Stop **KKKKKKKK**

Tras varios meses de ensayos, el constructo inicial de CheY (CheY en pTriEx1.1) empezó a dar cada vez más bajo rendimiento, por ello, volvimos a pedir de nuevo el constructo, esta vez a Biomatik también, en el mismo vector en el que se encontraba CheYBScheA, en un pET11a. Y es que, tras varios batches de expresión, veíamos que el nivel de expresión de CheYBScheA era siempre mucho mayor al de CheY. En la secuencia se ha manteniendo el doble His tag en el N-terminal. Para los ensayos de Cristalografía y Termoforesis hemos utilizado CheY expresada de este vector. Para los experimentos de Biacore, utilizamos el primer constructo.



Chemotactic signal transduction Y (CheY) 18.734Da

Met **H H H H H H** S R A W R H P Q F G G **H H H H H H** S G G L V P R G S **K L L E** Met A D K E L K F L V V D D F S T
 Met R R I V R N L L K E L G F N N V E E A E D G V D A L N K L Q A G G Y G F V I S D W N Met P N Met D G L E L L K
 T I R A D G A Met S A L P V L Met V T A E A K K E N I I A A A Q A G A S G Y V V K P F T A A T L E E K L N K I F E K L
 G Met Stop Stop

3.1.2. Expresión y Purificación

Esta parte se llevó a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. Miquel Coll (IRB) en las instalaciones del PCB·UB.

Células E.coli Tuner™(DE3) pLacI de Merck Millipore: esta cepa tiene ciertas particularidades: por un lado, al ser Tuner, significa que son E.coli BL21 mutantes por delección para lacZY lo que permite expresar mayores niveles de proteína. Por otro lado, la mutación para lacY permite la entrada uniforme de IPTG en todas las células de manera que el nivel de expresión que obtendremos será proporcional a la cantidad de IPTG. DE3, a su vez, indica también, que el constructo contiene una copia del gen para la RNA polimerasa de T7, lo que proporciona a esta cepa niveles de expresión altos tras inducción por IPTG, a partir de genes clonados en vectores pET⁸⁶.

Transformación: Transformamos 1ng de cada vector en 50µL de células competentes Tuner™(DE3) pLacI, por choque térmico a 42°C durante 1 minuto, y plaqueamos la transformación en agar LB + Ampicilina. Las dejamos o/n a 37°C. Observamos las colonias crecidas, y preparamos pre-cultivos, inoculando una sola colonia en 250mL de LB previamente esterilizado + Ampicilina. Las dejamos crecer 20h a 37°C y 200RPMs.

Expresión: Al día siguiente preparamos cultivos: inoculamos 30mL de este cultivo o/n bien crecido en 500mL de LB estéril + Amp y lo dejamos crecer durante 2h a 37°C y 200RPMs. Comprobamos que el cultivo haya alcanzado una O.D₆₀₀ de 0.5, e inducimos la expresión añadiendo al cultivo 1M de IPTG. Dejamos que se lleve a cabo la expresión durante 3h más a 37°C y 200RPMs. Pasado este tiempo, recogemos las células centrifugando a 5.000G durante 20 minutos y a 4°C, y congelamos el pellet a -20°C hasta su purificación.

Purificación⁸⁶: llevamos a cabo la purificación con equipos Äkta: descongelamos el pellet guardado a -20°C añadiendo 30mL del buffer A de la columna de afinidad, DNAsas y una pastilla de cóctel de inhibidores de proteasas, Complete® EDTA free. Homogeneizamos bien, y sonicamos durante 10'(4"on-2"off). Posteriormente centrifugamos durante 1h a 4°C y 20.000RPMs, recogemos el sobrenadante resultante y lo filtramos con filtros Millipore de 0.22µM.

Columna de afinidad: En este caso, utilizamos una columna Ni²⁺ HisTrap, puesto que el constructo tiene un doble His tag. Los buffers utilizados son:

- A → 200mM NaCl 20mM Tris·Hcl pH8.0 20mM Imidazol.
- B → 200mM NaCl 20mM Tris·Hcl pH8.0 1M Imidazol (eluyente).

Flow 2.5mL/min, Alarma de Presión de 0.5MPa, Fraction size: 1.5mL.

Equilibramos el equipo con 5vcA, 5vcB, 5vcA, equilibramos también el loop, y cargamos la muestra. Eluimos al 100%B en 20vc y recogemos fracciones de 1.5mL. Comprobamos las fracciones de los diferentes picos mediante un gel SDS-PAGE al 12-18% depende del tamaño de la proteína. Recolectamos las fracciones que contienen la proteína y las concentramos con un Amicon de filtro tangencial de Mwco 10kDa (para CheY y CheYBScheA) y de 30kDa para CheA. Concentramos hasta tener un volumen menor de 0.5mL si es posible, sino, haremos más de un run de purificación con la size-exclusion.

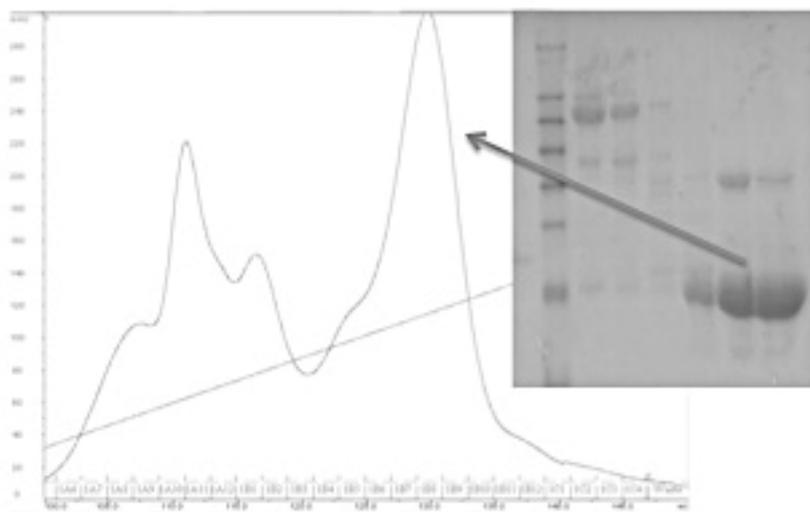


Imagen 23: Ejemplo de cromatograma. Cromatograma de la HisTrap de CheY. En este gráfico se muestra, en el eje de las X, mL de muestra eluída y correspondientes fracciones (rojo) y en el eje de las Y, la OD a 280nm. En este caso, el pico de CheY pura corresponde al pico mayor, que eluye a partir de la fracción 1B4. En verde, el gradiente de buffer B. A la derecha se muestra el gel de la purificación, vemos que la proteína eluye en el pico mayor (flecha).

- Digestión por Trombina: Realizamos este paso previo para las purificaciones de CheY y CheYBSCheA. Entre la secuencia de la proteína y el doble His tag se encuentra la secuencia de corte para la trombina, para, una vez purificadas por afinidad, poder eliminar el tag y evitar así que este pueda interferir en los ensayos biofísicos y en la cristalografía.

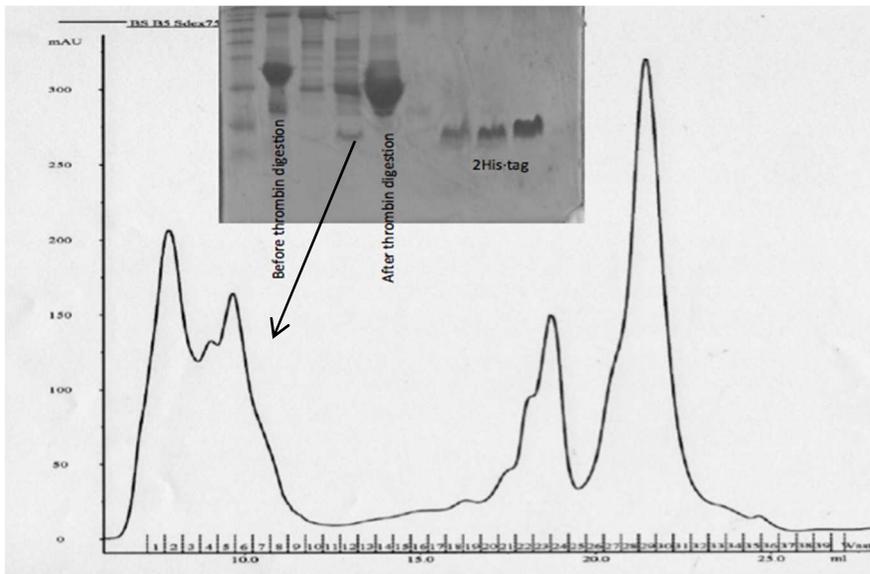


Imagen 24: En este cromatograma se muestra como ejemplo CheYBSCheA antes y después de la digestión de trombina, con el seguimiento de las fracciones eluidas mediante el gel SDS-PAGE.

Una vez concentradas las muestras, añadimos 12.5µg de trombina (de Sigma, 37kDa) a cada eppendorf y dejamos que la reacción se lleve a cabo o/n en agitación orbital a 4°C.

Columna size-exclusion: centrifugamos la muestra ya digerida a 16kRPMS y a 4°C durante 15 minutos para precipitar agregados y que estos no pasen a la columna. Utilizamos una Superdex75 10/300 (GE Healthcare), para que las proteínas eluyan según su peso, empezando por las de mayor tamaño.

- Buffer: 20mM Tris-Hcl pH8.0, 200mM NaCl. Flow 0.5mL, Alarma de Presión: 1.8MPa, Fraction size: 0.5mL.

Cargamos la muestra en el loop y equilibramos la columna con 1,2vc de buffer. Acto seguido recogemos las fracciones que van eluyendo. Comprobamos los diferentes picos mediante un gel SDS-PAGE y concentramos las fracciones deseadas.

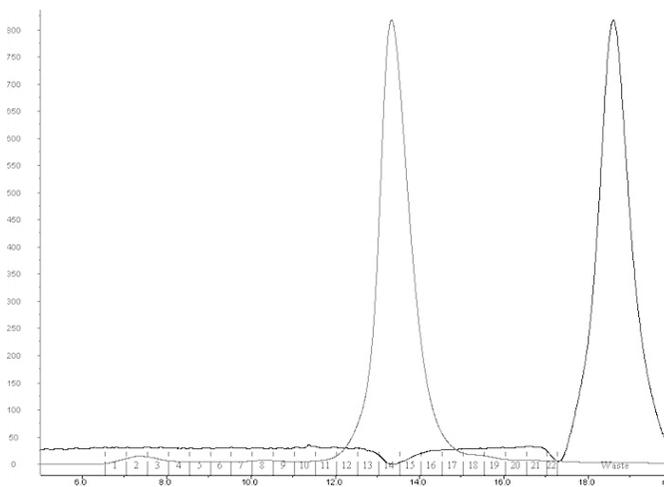


Imagen 25: Ejemplo de Cromatograma: Cromatograma resultante de una size-exclusion de CheY. En el eje de la X se muestran los mL eluidos y las fracciones recogidas (rojo) y en el eje de las Y se muestra en azul, la absorbancia a 280nm. El pico azul, corresponde a la CheY pura.

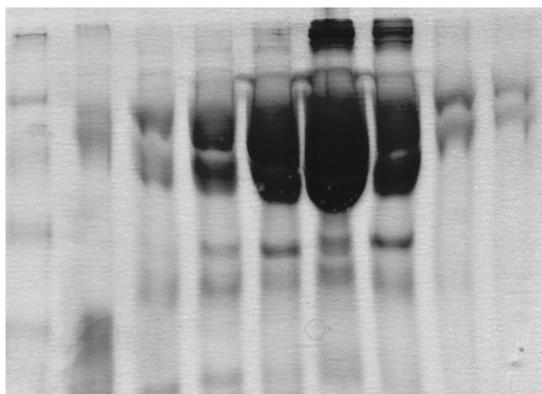
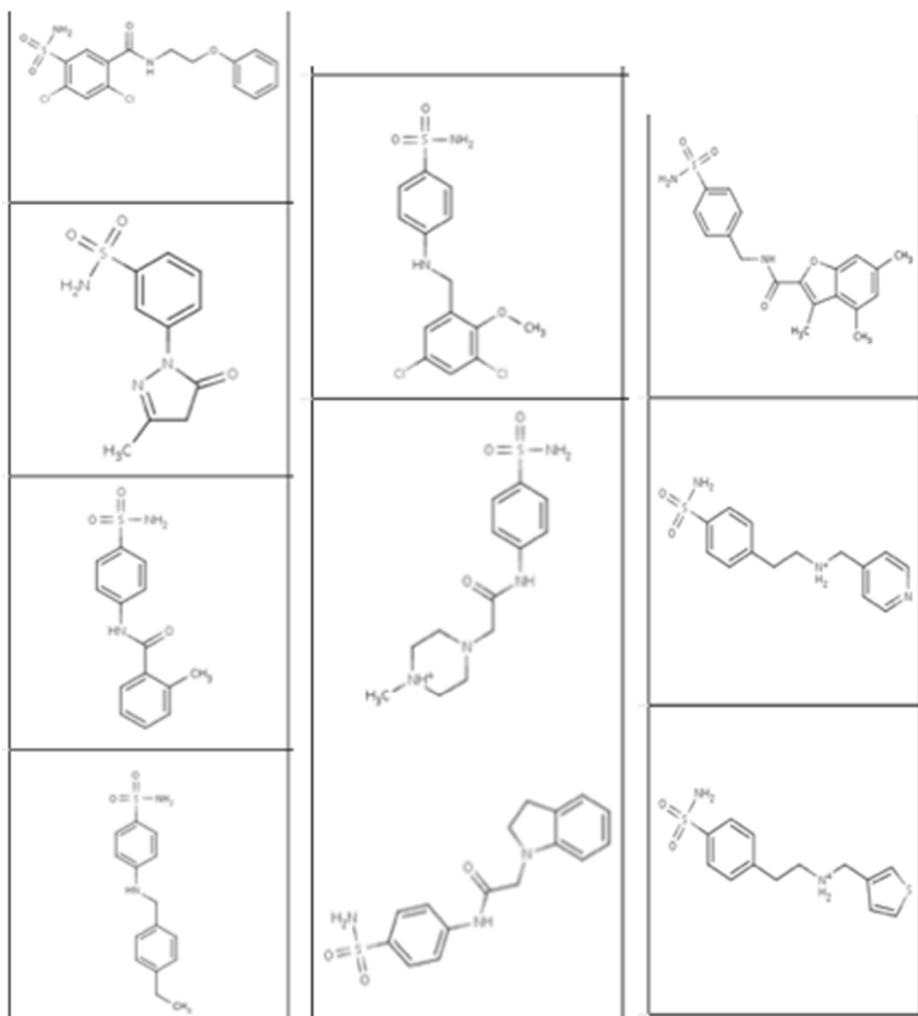


Imagen 26: Ejemplo de comprobación de fracciones. En este ejemplo de gel de proteínas SDS-PAGE se cargan las fracciones correspondientes al pico de elución de CheA. Se aprecia que el pico de elución de CheA es el comprendido entre los carriles del 3 al 6.

3.1.3. Preparación de Compuestos

3.1.3.1. Compuestos

Primeramente, se adquirieron una serie de 68 compuestos de diferentes casas comerciales. Del screening inicial de estos 68 compuestos, apareció un compuesto interesante, así que se adquirieron algo más de 30 compuestos, tomando como referencia este compuesto “activador potencial” pero modificando de manera secuencial, algunos grupos de la estructura de dicho activador. Algunos pretendían ser inactivos, y otros, pretendían ser activos, manteniendo el grupo Benzeno y la sulfonamida. (Se muestran algunos ejemplos en la imagen siguiente).



Después de su recepción, los compuestos se disolvieron en 100% DMSO hasta una concentración final de 100mM. Este sería nuestro stock. Los compuestos se almacenaron a -80°C en el mismo vial en el que se encontraban, hasta su uso.

3.1.3.2.Fragmentos

Si bien los compuestos son muy solubles en 100%DMSO, su solubilidad baja al diluirlos en los buffers de estudio. Además, trabajando con proteínas, la concentración de DMSO debe ser inferior al 5%, siendo esta, cuanto menos, mejor. Para determinados ensayos, como por ejemplo, la cristalografía, la concentración de compuestos debe ser muy elevada. En vista de los problemas de solubilidad que presentan los compuestos, decidimos adquirir unos fragmentos, que, si bien son de menor tamaño y más solubles, también contienen el grupo benzen-sulfonamida, en común con los compuestos “potencialmente activos”.

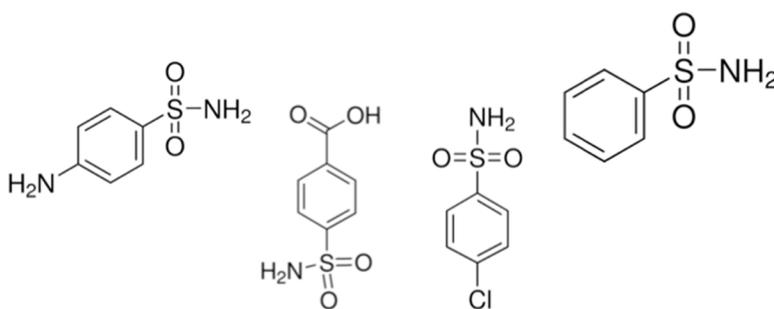


Imagen 27: esquema de los 4 fragmentos adquiridos que presentan la benzen-sulfonamida. De izquierda a derecha: sulfanilamida (1), ácido sulfamoil-benzoico (2), 4 clorobenzen-sulfonamida (4), sulfonamida (3).

Estos fragmentos se utilizarán en Termoforesis y en cristalografía.

Dividiremos los ensayos realizados en esta parte de la tesis en tres bloques: primeramente, los ensayos biofísicos, segundo, los ensayos *in vivo* y por último, los ensayos *in vitro*.

ENSAYOS BIOFÍSICOS

3.1.4. Biacore (SPR)

Biacore™ (de GE Healthcare) es un sistema que monitoriza las interacciones moleculares a tiempo real, sin necesidad de marcaje. Este sistema, responde a cambios en la concentración de moléculas unidas o disociadas en la superficie del sensor. El principio de detección se basa en SPR (surface plasmon resonance)⁸⁷, un método muy sensible, que basado en la excitación colectiva de los electrones de superficie, detecta y mide cambios en el índice de refracción en los 150nm que forman la superficie del sensor. Para estudiar la interacción entre dos moléculas, una de ellas ha de estar previamente unida a la superficie y la otra pasará sobre la primera a flujo continuo en lo que llamaremos, la fase móvil, para diferenciarla de la fase inmóvil. La respuesta SPR observada está directamente relacionada con cambios en la cantidad de masa cercana a la superficie del sensor^{88,89}.

El Chip o sensor: la superficie del sensor, tiene dos particularidades esenciales:

- una superficie de cristal, cubierta por una fina capa de oro, de unos 50nm, común a todos los sensores.
- Una cubierta, sobre la capa de oro, que posee los requerimientos necesarios para que el ligando se adhiera, así como un entorno donde la interacción de estudio tenga lugar. Este recubrimiento, no afecta al efecto SPR, pero puede variar según el tipo de chip. El oro, por sí solo, no es un entorno adecuado para las interacciones moleculares, por ello la capa está cubierta de moléculas de alcanetiol o bien, de dextrano. Esto protege las muestras biológicas del contacto con el oro y a su vez, provee de un modo de unión a la superficie de la matriz. En nuestro caso la capa contendrá dextrano, y tendrá una altura de 100nm.

Para generar un entorno propicio para las interacciones moleculares, la capa de oro está cubierta por una matriz de dextrano modificado, la cuál determina las propiedades del chip, respecto a la unión del ligando y la interacción molecular. El chip está montado en un soporte

plástico para facilitar su manipulación. El soporte a su vez se encuentra dentro de un plástico protector que lo cubre a modo de carcasa. El dextrano es una molécula relativamente inerte en el contexto de las interacciones moleculares, lo que, sumado a su flexibilidad, permite a las moléculas moverse con relativa libertad. La capa de oro y la superficie del sensor son estables bajo un amplio rango de condiciones, incluyendo pH extremos y moderadas concentraciones de solventes orgánicos.

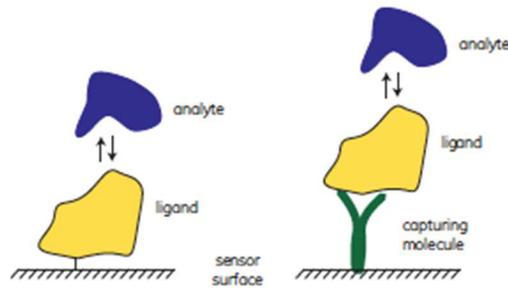


Imagen 28: El ligando es la molécula de la interacción que está unida al sensor, ya sea de manera directa, o indirecta (como se muestra en la derecha mediante la unión a través de anticuerpo). El analito es, por tanto, la otra molécula de la interacción a medir que está libre, en solución, y se une al ligando inmóvil.

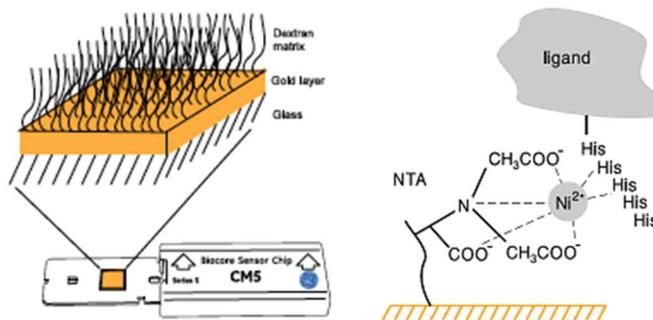


Imagen 29: Izquierda: Esquema de la estructura del sensor, tomando como ejemplo un CM5. **Derecha:** detalle del chip de NTA donde se ven las moléculas de NTA capturando los iones de níquel, y estos capturan a su vez, las moléculas de histidina asociadas a las proteínas de fusión.

Hay diferentes matrices, algunas similares a esta de CM5 pero adaptadas para albergar una cantidad de ligando concreta, otras son hidrofóbicas, otras son específicas para capturar un ligando en concreto, como por ejemplo las que son de NTA, CAP o SA. Introduciremos los dos tipos de chips utilizados durante nuestros ensayos con Biacore:

- **CM5:** es la más comúnmente usada, y provee una gran superficie capaz de inmovilizar un amplio rango de ligandos, desde moléculas pequeñas, hasta proteínas, pasando por ácidos nucleicos y carbohidratos.
- **NTA:** este chip contiene una matriz de dextrano con NTA (ácido nitrilotriacético) inmovilizado, lo que provee el entorno adecuado para inmovilizar ligandos que contengan polihistidinas, como por ejemplo, proteínas recombinantes⁹⁰.

La molécula de NTA se une de manera coordinada con iones de níquel, dejando libres sitios de unión para que se pueda unir el tag de polihistidinas. La superficie se regenera fácilmente con EDTA, el cuál elimina el ión metálico y lo que haya unido a él. Las moléculas de estudio, pueden ser unidas a la superficie del chip a través de diferentes técnicas, además de la que utiliza el níquel, tal y como hemos visto en el chip de NTA, como por ejemplo, de manera covalente, o a través de anticuerpos. En la inmovilización covalente, se pueden por ejemplo, explotar los grupos amina del ligando, tras una activación de la superficie con EDC/NHS. Es el método llamado 'amine coupling' y es el método que utilizaremos nosotros en el CM5.

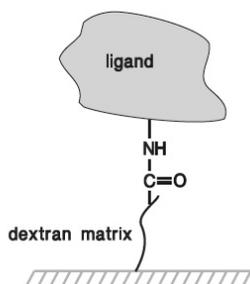


Imagen 30: El ligando inmovilizado covalentemente está unido a la superficie a través de un enlace químico covalente. En la imagen se muestra la 'amine-coupling'.

Este sistema puede ser utilizado para el estudio de cualquier tipo de interacciones, en las que estén implicadas cualquier tipo de moléculas, desde moléculas orgánicas hasta proteínas, e incluso células enteras. Como la respuesta es una medida en el cambio de concentración, la respuesta por unidad molar de analito es proporcional al peso molecular (de manera que las moléculas más pequeñas dan señales menores). Siendo el límite mínimo de detección del aparato de unos 100Da⁹¹.

El principio de detección no requiere marcaje, y la interacción se puede medir directamente de un extracto celular, o bien de moléculas puras. El principio de detección de SPR es no invasivo, y funciona igual en muestras claras, coloreadas u opacas. El análisis de la interacción se realiza mediante la inyección de la muestra por la superficie de manera controlada, a un flujo continuo de buffer, llamado Running Buffer. La respuesta resultante se medirá en RU (unidades de resonancia) y es proporcional a la concentración de moléculas en la superficie. La respuesta se observa mediante un gráfico llamado Sensorgrama, que es un gráfico que relaciona la respuesta a través del tiempo, y muestra el progreso de la interacción.

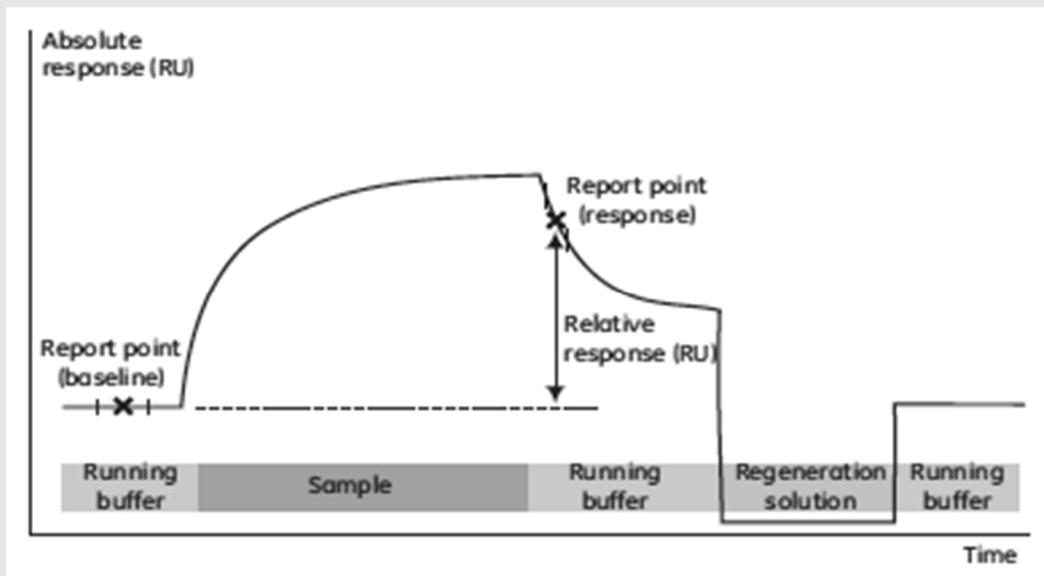


Imagen 31: Ilustración esquemática de un Sensorgrama. En la barra inferior vemos las diferentes soluciones que van pasando a través del sensor. El Report Point guarda la respuesta del sensorgrama a tiempo específico. La respuesta será absoluta o relativa, si es en relación a otro Report Point. Regeneración es el proceso de eliminar el analito de la superficie después de un ciclo, y sin dañar el ligando, como preparación para un nuevo ciclo. Habitualmente la regeneración elimina el ligando y deja la molécula intacta.

El Software de Biacore nos permite obtener datos de Cinética y Afinidad⁹².

- Cinética: Por un lado, podemos mirar la cinética de la interacción, y los resultados pueden ser interpretados en relación a un modelo matemático de interacción para evaluar los parámetros cinéticos.

- *Afinidad: la afinidad de la interacción puede estar determinada de tres maneras diferentes utilizando Biacore:*
 - *A partir de constantes de cinética, para modelos de unión 1 a 1, la constante de afinidad es igual a la ratio de las constantes: $k_A = k_a/k_d$*
 - *Afinidad en el equilibrio. Para los modelos de unión de 1:1 es un buen método, pero para otros modelos, no sería suficiente robusto.*
 - *En nuestro caso, el modelo de unión de CheY-CheA es 1:1. Y esta es la vía por la que habitualmente determinaremos la afinidad del sistema.*
 - *Afinidad en solución: la idea es determinar la concentración de ligando libre en soluciones donde los interactores se encuentran en concentraciones conocidas.*

3.1.4.1. Ensayos de Biacore. Preparación del chip y proteínas: Los ensayos fueron llevados a cabo con el Biacore T100 en las instalaciones del PCB-UB, en los servicios científico-técnicos. Antes de empezar los experimentos, y siguiendo las instrucciones de uso del equipo, acondicionamos el Biacore T100 a 25°C y realizamos un *prime* dos veces con H₂O MilliQ, después insertamos un chip de mantenimiento y limpiamos la máquina con la función *Desorb*: 50mM Glicina pH9.5, 0.5% SDS y H₂O MilliQ.

Primero, hicimos varios intentos con el chip NTA, en vista que, según la teoría, permitiría usar el chip durante más tiempo. Al cabo de unos meses, decidimos cambiar de chip, y optamos por un CM5. Varios ciclos de prueba son necesarios, para determinar la concentración y el pH al cuál trabajar, dependiendo de la muestra y el chip elegidos, de igual manera, también será necesario determinar el tiempo de unión y la solución de regeneración pertinente. Para determinar la cantidad de RUs a inmovilizar para cualquier ensayo, estas dependen de la cantidad de ligando inmovilizada, la cuál, a su vez, dependen de los pesos moleculares relativos de ambos, ligando y analito. Además, si asumimos que la estequiometría de la unión es de 1:1, la Respuesta Máxima (analyte binding capacity) sería el resultado de dividir el peso molecular del analito, entre el del ligando y multiplicando el resultado por las RUs inmovilizadas.

$$\text{analyte binding capacity (RU)} = \frac{\text{analyte MW}}{\text{ligand MW}} \times \text{immobilized ligand level (RU)}$$

Nosotros, para los ensayos de Biacore, determinamos inmovilizar una cantidad de 100RUs de ligando.

CHIP_NTA⁹⁰

Condicionamiento del Chip: extraemos el chip de mantenimiento, insertamos en el equipo el chip CM5, fijamos la temperatura a 25°C y limpiamos el chip tres veces (1 minuto, flow: 30µL/min) con 0.5M de EDTA a pH8.5. Después de esto realizamos la *Normalization with dips*, para confirmar que la superficie del chip es homogénea.

Buffers → Los ensayos de Biacore se realizaron con los siguientes buffers:

- Immobilization Buffer: 10mM HEPES, 0.15M NaCl, 0.5% Tween20 (pH 7.5)
- Running Buffer: 10mM HEPES pH 7.5; 0.15M NaCl, 50µM EDTA).
- Regeneration Buffer: Running Buffer con EDTA 350µM.

Activación del chip y captura de níquel: el chip requiere de una activación previa de la superficie, para que este pueda captar el níquel. Una vez capturado el níquel, el chip ya estará receptivo y en condiciones de inmovilizar el ligando que contenga el tag de histidinas.

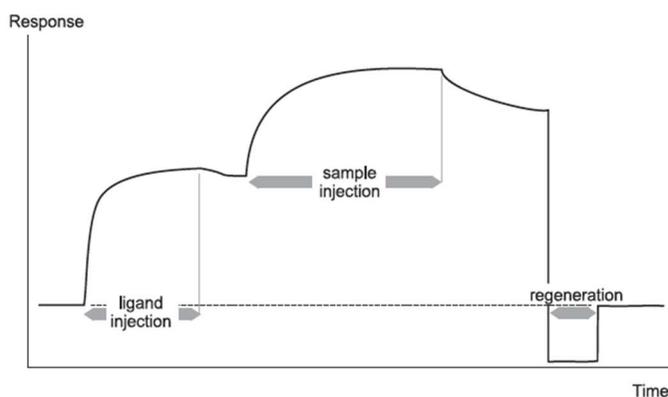


Imagen32: Sensorgrama típico de la captura del ligando en el chip de NTA.

- Por ambas flowcells a 10µL/min en una mezcla 1:1 de 0.1M EDC/ 0.1M NHS durante 420" para activar la superficie del chip.
- Por ambas flowcells durante 420" a flujo 10µL/min pasamos una mezcla Etanolamina/HCL 1M a pH 8.0.
- Captura de níquel, por ambas flowcells pasamos una solución de NiCl₂ a 0.5mM durante 1minuto a fin de obtener un aumento de las RUs en 30 unidades.

CHIP_CM5

Condicionamiento del Chip: extraemos el chip de mantenimiento, insertamos en el equipo el chip CM5, fijamos la temperatura a 25°C y lavamos el chip tres veces con Running Buffer sin DMSO. Después de esto realizamos la *Normalization with dips*, test que nos servirá para confirmar si la superficie del chip es homogénea.

Buffers→ Los ensayos de Biacore se realizaron con los siguientes buffers:

- Running Buffer: HBSN 1X + 1% DMSO (10mM HEPES pH 7.5; 0.15M NaCl).
- Regeneration Buffer: 0.25% SDS, 0.1M NaOH

Activación del chip e Inmovilización (directa y covalente) de CheY: como resultado de la elución en el último buffer de purificación, CheY se encuentra en buffer 20mM Tris-HCl pH8.0, 200mM NaCl, y a una concentración de 10µM. Para los ensayos de Biacore, utilizamos CheY fresca, recién purificada, que haya estado en la nevera a 4°C como mucho durante tres semanas. Seguimos el protocolo standard de inmovilización para chips CM5: la flowcell 1 se utiliza como referencia, para comprobar que no hay binding inespecífico. Hacemos pasar:

- Por ambas flowcells a 10µL/min en una mezcla 1:1 de 0.1M EDC/ 0.1M NHS durante 420" para activar la superficie del chip.
- Pasamos CheY durante 60" pero solamente por la flowcel 1 y a un flujo de 2µL/min.
- Por ambas flowcells durante 420" a flujo 10µL/min pasamos una mezcla Etanolamina/HCL 1M a pH 8.0, para bloquear el resto de grupos activados y no cubiertos por CheY.

Después de esta activación vemos que hay sobre unas 100Rus si comparamos la flowcell1 con la 2, es decir, hay 100Rus de más en la flowcell 1 debido a la inmovilización de CheY.

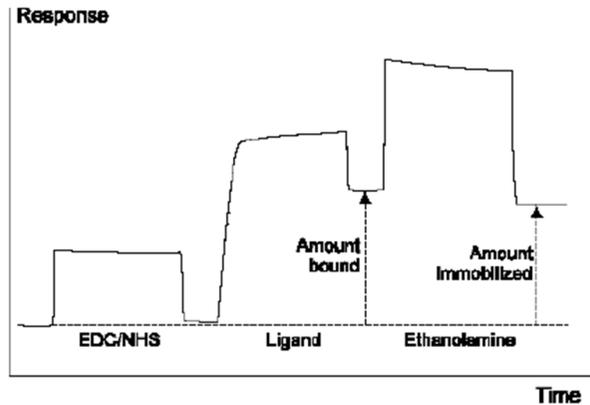


Imagen 32: Sensorgrama típico de la inmovilización covalente del ligando.

Preparación del analito (CheYBSCheA): llevamos a cabo una serie de ensayos preliminares para determinar la concentración óptima, y determinamos que para este tipo de ensayos la concentración óptima de CheYBSCheA es de $1\mu\text{M}$. CheYBSCheA también se encuentra en el buffer 20mM Tris-HCl pH8.0, 200mM NaCl. La concentramos hasta la concentración deseada con un Amicon de 10kDa de Mwco a 4.000G.

3.1.4.2. Obtención y Preparación de los Compuestos.

Los compuestos se disolvieron en 100%DMSO hasta una concentración stock de 100mM y se guardaron a -80°C hasta su utilización. Para su uso en Biacore, se realizaron diferentes diluciones intermedias hasta llegar a la concentración deseada de compuesto y DMSO. Se disolvieron en Running Buffer y se filtraba con filtros resistentes a DMSO para evitar partículas en suspensión. Se ensayaron a $100\mu\text{M}$ y 1%DMSO final. Algunos compuestos presentaban problemas de solubilidad, por lo que al final, los ensayos se llevaron a cabo a una concentración de compuestos de $10\mu\text{M}$ y al 1%DMSO final.

3.1.4.3. Método de Ensayo. Afinidad entre proteínas.

CHIP_NTA

Con este chip, tenemos que capturar cada vez níquel, el ligando con His-tag, y tras pasar el analito, eliminar todo lo unido al chip pasando buffer con EDTA. Este ciclo se repetirá cada vez que queramos hacer una medida. Estos *runs* nos sirvieron para determinar la cantidad de níquel a capturar, la cantidad del ligando-His-tag que capturar para obtener una mayor señal, y también la concentración de analito ideal, a la cuál podamos ensayar después los compuestos. Aquí capturaremos CheY, y será CheA la que pasará como analito. Decidimos hacerlo así para obtener una mayor señal, según la fórmula anteriormente mencionada.

- Capturamos níquel, haciendo pasar una solución de de NiCl_2 a 0.5mM durante 1minuto a $10\mu\text{L}/\text{min}$.
- Pasamos Running Buffer durante 30" para estabilizar la *baseline*.
- Inyectamos el ligando que contiene el His-tag, por ambas flowcells a $0.1\mu\text{M}$ durante 60" (optimizado para obtener un incremento total de unas 100RUs).
- Pasamos Running Buffer durante 60" para estabilizar la *baseline*.
- Inyectamos sólo por la flowcell_1 el analito CheA a diferentes concentraciones (desde $0.1\mu\text{M}$ a $5\mu\text{M}$) a $10\mu\text{L}/\text{min}$ (más adelante, también realizamos diferentes pruebas inmovilizando CheY).
- Acordamos un Stabilization Period de 600", para que la *baseline* volviese a cero.
- Regeneramos el chip con Running Buffer con EDTA $350\mu\text{M}$

→ Los ensayos con el chip de NTA finalizan aquí. El resto ya se hizo con el chip CM5.

CHIP_CM5

Para la determinación de la K_d entre CheY y CheYBSCheA, preparamos diluciones seriadas de CheYBSCheA a concentraciones $0\mu\text{M}$, $0.375\mu\text{M}$, $0.657\mu\text{M}$, $1.25\mu\text{M}$, $2.5\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ y $20\mu\text{M}$, por triplicados y con diferentes blancos al principio, al final y entremedio. Los runs se llevaron

a cabo a 25°C con Blanks al principio y al final y entremedio de los runs largos (O/N). Cada ciclo constaba de las diferentes fases:

- Binding Cycle: inyección de CheYBScheA durante 60" a 10µL/min
- Dissociation Cycle: 600" de Running Buffer a 10µL/min
- Regeneration Cycle_1: 30" 0.25% SDS a 10µL/min
- Regeneration Cycle_2: 0.1M HaOH a 10µL/min
- Stabilization Period: 60" de Running Buffer a 10µL/min

Análisis cinético→ Analizamos los ciclos por Affinity. La flowcell_1 fue utilizada como referencia, y estos valores fueron restados de los valores resultantes de la flowcell_2. Los valores resultantes fueron alineados según el punto de inyección como Report Point, se eliminaron manualmente las colas, y los resultados se ajustaron siguiendo un modelo de interacción 1:1. Conociendo las concentraciones utilizadas de cada ciclo, el software nos permite calcular la Kd de ambas proteínas.

3.1.4.4. Método de Ensayo. Screening de compuestos

Una vez tenemos CheY inmovilizado en el chip, acondicionamos el chip con 2 pases de Running Buffer, para estabilizar la superficie. A partir de aquí, empezamos a medir. Los runs se llevaron a cabo a 25°C con Blanks al principio y al final y entremedio de los runs largos (Blanks compuestos sólo de buffer, y Blanks de proteína sola, sin compuestos). Los compuestos se ensayaron a 100µM, por triplicados y en la misma solución que la Binding Cycle, a 1µM de proteína y 1% final de DMSO. Cada ciclo constaba de las diferentes fases:

- Binding Cycle: inyección de CheYBScheA + compuestos durante 60" a 10µL/min
- Dissociation Cycle: 600" de Running Buffer a 10µL/min
- Regeneration Cycle_1: 30" 0.25% SDS a 10µL/min
- Regeneration Cycle_2: 0.1M HaOH a 10µL/min
- Stabilization Period: 60" de Running Buffer a 10µL/min

Análisis cinético → Analizamos por Affinity utilizando el Software *Biacore Evaluation*, que permite procesar los datos de manera clara. La flowcell_1 fue utilizada como referencia, y estos valores fueron restados de los valores resultantes de la flowcell_2. Los valores resultantes fueron alineados según el punto de inyección como Report Point, se eliminaron las colas, y los resultados se ajustaron siguiendo un modelo de interacción 1:1. De aquí cogimos aquellos compuestos que generaban una mayor afinidad entre ambas proteínas, y que no daban señal cuando se pasaban solos, sin proteína. Estos compuestos, a los que llamaremos “activadores potenciales” fueron caracterizamos, y medimos cómo afectaba su presencia a la Kd de ambas proteínas.

3.1.4.5. Método de Ensayo. Caracterización de Compuestos.

Caracterizaremos mejor estos “activadores potenciales” mediante una Kd igual que hemos hecho antes, a concentraciones crecientes de CheYBSCheA, pero esta vez, con 10 μ M de compuestos. Cada ciclo constaba de las diferentes fases:

- Binding Cycle: inyección de CheYBSCheA + compuestos durante 60” a 10 μ L/min
- Dissociation Cycle: 600” de Running Buffer a 10 μ L/min
- Regeneration Cycle_1: 30” 0.25% SDS a 10 μ L/min
- Regeneration Cycle_2: 0.1M HaOH a 10 μ L/min
- Stabilization Period: 60” de Running Buffer a 10 μ L/min

Análisis cinético → Analizamos por Affinity, utilizando el Software *Biacore Evaluation*. La flowcell_1 fue utilizada como referencia, y estos valores fueron restados de los valores resultantes de la flowcell_2. Los valores resultantes fueron alineados según el punto de inyección como Report Point, se eliminaron manualmente las colas, y los resultados se ajustaron siguiendo un modelo de interacción 1:1. Conociendo las concentraciones utilizadas de cada ciclo, el software nos permite calcular la Kd de ambas proteínas. Comparamos estas Kd con la Kd de ambas proteínas sin compuestos.

3.1.5. DSF

El principio del **Differential Scanning Fluorimetry**⁹³ o **Thermal Shift**^{94,95,96,97} es un ensayo de desnaturalización térmica que mide la estabilidad térmica de una determinada proteína, tras un aumento secuencial de la temperatura.

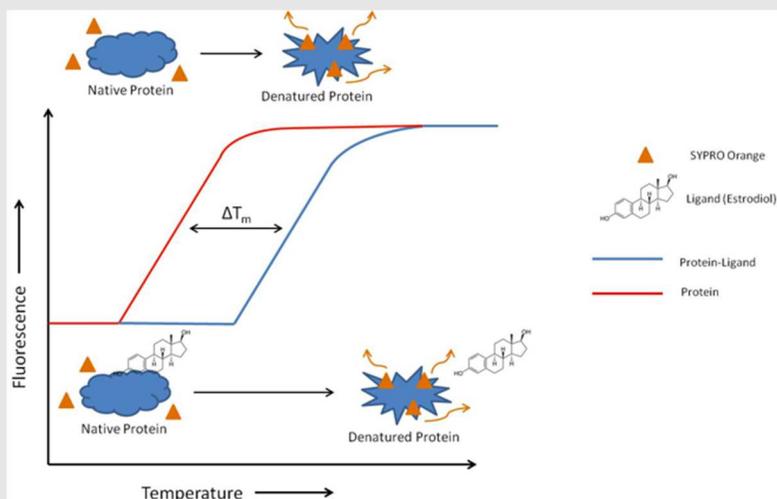


Imagen 34: el esquema muestra una curva típica de un experimento de DSF. En abscisas se muestra la temperatura y en el eje de ordenadas, la fluorescencia. En rojo se muestra la curva de desnaturalización de la proteína sola, y en azul, la curva de desnaturalización de la misma proteína en presencia de un ligando estabilizador. La diferencia entre ambas, este shift, si es positivo, significa que la presencia del ligando estabiliza la proteína. Imagen extraída de: website of Jeffrey L. Reinking, Ph.D.

La unión de moléculas de bajo peso molecular (ligandos) puede aumentar la estabilidad de una proteína, según lo descrito por Koshland en 1.958⁹⁸, y L.L & Schellman en 1.959⁹⁹. En este método, el cambio en la estabilidad térmica se mide propiciando la desnaturalización térmica en presencia de un marcador fluorescente, en nuestro caso, el Sypro Orange. Este marcador, se une de manera no específica a las superficies hidrofóbicas: a medida que la proteína se despliega, las superficies hidrofóbicas quedan expuestas y van uniéndose al marcador, lo que resulta en un aumento de la fluorescencia. Este aumento de fluorescencia se mide en una curva de estabilidad, y el punto medio es el que llamamos T_m (temperatura de melting) y se obtiene al ir aumentando de manera gradual la temperatura para desplegar la proteína y midiendo la fluorescencia en cada punto. El ensayo clásico se lleva a cabo en equipos que permitan controlar la temperatura y midan la fluorescencia, como por ejemplo, equipos de RT-PCR.

3.1.5.1. Ensayos de DSF.

Mediante la técnica del DSF se ensayaron los pares de proteínas CheY/CheA y CheY/CheYBScheA, así como tres compuestos interesantes que fueron vistos por Biacore. Para estos ensayos:

- La proteína utilizada se preparó de la misma manera que para los ensayos de Biacore: esta se encuentra en el buffer de la purificación de la Superdex75 (Tris·HCl pH8.0, 200mM NaCl) y se concentra hasta la concentración deseada con un Amicon de filtro tangencial.
- Los compuestos utilizados, igual que para el Biacore, se encuentran en un stock a concentración 100mM y 100% de DMSO. Se ensayarán a concentración 100μM final.
- CheA se probará a concentración 2μM y CheY y CheYBScheA se probarán a 1μM.
- Sypro Orange se diluirá 1/5000 (se comercializa a 5000X), de esta manera, se utilizará 1X.
- La concentración final de DMSO será del 1%.
- El ensayo se realizará en placas de 96 pocillos, con un volumen final de 25μL/pozo.
- Utilizamos el LightCycler de Roche para los ensayos. Ajustamos los valores pertinentes en los *settings* del programa: temperatura inicial 20°C, temperatura final 85°C. El programa mismo calcula la rampa de temperatura adecuada para tal aumento de temperatura:

| Target (°C) | Acquisition Mode | Hold | Ramp Rate | Acquisitions (per °C) |
|-------------|------------------|------|-----------|-----------------------|
| 20 | None | 15'' | 4,4 | / |
| 85 | Continuous | / | 0,01 | 45 |
| 20 | None | 15'' | 2,2 | / |

3.1.6. Termoforesis a Microescala

El método de la **Termoforesis a Microescala (MST)** fue desarrollado por NanoTemper. Es una manera fácil, rápida y bastante precisa de cuantificar las interacciones biomoleculares. Mide el movimiento de las moléculas a través de gradientes de temperatura microscópicos, y detecta cambios en su capa de hidratación, tamaño o peso. Permite medir un enorme rango de interacciones moleculares bajo condiciones nativas: tampoco precisa marcaje, ni inmovilizar alguno de los analitos, o algún buffer complejo. Estas características lo convierten en una tecnología ideal para investigación básica, o farmacéutica que incluya investigación con moléculas pequeñas. Un láser infrarrojo genera los gradientes microscópicos de temperatura en unos capilares que contienen la muestra a analizar. Las moléculas fluorescentes son las que se utilizan para monitorizar el movimiento de las moléculas a través de los gradientes de temperatura, bien sea, fluorescencia intrínseca, o por un colorante que se ha añadido a la muestra. Cualquier cambio en la capa de hidratación, producido por cambios en alguna estructura, afectará al movimiento termoforético, y es lo que se acostumbra a utilizar para determinar afinidades de unión de manera precisa.

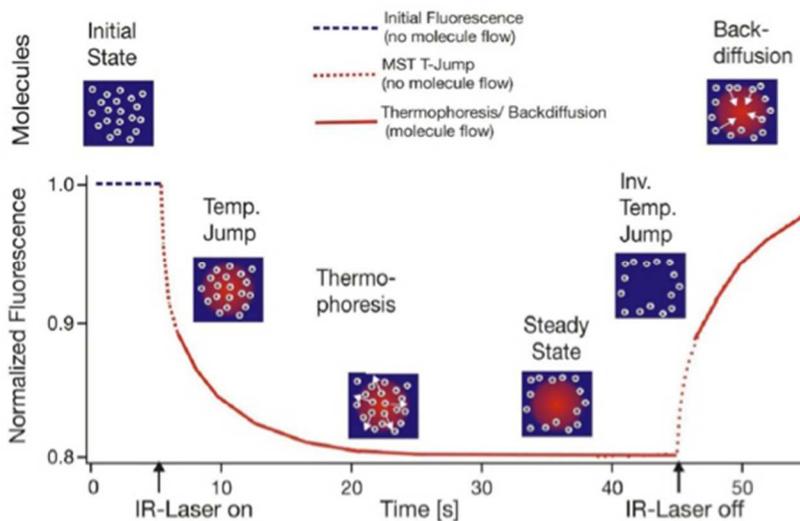


Imagen 35: vemos un termograma típico: estado inicial, termoforesis, momento estable, y vuelta al punto inicial. La curva resultante después de la termoforesis puede ser positiva o bien, negativa, dependiendo de la diferencia en la fluorescencia inicial con la final. Imagen de www.nanotemper-technologies.com

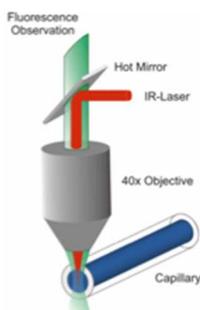


Imagen 36: vemos el detalle de cómo funciona la medición: el láser infrarrojo incide en el capilar, calienta la muestra, y la fluorescencia emitida es observada.

Imagen de www.nanotemper-technologies.com

Esto es lo que hace de la MST una técnica diferente al resto: la dependencia de la energía de la capa de hidratación, lo que le confiere una gran sensibilidad a la hora de medir interacciones moleculares.

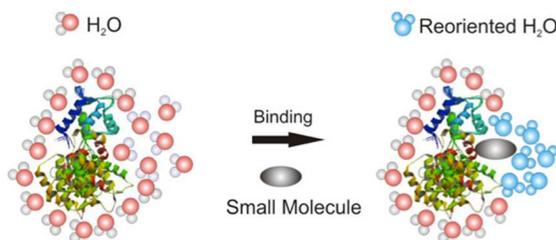


Imagen 37 En la imagen se aprecian las moléculas de agua que envuelven una proteína, tras la unión con una molécula pequeña, varias moléculas de agua son desplazadas, o como aquí se llaman “reorientadas”.

Imagen de www.nanotemper-technologies.com

Una de las moléculas, si no es fluorescente o no viene como proteína de fusión acoplada a la GFP, se marca con un dye fluorescente (Alexa fluor). Para las diferentes medidas, la molécula asociada al fluoróforo es la que se mantiene constante, mientras que se varía la concentración de la otra molécula implicada en la unión. Los capilares se llenan con 4µL de cada una de las soluciones. El

láser creará un gradiente de temperatura local, que propiciará los cambios locales en la intensidad de la fluorescencia, debido al movimiento de las moléculas de gas que se encuentran en los capilares. Cuando encendemos el láser, las moléculas experimentan una fuerza electroforética que las empuja a moverse fuera del punto de irradiación del láser, una vez se apaga el láser, las moléculas vuelven a adoptar una distribución homogénea. Este parámetro también se mide, junto con la señal fluorescente antes de encender el láser.

En cada rack caben 16 capilares diferentes, en los que se irá variando la concentración de la molécula no-marcada. Después de comparar la señal obtenida de todos y cada uno de los capilares, el programa desarrolla la correspondiente curva termoforética.

3.1.6.1. Ensayos de Termoforesis

Esta parte se lleva a cabo en colaboración con el grupo del Prof. Leonardo Scapozza, en la Universidad de Ginebra (Suiza).

Para estos ensayos utilizaremos CheY y CheYBScheA puras, provenientes de la Sdex75, a los cuáles se ha eliminado el tag por digestión con trombina. Primeramente dializamos las muestras, para cambiar el buffer en el que se encuentran, puesto que el Tris no es el adecuado para los experimentos de termoforesis. El nuevo buffer en el que se encontrarán las proteínas será 10mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl. Concentraremos varias veces las muestras usando un Amicon de Mwco 10kDa, mientras vamos añadiendo el nuevo buffer, de esta manera, al final de X ciclos, la muestra estará contenida en este nuevo buffer, y no habrá rastro de Tris. CheA será la que marcaremos con el dye fluorescente a ratio 10 μ M de CheA+25 μ M de dye, 1:1 en volumen. Incubamos la mezcla durante 45minutos a temperatura ambiente, según especifican los protocolos de marcaje de NanoTemper. Comprobamos si la proteína marcada se encuentra dentro de los rangos de emisión de fluorescencia deseada (entre 200 y 1.500 unidades de fluorescencia).

Sistema CheA/CheY: Realizamos una dilución 1/100 de CheA, y esta que está marcada, la añadiremos a volumen constante, en los eppendorfs que contienen la dilución seriada de CheY (de 30nM a 1mM). De estas mediciones, podremos extraer la Kd del sistema.

Sistema CheA/CheY + compuestos: Repetimos lo mismo con los compuestos, esta vez, añadimos volumen constante de Chea marcada a los eppendorfs que contienen CheY dilución seriada y concentración constante de los “activadores potenciales”, a 5 μ M. El programa de análisis de datos, nos dará la Kd del sistema en presencia de este compuesto.

3.1.7. Cristalografía

*La **cristalografía** se dedica al estudio y la resolución de estructuras cristalinas, en general. Nosotros nos interesamos por las estructuras cristalinas de macromoléculas, como proteínas¹⁰⁰, complejos de proteínas, o bien, la unión proteína/compuesto^{101,102}. La mayoría de moléculas adoptan formas cristalinas cuando se encuentran en condiciones favorables. Una vez se ha formado el cristal, este permitirá saber la disposición de los átomos por difracción de rayos X¹⁰³. Estos patrones de difracción de rayos X se analizan por ordenador para resolver la estructura, y una vez resuelta la estructura cristal, se deposita en el PDB. Actualmente, podemos encontrar en el PDB más de 45.000 estructuras moleculares.*

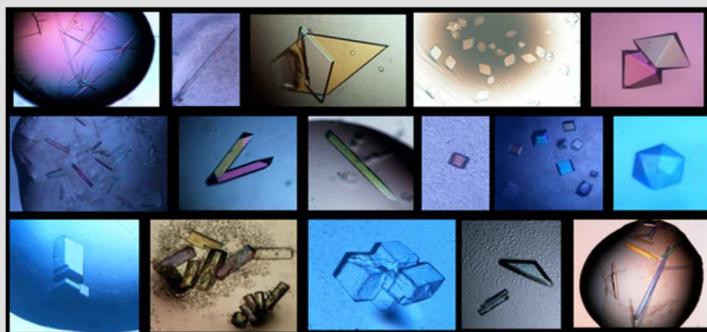


Imagen 38: Esta imagen muestra diferentes ejemplos de estructuras cristal: icosaédricas, en forma de barras, placas, cubos... Imagen de www.mdpi.com

Nuestro punto de partida aquí, es la estructura con código PDB 1a0o, para el complejo CheY/CheA-P2. Para comprobar si los compuestos diseñados se dirigen a la cavidad localizada mediante fpocket y comprobada mediante MDMix, queremos resolver la estructura cristal del complejo ternario: CheY/CheYBSCheA/compuesto.

Tras diferentes intentos para conseguir resolver la estructura cristal del dímero CheY/BS (que ya está resuelto), vimos que la manera más eficaz de hacerlo requería de un paso previo a la obtención de ambas proteínas puras y sin el doble His-tag: una vez tenemos ambas proteínas puras y concentradas, las concentramos a muy baja resolución, las dos juntas, para propiciar su unión, a 2.000RPMs con un Amicon de Mwco 10kDa. De igual manera que hicimos anteriormente, cuando hemos concentrado suficiente, pasamos el complejo por una columna de size-exclusion:

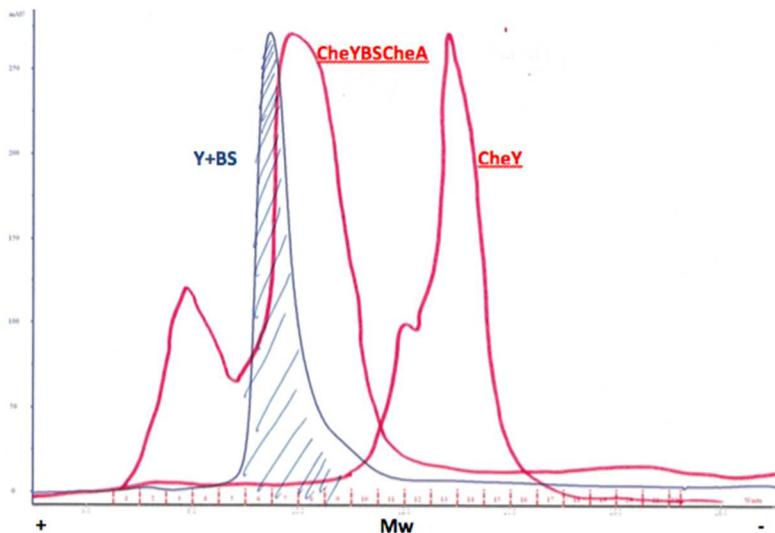


Imagen 39: Ejemplo de cromatograma resultante de la purificación del complejo CheY/BS, vemos que el pico, correspondiente al complejo eluye antes de los 10mL, lo cuál es anterior a CheY y a BS por separado.

Columna size-exclusion: Utilizamos una Superdex75 10/300 (GE Healthcare), para que las proteínas eluyan según su peso, empezando por las de mayor tamaño (el pico que contenga el dímero eluirá antes que las proteínas por separado).

- Buffer: 20mM Tris-Hcl pH8.0, 200mM NaCl.
- Flow 0.5mL, Alarma de Presión: 1.8MPa, Fraction size: 0.5mL.

Cargamos la muestra en el loop y equilibramos la columna con 1,2vc de buffer. Recogemos las fracciones y las comprobamos mediante un gel SDS-PAGE.

3.1.7.1. Cristalización del complejo CheY/BS

Concentramos las fracciones que contienen el complejo hasta 10g/l (que es la concentración a la que se suelen poner gotas) y preparamos varias placas de screening de condiciones, puestas en el servicio PAC del PCB-UB con el robot Cartesian, en placas de 96 pozos, con controles y monitorizando su crecimiento gracias al robot a 20°C Crystal Farm. De aquí, seleccionamos algunas condiciones prometedoras, entorno a las que realizamos mejoras para obtener cristales de mayor calidad.

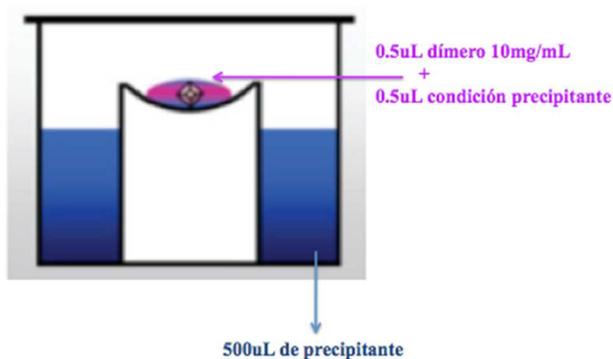


Imagen 40: Dibujo de uno de los 24 pocillos de gota sentada que se encuentran en una placa. En azul, vemos el precipitante, y en rosa, la gota depositada sobre el pedestal formada mitad de proteína en su buffer, mitad condición del precipitante.

Sobre estas condiciones iniciales, realizamos mejoras: variamos levemente el pH y la concentración de sales, así como también el tamaño de la gota o la relación gota:condición. Ponemos gotas de 0.5µL de proteína + 0.5µL de condición, en placas de 24 pocillos, en forma de gota sentada, con 500µL de condición en el *reservoir*. Y después de una semana incubándose en posición horizontal en la cámara de 20°C, los cristales empiezan a aparecer.

De aquí aparecen cristales con buen tamaño, que corresponden a la condición: **30% PEG3350, 0.1M Bis-Tris pH 5.75**. Congelamos varios cristales en nitrógeno líquido, y se llevaron a difractar al sincrotrón ALBA-UAB.

3.1.7.2. Co-cristalización del complejo ternario

En base a esta condición de cristalización preparamos un screening del compuesto ternario formado entre las proteínas CheY/CheYBScheA y los “activadores potenciales” que han dado positivo por Biacore y Termoforesis.

Aquí, probamos los compuestos de interés de dos maneras diferentes: primeramente, probamos los compuestos incubándolos previamente con CheY, añadiendo después la cantidad equivalente de CheYBScheA, y en segundo lugar, añadiendo los compuestos como si fuesen aditivos: tras añadir el dímero a 10mg/mL, añadimos el compuesto, y que este suponga un 10% del volumen de la gota. Los dos “activadores potenciales” se probaron a dos concentraciones diferentes: el más soluble, a concentraciones 200 μ M y 1mM; y el menos soluble a 200 μ M y 500 μ M. Para estas pruebas de co-cristalización también se probaron los 4 fragmentos anteriormente mencionados a dos concentraciones diferentes: 1mM y 10mM.

3.1.7.3. Soakings

Paralelamente, preparamos 100 gotas más del complejo, de la misma condición que llevamos a difractar, para probar *soakings*¹⁰⁴ de los compuestos y fragmentos. Para los *soaks*, incubamos en cada pozo de esta condición en la que ha crecido cristales, con 10mM y 1mM de cada uno de los fragmentos, a diferentes tiempos; y con 200 μ M y 500 μ M de los dos compuestos y lo incubamos a 20°C y a diferentes horas. Pasado el tiempo de incubación, recogemos los cristales y los congelamos con nitrógeno líquido.

ENSAYOS IN VIVO

Como hemos explicado en la introducción, el sistema de estudio CheA/CheY está implicado en la chemotaxis bacteriana, de manera que si alteramos el sistema, podría ser posible alterar su motilidad y que esta fuese visible de manera macroscópica. Para estos ensayos in vivo con E.coli, utilizaremos una cepa knock-out para el gen TolC.

TolC es un efflux pump, un transportador transmembrana implicado en la extrusión de sustancias tóxicas de la célula. De manera natural, actúan en la detoxificación de la célula, empujando hacia fuera los tóxicos que entran. Esta cepa, TolC- no podrá eliminar los compuestos, una vez estos hayan entrado en la célula, de manera que nos aseguramos de que los compuestos entren en la célula y hagan su función^{105, 106, 107}.

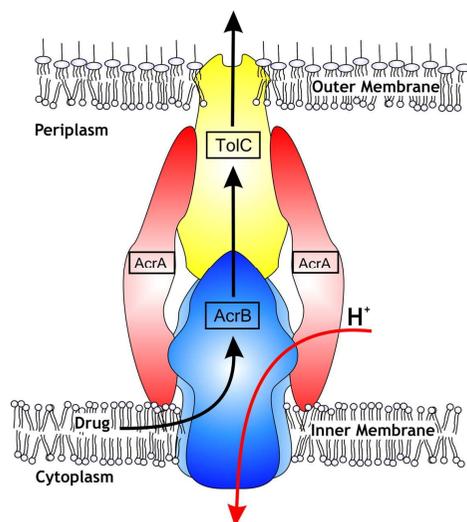


Imagen 41: Esquema del receptor TolC transmembrana. Actúa conjuntamente con AcrB: el tóxico sale, con la entrada de protones¹⁰⁸.

Imagen de: <http://www.pnas.org/content/106/17/6893/F1.expansion.html>

3.1.8. Ensayos de Motilidad

3.1.8.1. Ensayos de Viabilidad

Primeramente, antes de empezar con los ensayos de motilidad, queremos comprobar que los compuestos no afectan a la viabilidad y división celular. Para ello, montamos un ensayo de viabilidad celular, en el cuál, cultivamos en tubos de ensayo TolC- con $10\mu\text{M}$ de cada uno de los compuestos. Realizamos 3 réplicas para cada uno de los compuestos y para los controles, a los cuáles añadimos el mismo volumen pero de DMSO y medimos la O.D_{600} después de que hayan estado durante 4h a 37°C y 200RPMs. Aplicamos la T-student para saber si existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos.

3.1.8.2. Ensayos de Motilidad en Agar Semisólido

El Agar motil o Semisólido^{109,110}, es un medio de cultivo que está a medio camino entre el cultivo sólido y el cultivo líquido, ya que contiene poco agar. El medio es consistente, pero menos denso, lo que permite a las bacterias moverse libremente.

Preparamos las placas de agar motil con medio mínimo: 0.25% agar, 1% NaCl, 1% Triptona. Una vez autoclavado y atemperado, añadimos el antibiótico y $100\mu\text{M}$ de cada uno de los compuestos “activadores potenciales”. Llenamos las placas de 10cm de diámetro, con 10mL de cultivo, y lo dejamos solidificar en una superficie plana. Paralelamente preparamos el cultivo líquido con *E.coli TolC-* en medio LB (1% NaCl, 1% Triptona y 0.5% extracto de levadura) con antibiótico. Dejamos que el cultivo crezca a 37°C y 200RPMs hasta que la O.D_{600} sea 0.5. Una vez alcance el crecimiento exponencial, centrifugamos el cultivo durante 15 minutos a 5.000RPMs. Descartamos el sobrenadante y re-suspendemos el pellet en el mismo volumen, pero esta vez, de medio mínimo TS, que es el mismo que el del agar motil pero sin agar: 1% NaCl, 1% Triptona. Homogeneizamos, e inoculamos $5\mu\text{L}$ en el centro de una placa de agar motil. Plaqueamos por triplicado, y los controles, de igual manera que antes, contendrán sólo el volumen equivalente de DMSO. Incubamos las placas boca arriba y selladas con parafilm, a 30°C en posición horizontal, y vamos midiendo el halo que se forma al cabo de 16, 20 y 24h. Tras recoger los datos, aplicamos una T-student para ver si existen diferencias significativas o no entre los diferentes compuestos, a la hora de favorecer la motilidad bacteriana.

- Añadimos glucosa al medio.

Montamos un experimento similar al anterior, pero esta vez con medio LB total y con glucosa^{111,112}. Queremos ver si la presencia de glucosa, un conocido atrayente varía la motilidad bacteriana¹¹³. Preparamos placas de agar motil, algunas con 10mM de glucosa y con 10 μ M del compuesto #96. Paralelamente preparamos cultivos líquidos de TolC-, cuando estos cultivos estén a O.D₆₀₀ 0.5 se inoculan 10 μ L en el centro de cada placa y se incuban las placas a 30°C en horizontal, durante varios días.

3.1.8.3. Ensayos de Quimiotaxis. Cubetas hard-plug.

Ponemos a punto un método de detección de quimiotaxis bacteriana¹¹⁴ que consiste en medir la turbidimetría en cubetas espectrofotométricas. Estas cubetas estarán previamente lavadas en EtOH y posteriormente añadiremos agar motil hasta justo por debajo del haz de luz del espectrofotómetro¹¹⁵, unos 800 μ L de agar y dejaremos solidificar. La idea es que, si añadimos un atrayente bacteriano en el agar, las bacterias, que se encuentran en medio LB, se moverán hacia el atrayente (agar), de manera más rápida que por simple sedimentación y se acumularán en la zona de detección del espectrofotómetro.

En la mitad de las cubetas, añadiremos 100mM de glicina y la otra mitad serán control. Sobre estas cubetas añadiremos cultivo bacteriano en LB, y el medio contendrá los compuestos #30, #96 y #80 a 100mM al 1% final de DMSO. Preparamos cultivos de LB hasta que crezcan a una OD₆₀₀ 0.5; diluimos el cultivo hasta 0.1, y añadimos 500 μ L de este cultivo a la cubeta y medimos la OD₆₀ durante 600".

- Cubetas hard-plug en buffer PBS.

Modificamos un poco el ensayo, puesto que este no ha resultado como esperábamos, así que, por si el LB dificulta la motilidad, esta vez montamos las cubetas con buffer PBS pH7.4 en agar 2%, siguiendo el método de Julius Adler^{48, 114}.

3.1.9. Electroforesis PhosTag y Western-blot.

El **Phos-Tag**¹¹⁶ es una molécula funcional que se une específicamente a iones fosforilados. En este caso, nos centraremos en el **Phos-tagTM Acrylamide**. Estos métodos son útiles para determinar el estado de fosforilación de las proteínas^{117,118}. La molécula de Phos-tag se combina con iones zinc o magnesio, forma una molécula muy estable bajo condiciones fisiológicas (pH entre 5 y 8) y se añade como parte de los reactivos de formación de los geles de Acrilamida.

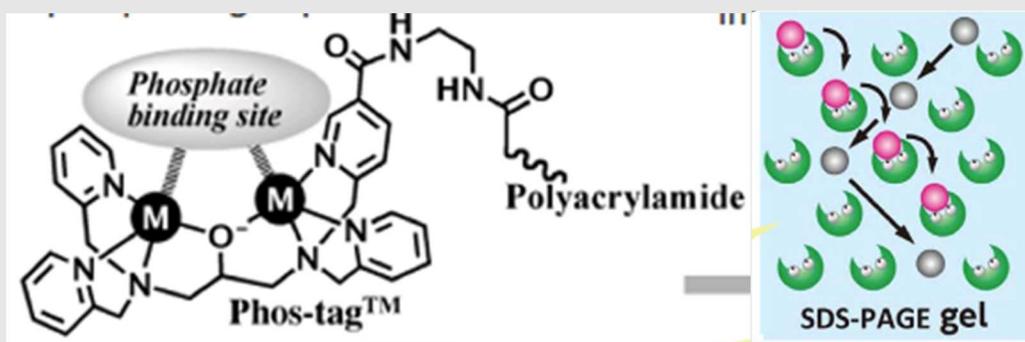


Imagen 42: A la izquierda, detalle de la molécula Phos-tag, y donde se unen los dos iones metálicos de magnesio, que serán los que se unirán de manera cooperativa al grupo fosfato de las proteínas fosforiladas. A la derecha, esquema de cómo se mueven las proteínas fosforiladas mientras están unidas al Phos-tag en el gel: las moléculas de Phos-tag contenidas en el gel se unen de manera covalente a las proteínas fosforiladas mientras corren por el gel y las retienen, de manera que las proteínas fosforiladas se presentarán en el gel como dos bandas en vez de una, siendo la banda superior la correspondiente a la fracción fosforilada. Diferentes isoformas de una misma proteína, con distinto número de fosforilaciones o fosforilación en diferentes situaciones, pueden ser también separadas mediante este método.

Imágenes extraídas de: www.wako-chem.co.jp

Aquí queremos detectar la CheY y CheA endógenas de la célula, así que trabajaremos con *E.coli TolC*, que cultivaremos en medio LB, a 37°C y 200RPMs. Cuando este se encuentre en fase exponencial, lo dividiremos en eppendorfs de 1.5mL a los cuáles añadiremos 100µM de cada uno de los compuestos, y lo incubaremos a 37°C y 200RPMs durante 1h más. Después pasaremos a lisar la muestra.

Preparamos los geles SDS-PAGE, uno al 10% de Acrilamida (CheA) y otro al 18% (CheY) según las instrucciones del vendedor:

| | REAGENT |
|------------------|-------------------------------------|
| RESOLVING | 1.8mL Tris·HCl pH8.8, 10%SDS buffer |
| | 2.8mL H2O |
| | 3.2mL Acrilamida 29:1 |
| | 20µL TEMED |
| | 80µL PSA |
| | 70µL Phos-Tag |
| | 70µL MnCl2 (10mM) |
| STACKING | 1mL Tris·HCl pH6.8, 10%SDS buffer |
| | 2.3mL H2O |
| | 0.76mL Acrilamida 29:1 |
| | 10µL TEMED |
| | 60µL PSA |

La preparación de la muestra para cargar en el gel será algo diferente, puesto que las fosforilaciones se pierden con el calor, y, estas en concreto, se pierden muy rápido: CheA dimeriza y se autofosforila de manera cruzada en la Histidina 39, mientras que CheA fosforila a CheY en el residuo Aspartato 59. La fosforilación en Histidina y Aspartato, es común en procariontes como parte de vías de señalización^{63,119}, pero las fosforilaciones en estos residuos duran muy poco, lo que dificulta su detección.

Tendremos que desnaturalizar la muestra, sin calor. Preparamos la muestra, siguiendo el protocolo de desnaturalización usado por Barbieri, C.M, et.al.: juntamos 500µL de cultivo + 100µL de ácido fórmico 6M (Según Barbieri, et.a.: por cada 5mL de cultivo, añadimos 1mL de ácido fórmico 6M, estará a 1M¹¹⁹). Homogeneizamos y centrifugamos la muestra a 4.000 RPMs durante 5 minutos a 4°C. Descartamos el sobrenadante, y resuspendemos el pellet en 50µL en 1M de ácido fórmico, y si no lo vamos a cargar en el gel de inmediato, lo guardamos a -80°C¹¹⁹. Antes de cargarlo en el gel, diluimos la muestra hasta una O.D₆₀₀ aproximada de 4 en una mezcla 61.5% ácido fórmico 1M, 33% Tampón de carga y 5.5%NaOH 1M. Al final, debería tener un pH de 6.0. Cargamos en el gel diferentes cantidades de extracto celular: 1µL, 2µL, 4µL,

8 μ L, 10 μ L, 12 μ L y 15 μ L. Corremos el gel, según instrucciones del vendedor, a 4°C y a 140V. Una vez el gel ha corrido por completo, y antes de montar la transferencia, lavamos la membrana con buffer de transferencia unto con 1mM EDTA con agitación suave durante 10 minutos, para eliminar el MnCl₂ que se encuentra en el gel. Después, equilibramos el gel, junto con la membrana y el resto de componentes de la transferencia, en el buffer de transferencia: 20% v/v Metanol, 50mM Tris, 40mM glicina) durante 10 minutos más, a temperatura ambiente y con agitación suave. Después montamos la transferencia y dejaremos que el gel se transfiera a la membrana over night a 4°C y a 50mA.

Corremos dos geles, por separado, uno al 10%, otro al 18% de Acrilamida, el primero será para CheA y el segundo para CheY. Lo ideal sería realizar el WB anti ambas proteínas en el mismo gel, pero debido a la diferencia de tamaño que existe entre ambas proteínas (CheA mide 78kDa y CheY 16kDa) no se pueden apreciar ambas bien en el mismo gel. Quitamos la membrana, la lavamos durante 10 minutos a temperatura ambiente, con agitación suave, en PBS. Empezamos el Western Blott:

- Bloqueamos la membrana durante 1h a temperatura ambiente en PBS-Tween con leche al 10%
- Incubamos la membrana con el anticuerpo primario anti-CheA a 1/100 en PBS-Tween 0.1% al 3% de leche, durante 1h a temperatura ambiente. (Anticuerpo cedido por el laboratorio del Dr. Matsumura⁵⁴)
- Lavamos la membrana 3 veces con PBS-Tween al 0.1% en agitación suave durante 10 minutos.
- Incubamos con el anticuerpo secundario anti-rabbit IR-Dye® de Li-Cor¹²⁰ a 1/15.000 en PBS-Tween 0.1% durante 45 minutos a temperatura ambiente y agitación suave.
- Lavamos la membrana 3 veces con PBS-Tween al 0.1% en agitación suave durante 10 minutos
- Lavamos una última vez con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitación suave, para eliminar el Tween antes de revelar.
- Repetimos el proceso para el WB anti-CheY:
- Bloqueamos la membrana durante 1h a temperatura ambiente en PBS-Tween con leche al 10%

- Incubamos la membrana con el anticuerpo primario anti-CheY a 1/5 en PBS-Tween 0.1% al 3% de leche, durante 2h a temperatura ambiente. (Anticuerpo cedido por el laboratorio del Dr. Matsumura⁶⁰)
- Lavamos la membrana 3 veces con PBS-Tween al 0.1% en agitación suave durante 10 minutos
- Incubamos con el anticuerpo secundario anti-mouse IR-Dye® de Li-Cor a 1/15.000 en PBS-Tween 0.1% durante 45 minutos a temperatura ambiente y agitación suave.
- Lavamos la membrana 3 veces con PBS-Tween al 0.1% en agitación suave durante 10 minutos.
- Lavamos una última vez con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitación suave, para eliminar el Tween antes de revelar.

Revelamos ambos geles con el software de Odyssey de LiCor, primeramente visualizando y revelando a IR 700nm (verde) y luego a IR 800 (rojo), regulando el revelado para eliminar la fluorescencia inespecífica¹²¹.

ENSAYO IN VITRO

3.1.10. Ensayo de Fosforilación *in vitro*.

Con este **ensayo de fosforilación in Vitro**, queremos comprobar si cuando afectamos a la unión entre CheY/CheA estamos afectando a la fosforilación de ambas proteínas, o de alguna de ellas, puesto que en el momento en el que interactúan es cuando CheA fosforila a CheY. Para ello, utilizamos un kit de Sigma ®: ADP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit Sigma-Aldrich MAK033. Dicho kit nos permitirá medir la cantidad de ADP que se produce por la acción de ATPasas, como en este caso, CheA. Utilizamos el kit, según las instrucciones del vendedor, pero añadiendo además, ATP.

El kit contiene:

- ADP Assay Buffer, que será el buffer de la reacción, en el que diluiremos todos los agentes del kit.
- ADP Standard, para calibrar el ensayo.
- ATP (solucion stock 2000nm)
- ADP Probe, ADP Converter y ADP Developer, que utilizaremos para revelar una vez la reacción se haya llevado a cabo, de manera que reaccione con el ADP libre, y midamos la cantidad en función del fluoróforo que se libera.

Para este ensayo utilizaremos CheA y CheY puras, purificadas mediante equipos Äkta, tal como hemos explicado anteriormente. En esta ocasión utilizamos CheA y no CheYBSCheA, puesto que para fosforilar a CheY se precisa CheA entera y no sólo el dominio P2. En dos filas de la placa, de acuerdo con las instrucciones del proveedor, montamos una recta patrón a concentraciones crecientes de ADP por duplicado:

| nmol/well Standard | 0 | 0.2 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 1 |
|-----------------------|----|-----|-----|-----|-----|----|
| ADP standard solution | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| ADP Assay Buffer | 50 | 48 | 46 | 44 | 42 | 40 |

Al otro lado de la placa, empezaremos por un ensayo corto para determinar las concentraciones de CheA y CheY que mejor resultado den, siempre manteniendo la ratio CheA:2CheY.

| | 0.6 uM A + 1.2 uM Y | 1.2 uM A + 2.4 uM Y | 2.5 uM A + 5 uM Y | 5 uM A + 10 uM Y | Control |
|-------------------------|---------------------|---------------------|-------------------|------------------|---------|
| ATP stock | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| MgCl₂ | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| CheA stock | 0.6 | 1.2 | 2.5 | 5 | 0 |
| CheY stock | 1 | 2 | 4.2 | 8.3 | 0 |
| Buffer (HBSN) | 47.4 | 45.8 | 42.3 | 35.7 | 49 |
| TOTAL | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |

Por triplicados. Incubamos con ATP y MnCl₂ hasta un volumen final de 50µL, y lo dejamos a 30°C durante 30 y 60 minutos, para determinar a qué tiempo va mejor la fosforilación. Pasado este tiempo, incubamos durante 5 minutos a 70°C para parar la reacción. Añadimos 50µL más de la solución reveladora (ver contenido en la tabla inferior), incubamos a temperatura ambiente durante 30 minutos y protegido de la luz, y finalmente leemos la placa.

| | |
|------------------|---------|
| ADP Assay Buffer | 45.8 uL |
| ADP Probe | 0.2 uL |
| ADP Converter | 2 uL |
| ADP Developer | 2 uL |

Después de esta primera lectura, determinamos las concentraciones más adecuadas, y montamos las reacciones finales, junto con los compuestos, a diferentes concentraciones, en eppendorfs, pero después las leeremos por triplicado:

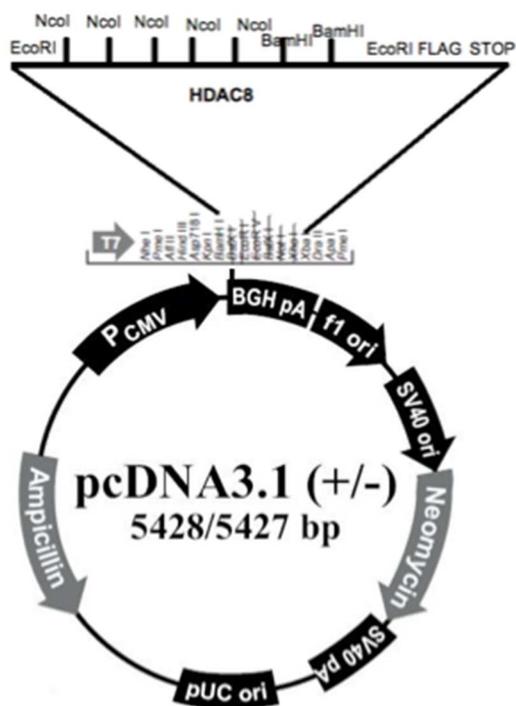
| COMPOUND | CONCENTRATIONS (µM) | | | | | | |
|----------|---------------------|------|-----|----|----|----|-----|
| 30 | 0 | 0.25 | 2.5 | 10 | 20 | 50 | 100 |
| 96 | 0 | 0.25 | 2.5 | 10 | 20 | | |

Añadiendo blancos sin proteína también. Incubamos la reacción durante 30 minutos a 30°C, paramos la reacción incubando los eppendorfs durante 5 minutos a 70°C y después revelamos la solución añadiendo 50uL más de solución reveladora. Incubamos durante 30 minutos más a temperatura ambiente, y pasamos a leer fluorescencia a 535nm excitación y 587nm emisión.

3.2. Mecanismos Alostéricos de Regulación en HDAC8 a Través de Mutantes.

3.2.1. Vector y Mutaciones

Solicitamos a Addgene el vector del Dr. Eric Verdin. El inserto está clonado en el pcDNA3.1(+) entre *BstXI* y *XhoI* del MCS, y contiene el octapéptido FLAG en el C-terminal. Entre el cDNA de HDAC8 y el FLAG se insertó una diana *EcoRI*, que flanquea el cDNA también por el 5'. El constructo resultante tiene 6,7kb de tamaño. (imagen del constructo resultante a la derecha)



Los primers para la mutagénesis fueron pedidos a SIGMA, diseñados con una longitud de entre 25-45pb y centrando las bases a mutar, Siguiendo las instrucciones de *QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* de Stratagene.

| NOMBRE PRIMER | SECUENCIA 5'→3' |
|---------------|--------------------------------|
| R353A FW | cgccaagctgcGCgccagaccgcaatgagc |
| R353A RV | gctcattgcggtctggcgcgagcttggcg |
| D233A FW | ccctgcacaTGttctcccaggattttcc |
| D233A RV | ggaaaaatcctggggagaacatgtgcaggg |
| F207A FW | attctcccaggaGcttcccaggaacagg |
| F207A RV | cctgttcctgggaagctcctggggagaat |
| K202M FW | gaccgtgtccctgcacatgttctcccagg |
| K202M RV | gaccgtgtccctgcacatgttctcccagg |

Tabla 2: detalle de los pares de primers utilizados para la mutagénesis.

Las mutagénesis se llevaron a cabo según las instrucciones del kit, añadiendo los reactivos: DNA molde, primers, dNTPs, *Pfu* y buffer. La reacción de PCR se lleva a cabo siguiendo los ciclos de temperatura que aconseja el kit:

| Segment | Cycle | Temperature | Time |
|---------|-------|-------------|-------|
| 1 | 1 | 95°C | 1' |
| 2 | 18 | 95°C | 50" |
| | | 60°C | 50" |
| | | 68°C | 1'/kb |
| 3 | 1 | 68°C | 7' |

Tras las 2/3h de la reacción de PCR, digerimos el DNA metilado/hemimetilado con *DpnI* durante 1h a 37°C para eliminar el DNA inicial (no mutado). El material resultante se transformó en células ultracompetentes, y se cultivó en medio LB o/n y de estos cultivos se obtuvieron *minipreps* con el kit *High Pure Plasmid Isolation* de Roche®. Estas minis, se comprobaron por secuenciación (en el CRAG/CID-CSIC), en la mayoría de los casos, y el mutante R353A, se comprobó también por digestión, puesto que con el cambio de R por A se genera la diana *Paul*.

F207A (T7)

AQLQVVNLSLVPSSDPNS **Met**EEPEEPADSGQSLVPVYIYSPEYVS **Met**CDSLAKIPKRAS **Met**VHSLIEAYALHKQ **Met**RIVKPKVAS **Met**EE **Met**ATFHTDAYLQHLQKVSQEGDDDDHPDSIEYGLGYDCPATEGIFDYAAAIGGATITAAQCLIDG **Met**CKVAINWSGGWHHAKKDEASGFCYLNDAVLGILRLRRKFERILYVDLDLHHGDGVEDAFSFTSKV **Met**TVSLHKFSPG **A**FPGTFSFGAFPGTGDVSDVGLGKGRYYSVNVPIQDGIQDEKYYQICESVLKEVYQAFNPKAVVLQLGADTIAGDP **Met**CSFN **Met**TPVGIGKCLKYILQWQLATLILGEEANLANTARCWTYLTGVILGKTLIL

D233A (T7)

AAADVNLVSLVPSSDPNS **Met**EEPEEPADSGQSLVPVYIYSPEYVS **Met**CDSLAKIPKRAS **Met**VHSLIEAYALHKQ **Met**RIVKPKVAS **Met**EE **Met**ATFHTDAYLQHLQKVSQEGDDDDHPDSIEYGLGYDCPATEGIFDYAAAIGGATITAAQCLIDG **Met**CKVAINWSGGWHHAKKDEASGFCYLNDAVLGILRLRRKFERILYVDLDLHHGDGVEDAFSFTSKV **Met**TVSLHKFSPGFFPGTGDVSDVGLGKGRYYSVNVPIQ **A**GIQDEKYYQICESVLKEVYQAFNPKAVVLQLGADTIAGDP **Met**CSFN **Met**TPVGIGKCLKYILQWQLAHSFWEEAITLPTRLDAGHT **Stop**PGSS **Stop**GKTF

R353A (BGHrev)

VKPKVAS **Met**EE **Met**ATFHTDAYLQHLQKVSQEGDDDDHPDSIEYGLGYDCPATEGIFDYAAAIGGATITAAQCLIDG **Met**CKVAINWSGGWHHAKKDEASGFCYLNDAVLGILRLRRKFERILYVDLDLHHGDGVEDAFSFTSKV **Met**TVSLHKFSPGFFPGTGDVSDVGLGKGRYYSVNVPIQDGIQDEKYYQICESVLKEVYQAFNPKAVVLQLGADTIAGDP **Met**CSFN **Met**TPVGIGKCLKYILQWQLATLILGGGGYNLANTARCWTYLTGVILGKTLSSSEIPDHEFFTAYGPDYVLEITPSC **A**PDRNEPHRIQQLNYIKGNLKHVVEFGGDYKDDDDK **Stop**SEAR **Stop**NRL

K202M (BGHrev)

GIVKPKVAS **Met**EE **Met**ATFHTDAYLQHLQKVSQEGDDDDHPDSIEYGLGYDCPA
TEGIFDYAAAIGGATITAAQCLIDG **Met**CKVAINWSSGGWHHAHKDEASGFCYL
NDAVLGILRLRRKFERILYVDLDLHHGDDGVEDAFSFTSKV **Met**TVSLH **Met**FSP
GFFPGTGDVSDVGLGKGRYYSVNVPIQDGIQDEKYYQICESVLKEVYQAFNPK
AVVLQLGADTIAGDP **Met**CSFN **Met**TPVIGIKCLKYILQWQLATLILGGGGYNL
ANTARCWTYLTGVILGKTLSSSEIPDHEFFFTAYGPDYVLEITPSCRPDREPHRI
QQILNYIKGNLKHVVEFGGDYKDDDDK **Stop**SEARSTG **Stop**

Imagen 44: Comprobación por secuenciación de las diferentes mutaciones. Producto de secuenciación enviado por el servicio del CIRAD/CID-CSIC, detalle de las transcripciones utilizando *ExPASy Translate Tool* de www.expasy.com. Las dos primeras se secuenciaron con el primer T7fw, y las dos segundas, con el primer BGHrev.

3.2.2. Expresión de HDAC8 wt y Mutantes

Para expresar HDAC8 wt y el resto de mutantes, seguimos dos métodos diferentes. El primero, a través de un kit *cell-free* de Thermo Scientific® para expresión de proteínas humanas. Este método no resultó, así que finalmente se optó por la expresión tras la transfección por el método del fosfato cálcico en células humanas HEDK293T.

> **Expresión con kit *cell-free* expression (Human) de Thermo Scientific®:** para la expresión utilizamos el kit "Human In Vitro Protein Expression Kit for DNA Templates". Mediante este kit se lleva a cabo la expresión en dos pasos: Transcripción y Traducción y contiene todo lo necesario para ello: dNTPs, buffer de Transcripción, T7 RNA polimerasa, lisado celular, mix de aminoácidos, inhibidor de RNAsas y buffer de Traducción¹²².

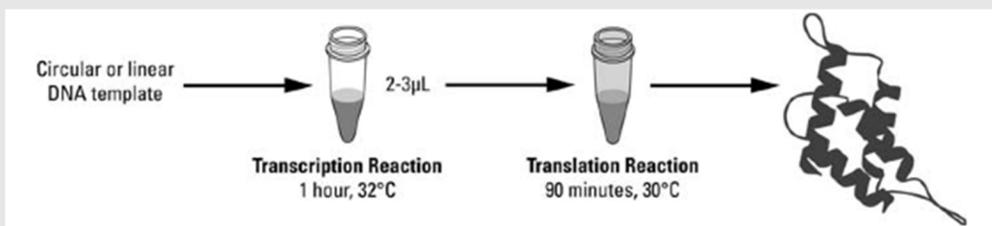


Imagen 45: Esquema de la reacción. Imagen de: <http://www.piercenet.com/method/cell-free-protein-expression>

Seguimos las instrucciones del proveedor, y para poner a punto el método realizamos varias pruebas de Transcripción y Traducción a diferentes tiempos y temperaturas para encontrar el tiempo y la temperatura a la cuál tenemos mayor expresión. Tras estas pruebas, determinamos que la temperatura ideal para ambos procesos es 30°C. En lo que al tiempo respecta, la Transcripción se lleva a cabo en una hora y la Traducción en 4 horas.

- ❖ **TRANSCRIPCIÓN:** incorporamos a un eppendorf estéril los siguientes componentes, en este mismo orden, hasta un volumen final de 25µL y lo incubamos durante 1h 15' a 30°C en el baño:

| | HDAC8·Flag o mutantes |
|--------------------|------------------------------|
| 5x Buffer | 4µL |
| dNTP | 4µL |
| RNA T7pol | 2µL |
| DNA mini | 10µL (1ng) |
| H2O RNAfree | 5µL |

Como control positivo, añadimos un vector que contiene GFP y que también proporciona el kit. Guardamos 4µL de cada eppendorf para la TRADUCCIÓN (2µL al inicio + 2µL a las 2h de incubación) y el resto lo cargamos en un gel de agarosa para comprobar el RNA. (Cargamos 15µL de muestra y corremos el gel de agarosa durante 1h a 100V).

- ❖ **TRADUCCIÓN:** una vez comprobamos que la transcripción funciona y se aprecia en el gel, la banda superior perteneciente al DNA y la banda inferior correspondiente a los diferentes RNAs, preparamos la reacción de traducción.

Añadimos los componentes, en el orden que aparece en la tabla, y lo incubamos en el baño a 32°C durante 5h (pasadas 2h, añadimos 2µL más de RNA).

| | pT7·HDAC8·Flag |
|----------------------------|-----------------------|
| Lisado cel. | 12.5µL |
| RNAs | 2.5µL |
| H2O RNA free | 3.75µL |
| Sal_A | 1µL |
| AA -met | 0.5µL |
| AA -leu | 0.5µL |
| Inhibidor de RNAsas | 1µL |
| Energy mix | 1.25µL |
| Transc.mix | 2µL |

Guardamos el extracto celular con las diferentes HDAC8 expresadas a -80°C alicuotadas, para el posterior Western Blott.

*> **Transfección con fosfato cálcico:** en la transfección, se realiza una mezcla del DNA con iones calcio, y este se va añadiendo poco a poco sobre una mezcla de fosfato (HEBBS) que está en agitación, de manera que poco a poco se vaya formando el precipitado de fosfato cálcico que encierra el DNA. Estos iones serán endocitados por las células. Así, la célula incorporará el DNA externo^{123,124}.*

Cultivamos células HEK293T en placas de petri de 10cms de diámetro y 10mL de medio DMEM con FBS al 10%. Transfectamos: 2µg de PCIG-CFP + 6µg de HDAC8 mutante o 1.5µg de HDAC8 wt (se expresa unas 4 veces más que los mutantes) en placas confluentes, mediante el método del fosfato cálcico. Recogemos células a diferentes tiempos para determinar cuál es el tiempo óptimo de expresión y el resultado es el siguiente: pasadas 24h tras la transfección cambiamos el medio, debido a que el fosfato cálcico provoca la acidificación de este. Las células fueron recogidas a las 72h totales (24h cambio de medio + 48h más en el incubador), tras comprobar bajo el microscopio si la GFP se expresa en un 70-80% células.

Aspiramos el medio, lavamos con PBS y lisamos las células con RIPA e inhibidores de proteasas (aprotinina y ortovanadato) e inhibidores de fosfatasas (leupeptina). Recogemos las células, lisamos con RIPA y recogemos el sobrenadante. Este será el extracto con el que

trabajaremos, lo alicuotamos y guardamos a -80°C . Cargaremos este extracto en un gel de acrilamida para realizar un Western Blott anti-Flag y comprobar la presencia de HDAC8.

3.2.3. Fosforilación por PKA

Queremos ver si las diferentes mutaciones afectan al nivel de fosforilación de HDAC8 por PKA. Así que incubamos los diferentes extractos celulares con PKA (cAMP-dependent Protein Kinase catalytic subunit, P6000S from NEBS) y $200\mu\text{M}$ de ATP durante 1h a 37°C . El nivel de fosforilación de HDAC8 wt y los diferentes mutantes se estudió mediante Western Blott y la actividad asociada se cuantificó mediante un kit comercial y posterior revelado en fluorímetro.

3.2.4. Western blot

Western Blot y posterior revelado con film fotográfico: *preparamos el Western Blot anti-Flag:*

- En un gel SDS-PAGE al 10% de Acrilamida y 1.5mm de grosor, cargamos las muestras tras calentarlas con tampón de carga a 95°C . Corremos el gel a 30mA y lo transferimos a una membrana de nitrocelulosa a 80V durante 120'. Buffer de Transferencia: Tris-glicina al 10% SDS y 20% Metanol.
- Bloqueamos la membrana con leche al 5% incubamos con el anticuerpo primario anti-flag a 1/5.000 en PBS con leche al 5%
- Lavamos la membrana e incubamos con el secundario anti-mouse con fosfatasa alcalina durante 1h a temperatura ambiente. Incubamos dos minutos con la solución de revelado y exponemos el film 1 minuto para su revelado.

Comprobamos que HDAC8 se expresa, tanto en la wt como los mutantes. Decidimos realizar otro tipo de Western Blot que será semi-cuantitativo, lo que nos permitirá comparar niveles de expresión para normalizar los valores del ensayo de actividad.

Western Blot y posterior revelado con Odyssey™ de LiCor®: este escáner de LiCor permite revelar Western Blotts detectando la fluorescencia infrarroja. Se utilizan anticuerpos secundarios que llevan asociados fluoróforos infrarrojos, que se detectan en el revelado. De esta manera, la señal que se capta es directamente proporcional a la cantidad de proteína, así que podemos cuantificar proteínas en un amplio rango de concentraciones. Además, permite detectar dos dianas diferentes a la vez en la misma membrana, lo que permite la co-localización¹²⁵. (www.licor.com)

Para el WB se utilizó anti-FLAG-M2 (Sigma) para detectar HDAC8, y anti-pSer39 (ECM Bioscience™) para detectar HDAC8 fosforilada.

- En un gel SDS-PAGE al 10% de Acrilamida y 1.5mm de grosor, cargamos las muestras tras calentarlas con tampón de carga a 95°C. Corremos el gel a 30mA y lo transferimos a una membrana de nitrocelulosa a 80V durante 120'. Buffer de Transferencia: Tris·glicina al 10% SDS y 20% Metanol.
- Bloqueamos la membrana con Phosphoblocker (CellBiolabs™), incubamos con el anticuerpo primario anti-pSer39 a 1/10.000 o anti-M2-Flag a 1/15.000 o/n a 4°C. 1/5.000 para anti-tubulina.
- Lavamos la membrana e incubamos con el secundario IRDye®, anti-mouse o anti-rabbit durante 1h a temperatura ambiente.

Como control de carga se utilizó anti-tubulina, con secundario IRDye® anti-mouse de color verde, también. Utilizando el software semi-cuantitativo del Odyssey, se hizo una detección de la cantidad de proteína total, así como también, de la cantidad de la proteína que está fosforilada. Estos valores los utilizaremos para normalizar los valores del ensayo de actividad.

3.2.5. Ensayo de Actividad

Para el **ensayo de actividad**: se utilizó el *HDAC8 Inhibitor Screening Assay Kit* de Cayman Chemicals®. Este kit contiene un sustrato acetilado acoplado a un fluoróforo que si y sólo si HDAC8 actúa eliminando el grupo acetilo, un reactivo contenido en el mismo kit podrá digerir el sustrato y en consecuencia, se liberará el fluoróforo, lo que para nosotros será indicativo de actividad. Este ensayo se realiza en dos pasos, los dos en la misma placa de 96 pocillos: En el primer paso, el sustrato, que comprende la secuencia Arg-His-Lys-AMC se incubaba con HDAC8. La

desacetilación activa el sustrato, y al añadir la Developer libera al entorno el producto fluorescente. El producto fluorescente se analiza con una longitud de onda de excitación entre 350-360nm y una longitud de onda de emisión entre 450-460nm.

Ensayamos con extracto celular de HEK293T donde se ha sobreexpresado HDAC8 wt o los diferentes mutantes, y cada uno de ellos los ensayaremos de dos maneras: por un lado, sin fosforilar y por el otro lado, habiendo sido previamente fosforiladas por PKA. Cada tipo se ensaya por triplicado y la fluorescencia se monitoriza a 350nm excitación/450 emisión, durante 60' a 37°C.

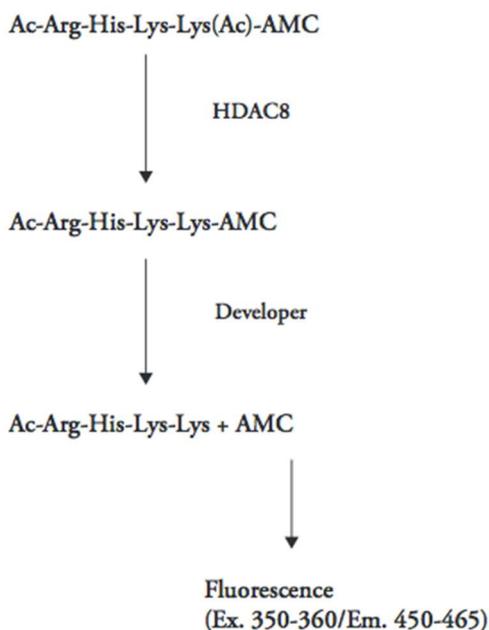


Imagen 46: Esquema de la reacción en dos tiempos que tiene lugar, tras la cuál medimos la actividad de HDAC8.

4.Resultados

4.1. Diseño de Moléculas “PP-glue”.

MÉTODOS BIOFÍSICOS

4.1.1.Biacore

CHIP_NTA

Decidimos utilizar el chip NTA, en vista que ambas proteínas presentan el doble His-tag. Este chip, permitía la captura de proteínas a través de la captura de níquel, además, tras cada ciclo, se puede regenerar la superficie del chip, añadiendo EDTA al buffer.

Según la fórmula explicada en la Metodología, si la masa molecular del analito es mayor a la del ligando, podremos ver mejor la señal, por eso decidimos capturar CheY y que sea CheA la que pase en la fase móvil. Realizamos varios *runs* manuales, para determinar la cantidad a capturar de níquel, la cantidad de CheY que capturamos, así como la Cantidad de CheA que queremos que pase en la fase móvil y cuánto tarda la *baseline* en volver a cero.

En los *runs* manuales, se observa un fenómeno extraño: cuando pasamos CheA en la fase móvil de manera secuencial alternando inyección y *stabilization period*, no se llega a la fase *plateau* o estacionaria, la *baseline* sigue aumentando mucho más de la respuesta máxima que se esperaría (R_{max} , calculada a partir de la fórmula anteriormente comentada) **[Figura 1]**. Este fenómeno se denomina “rebinding” y es debido a que la proteína que ya se ha unido, en vez de marchar con el flujo del Running Buffer, se vuelve a unir, bien a otras unidades de CheY libres, bien a otras CheA expuestas, y es que CheA también interacciona consigo misma, de hecho, dimeriza para autofosforilarse de manera cruzada. Así que capturamos CheA y pasamos CheY en la fase móvil; probamos de hacerlo a la inversa.

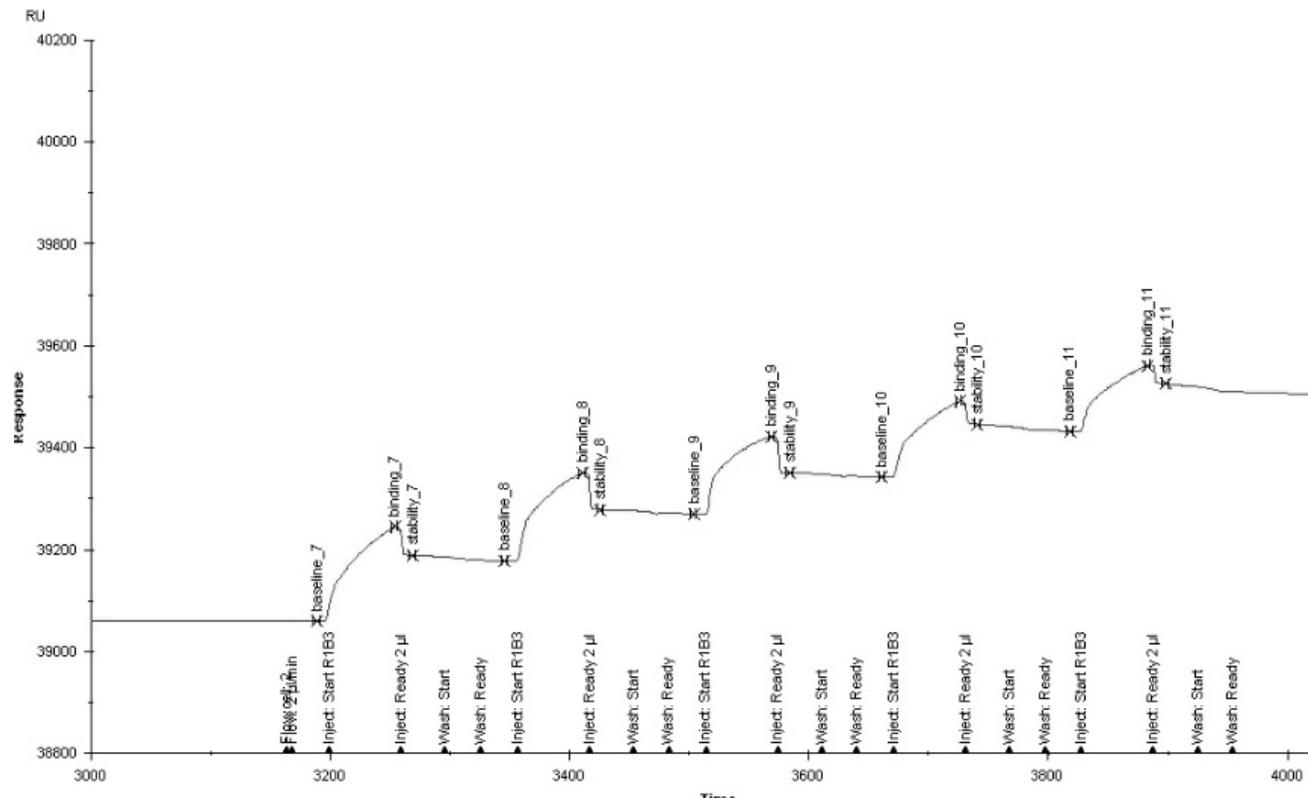


Figura 1: detalle del run manual en el que vamos capturando CheA de manera secuencial.

Cambiamos el sistema: capturamos CheA y pasamos CheY en la fase móvil. Realizamos *runs* manuales para determinar la cantidad de CheA a inmovilizar, y la cantidad de CheY que pasamos en la fase móvil o durante cuánto tiempo pasamos un flujo constante de CheY. Una vez determinadas las condiciones, montamos un run para ensayar los compuestos del 2 al 20 (a $100\mu\text{M}$).

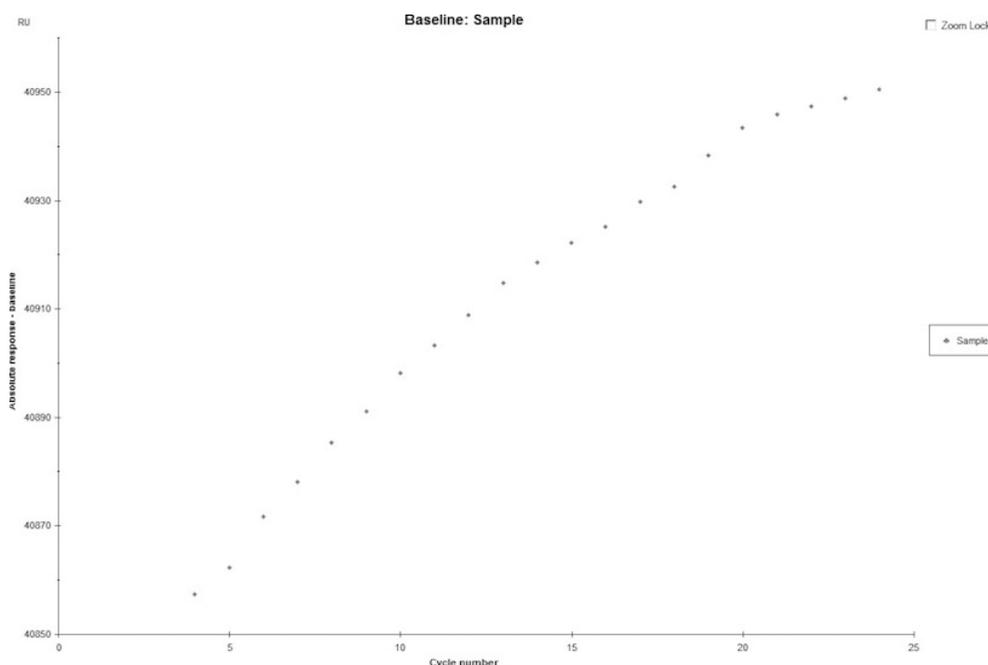


Figura 2: Tras inmovilizar CheA y pasar CheY en la fase móvil, vemos que este método tampoco funciona. La imagen muestra: de izquierda a derecha (del 2 al 20) los puntitos reflejan las RUs con las que se empieza cada ciclo; vemos que esta va aumentando gradualmente. No hay una buena regeneración y cada ciclo, de entrada, se empieza con una baseline mayor, esto dificulta la comparación entre ciclos.

Este chip, presentaba ventajas teóricas, pero a la práctica no ha sido así: empezamos cada ciclo con una baseline diferente, al tener que capturar en cada ciclo, níquel y ligando, hay muchas posibilidades de que la captura no sea exactamente igual y esto es lo que ha pasado; las

capturas no son homogéneas, no hay una buena regeneración y eso dificulta la interpretación de los resultados. Por ello, decidimos cambiar de chip, e intentarlo con chips CM5, en los que se realiza una inmovilización única y covalente, que facilitará así, la comparación entre ciclos de un mismo run.

CHIP_CM5

Decidimos poner a punto el método con el par CheY/CheYBSCheA, puesto que debido al gran tamaño que tiene CheA, dificulta trabajar con ella y también, en vista de los resultados obtenidos y con el añadido de que CheYBSCheA se expresa mucho mejor que CheA. Así solventamos el problema de las capturas poco homogéneas de ligando. Tras varias pruebas, decidimos inmovilizar CheY, en vez de CheYBSCheA, puesto que sabemos por la bibliografía que CheY es lo suficientemente robusta como para resistir diversos ciclos de regeneración sin perder su conformación ni actividad, mientras que CheYBSCheA, al ser sólo un dominio y no la proteína entera, es estable durante mucho menos tiempo que CheY a 4°C.

4.1.1.1. Determinación de la Kd CheY/BS

Para la determinación de la kD entre CheY y CheYBSCheA, inmovilizamos primeramente 100RUs de CheY y después hacemos diluciones seriadas de CheYBSCheA a concentraciones 0µM, 0.375µM, 0.657µM, 1.25µM, 2.5µM, 5µM, 10µM y 20µM. Probamos cada una de las concentraciones por triplicado y con diferentes *Blanks* estratégicamente colocados, al principio, al final y entremedio del método. El método se llevó a cabo overnight, a 25°C con *Blanks* al principio, al final y entremedio del método. Cada ciclo consta de las siguientes fases:

- Binding Cycle: inyección de CheYBSCheA durante 60" a 10µL/min
- Dissociation Cycle: 600" de Running Buffer a 10µL/min
- Regeneration Cycle_1: 30" 0.25% SDS a 10µL/min
- Regeneration Cycle_2: 0.1M HaOH a 10µL/min
- Stabilization Period: 60" de Running Buffer a 10µL/min

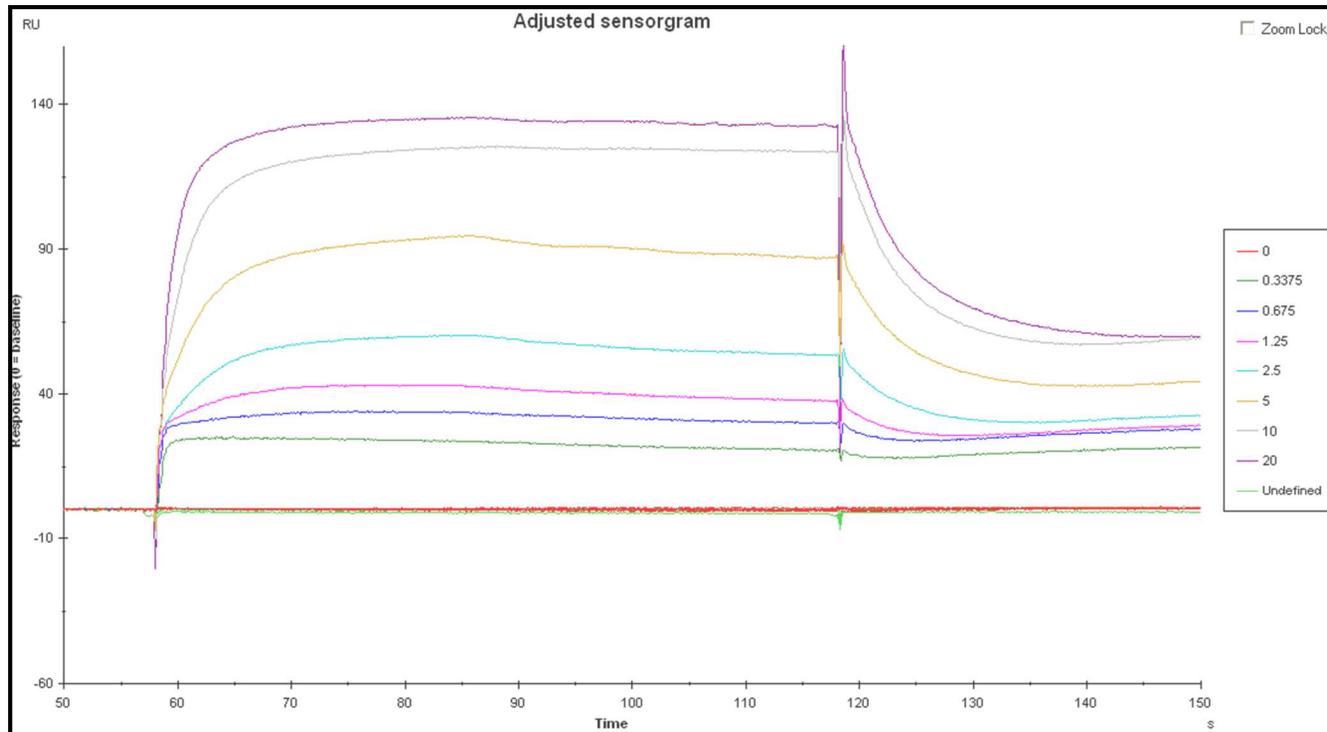


Figura 3: Imagen de la determinación de la K_d entre el par CheY/CheYBScheA. En abscisas se muestran las RUs.

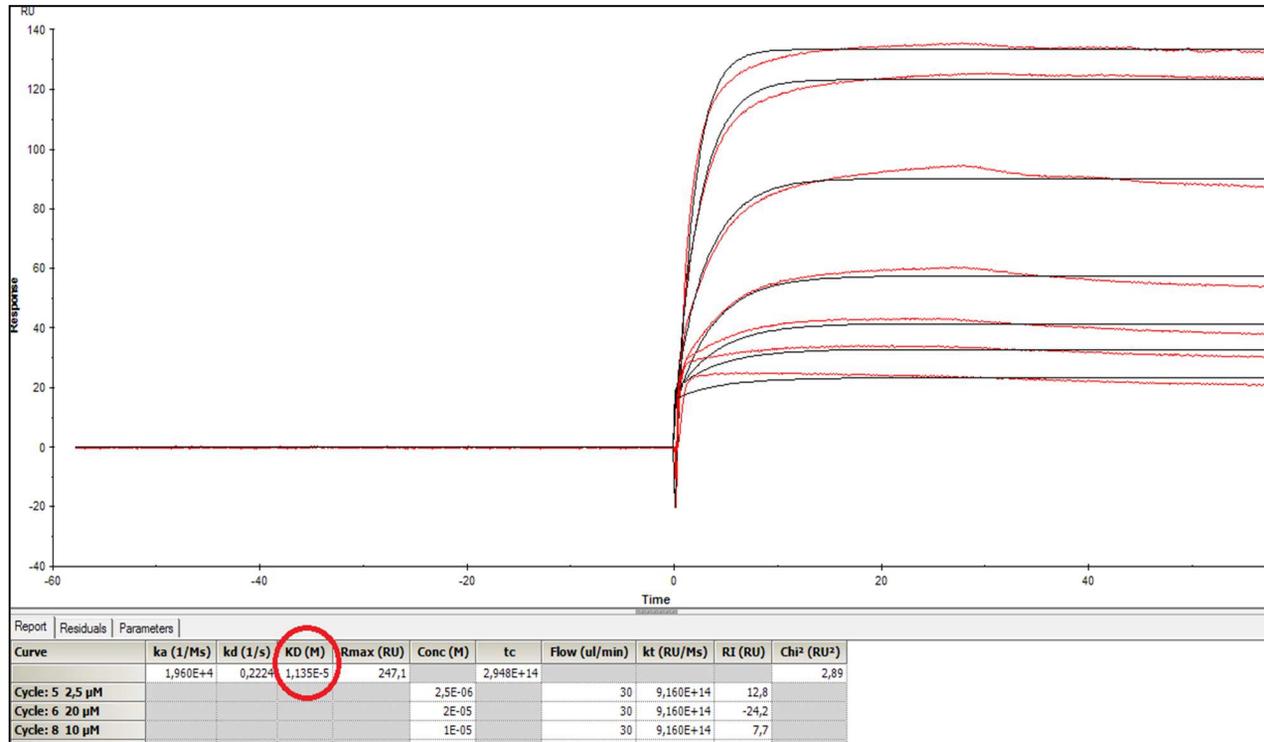


Figura 4: Detalle del software *Biacore Evaluation*, muestra la Kd por affinity, asumiendo que el modo de interacción de estas proteínas es 1:1. De aquí determinamos que la Kd entre CheY/CheYBScheA es de 11.3µM.

4.1.1.2. Screening de compuestos (1)

Una vez determinamos la cantidad de CheY idónea a inmovilizar (90Rus), preparamos un método de screening de compuestos. En lugar de observar directamente la unión de los compuestos al dímero CheA-CheY, buscamos compuestos que aumenten la constante de afinidad aparente entre las proteínas. Para ello, utilizaremos una concentración CheYBSCheA en la fase móvil por debajo de K_D , pero suficientemente alta para ver señal. La concentración elegida fue de $1.2\mu\text{M}$. Los compuestos se ensayaron a $100\mu\text{M}$, por triplicado, con sendos controles, y también pasando sólo compuestos sin proteína para asegurarnos que por sí solos no dan señal. Esta vez probaremos los compuestos del #2 al #30

Elegimos pasar la proteína a $1.2\mu\text{M}$ porque es una concentración a la que apreciamos bien el aumento de RUs al pasar proteína, pero la señal dista bastante de la R_{max} , lo que nos permitirá apreciar bien el efecto activador de los compuestos, si los hay.

En la Figura 5 vemos 3 bloques bien diferenciados: arriba del todo, la respuesta que se genera cuando pasamos la proteína + el compuesto #30, en el bloque de en medio, el resto de ciclos, en los que hemos ensayado proteína + el resto de compuestos. (controles de sólo proteína en rojo). En el bloque de abajo, se aprecian los ciclos correspondientes a los compuestos solos, sin proteína (en rojo, sólo Running Buffer). Vemos en rojo los runs controles de proteína sin compuestos, todos están por debajo de estos runs, excepto cuando ensayamos el compuesto #30, que se muestra en verde. En el sensorgrama vemos una respuesta clara. De igual manera, a pesar de no ser lo que estábamos buscando, vemos que los compuestos #2 y #5 tienen perfil de inhibidores, puesto que con ellos, baja la afinidad entre ambas proteínas.

Preparamos un método corto de comprobación de los inhibidores, Figura 6. Vemos el control en rojo, y por debajo de este, la proteína + el compuesto #2 o el compuesto #5.

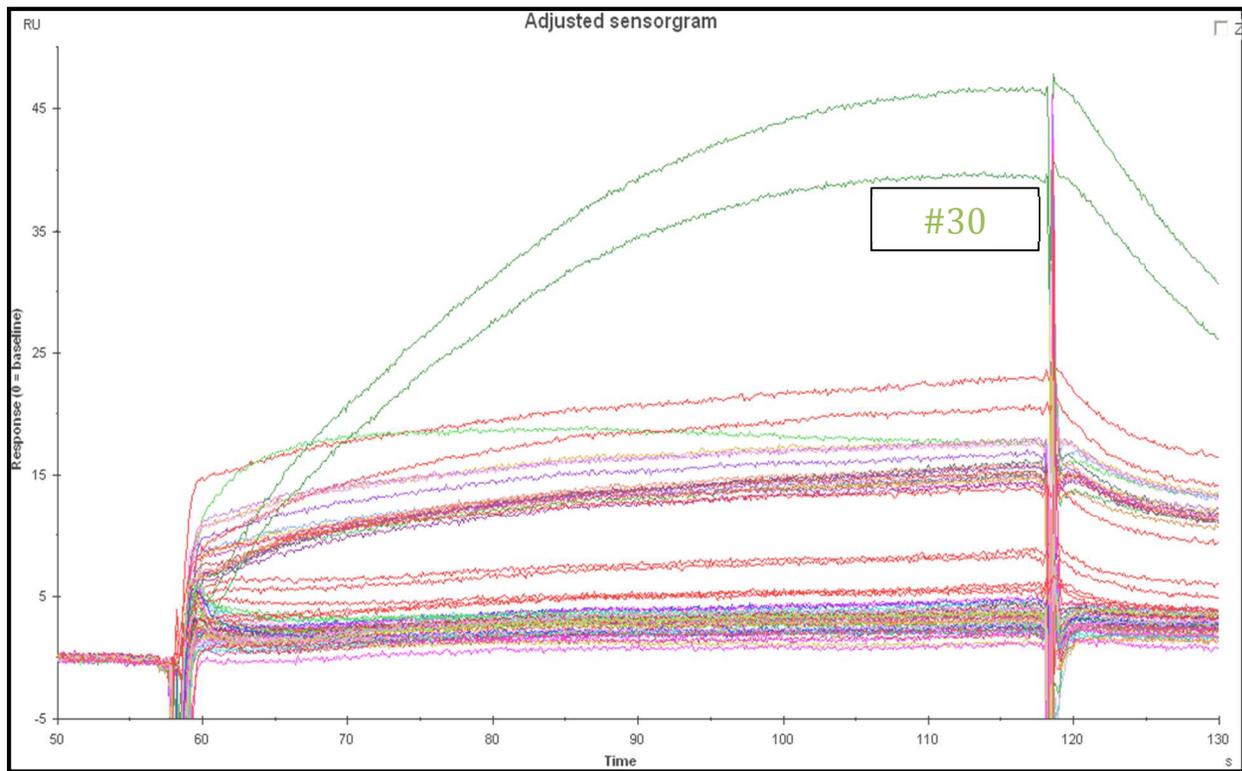


Figura 5: Sensorgrama del primer Screening de compuestos. Se aprecia el compuesto #30 por encima del resto.

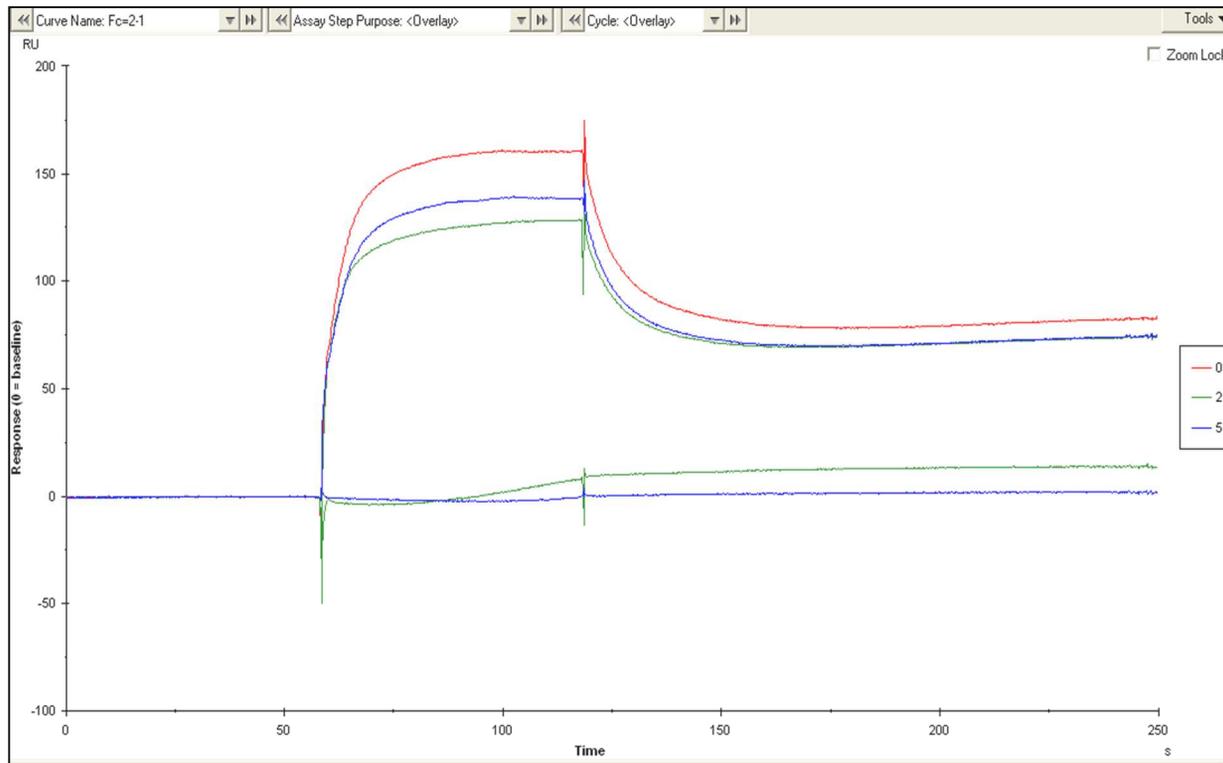
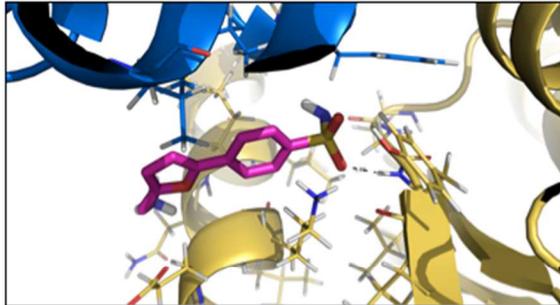


Figura 6: Detalle del sensorgrama de comprobación de los compuestos #2 y #5. Ambos aparecen por debajo del control.

#30 Potencial activador
Características PP 'glue'



Características de
Inhibidor: #2 y #5

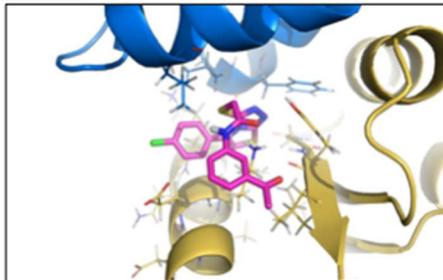
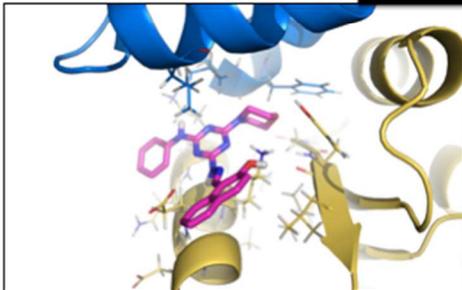


Imagen 46: esquemas de los compuestos, y su supuesta localización en el espacio interproteína. Arriba se muestra el compuesto #30, que tiene características de “PP-glue”, y abajo vemos los compuestos #2 y #5, que tienen características de inhibidores potenciales.

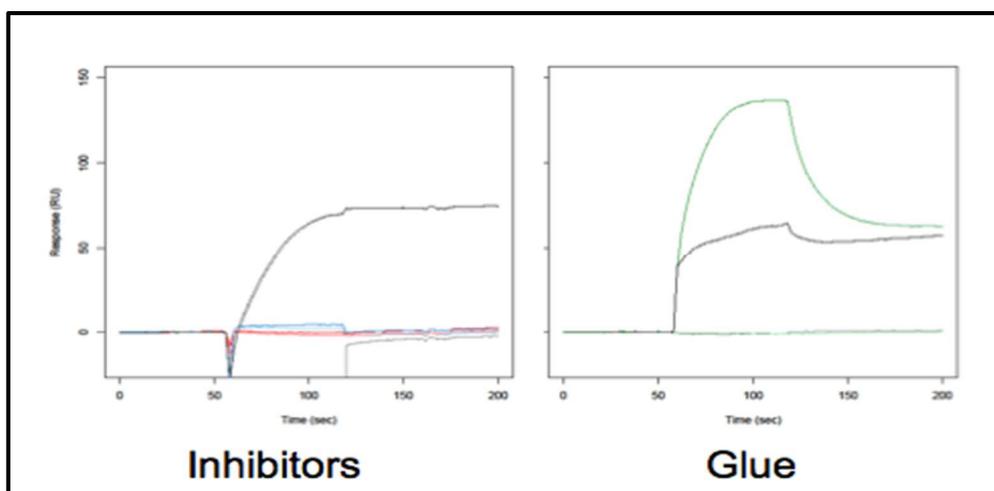


Imagen 47: el gráfico de la izquierda representa el perfil que deberían tener los compuestos llamados “inhibidores” y el de la derecha, la forma que deberían tener los compuestos “activadores” o con capacidad “glue”. La curva en negro representa el blanco, a la izquierda, la curva roja está por debajo de la negra, lo que le convierte en inhibidor, al contrario que la línea verde a la derecha, que corre por encima de la curva negra.

Screening de compuestos (2)

Montamos un segundo método de screening de compuestos, esta vez con los compuestos que se adquirieron por segunda vez, y que son compuestos análogos en estructura al compuesto #30.

En este segundo screening de compuestos, estos se ensayaron de igual manera, compuestos con proteína por triplicado y los compuestos solos sin proteína, para comprobar que no dan señal por sí solos. A este método también le añadimos blancos de proteína sin compuestos y blancos también sin proteína (Running Buffer); situados al principio, al final y en medio del método. También añadimos ciclos con el #30, por triplicados, para comprobar con este, los compuestos positivos, si los hubiese. Esta vez, mantenemos la concentración a la que ensayamos la proteína, a 1.2 μ M de CheYBSCheA, juntamente con los compuestos, que los ensayamos a 100 μ M.

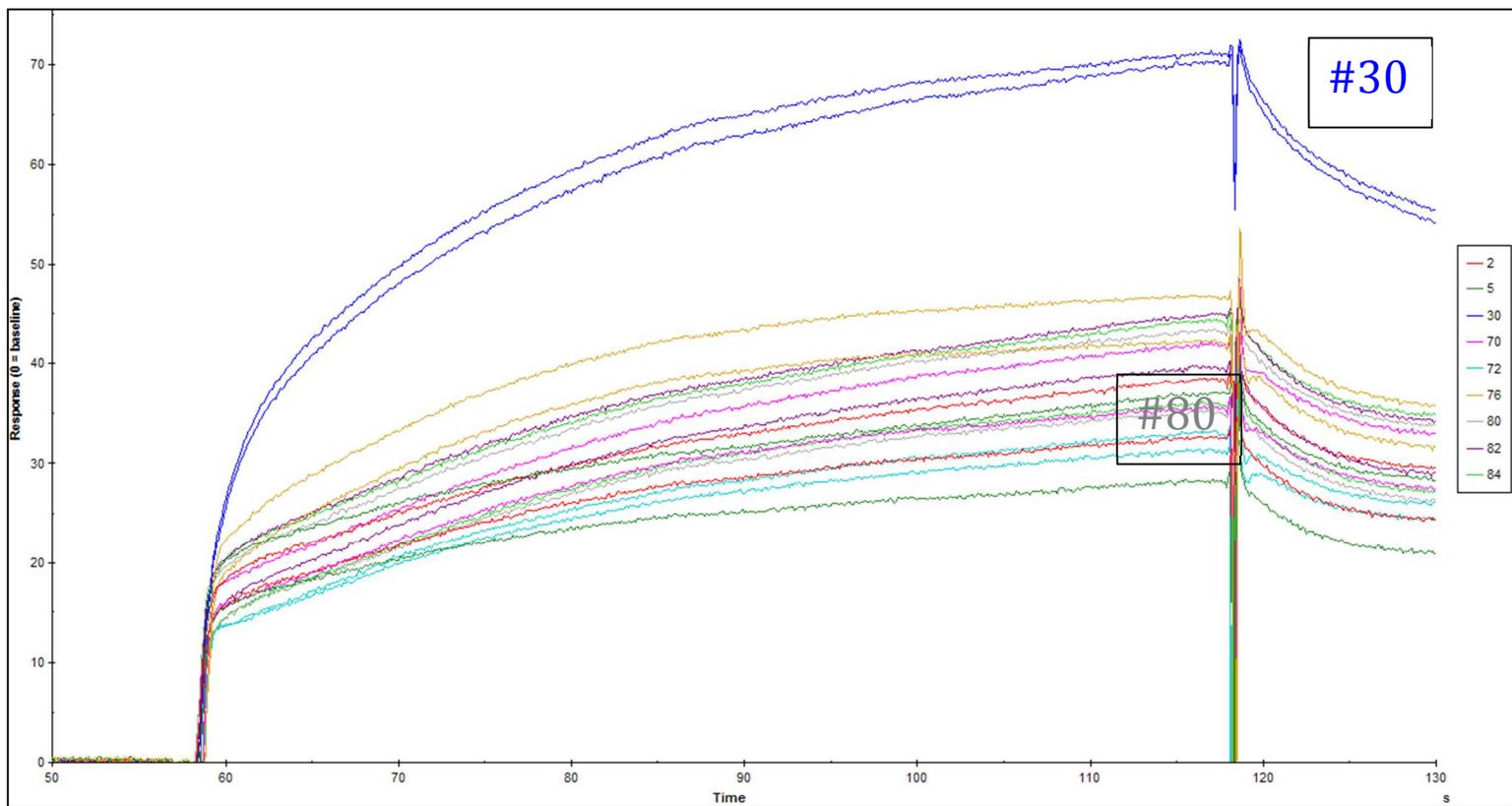


Figura 7: Sensorgrama del segundo screening de compuestos. Vemos que no hay ninguno de los compuestos que esté por encima de los controles.

De aquí extraemos que: estos nuevos compuestos no tienen efecto en la unión del dímero CheY/CheYBScheA. Vemos que el compuesto #30, corre muy por encima del resto de compuestos, que caen dentro de los controles de proteína sin compuestos, es decir, no tienen perfil de activadores. Por otro lado, vemos que el compuesto #80, que estructuralmente es muy parecido al #30, no tiene efecto en la unión, de manera que elegimos este compuesto como control negativo para posteriores ensayos.

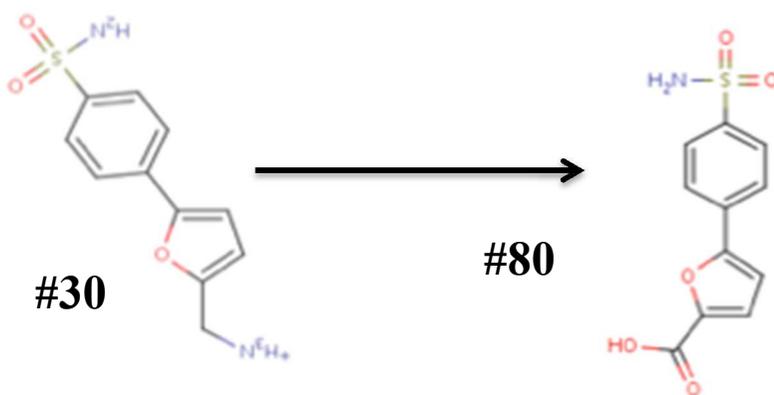


Imagen 48: aquí se muestran las estructuras de los compuestos #30, y del compuesto #80. La diferencia entre ambas estructuras es el cambio de un grupo Amina por un grupo ácido, y este cambio, vemos que es suficiente para suprimir el efecto activador.

Screening de compuestos (3)

Montamos un tercer método de screening de compuestos, esta vez con los compuestos que se adquirieron por segunda vez, y que son compuestos análogos en estructura al compuesto #30, conservando la benzen-sulfonamida, estos están pensados para que también sean positivos, potenciales “PP-gue”. También añadimos ciclos con el #30, por triplicados, para comprobar con este, los compuestos positivos, si los hubiese. Mantenemos la concentración de proteína como en los ensayos anteriores, a 1.2μM de CheYBScheA, pero los compuestos, esta vez los ensayamos a 10μM. (Algunos compuestos son poco solubles)

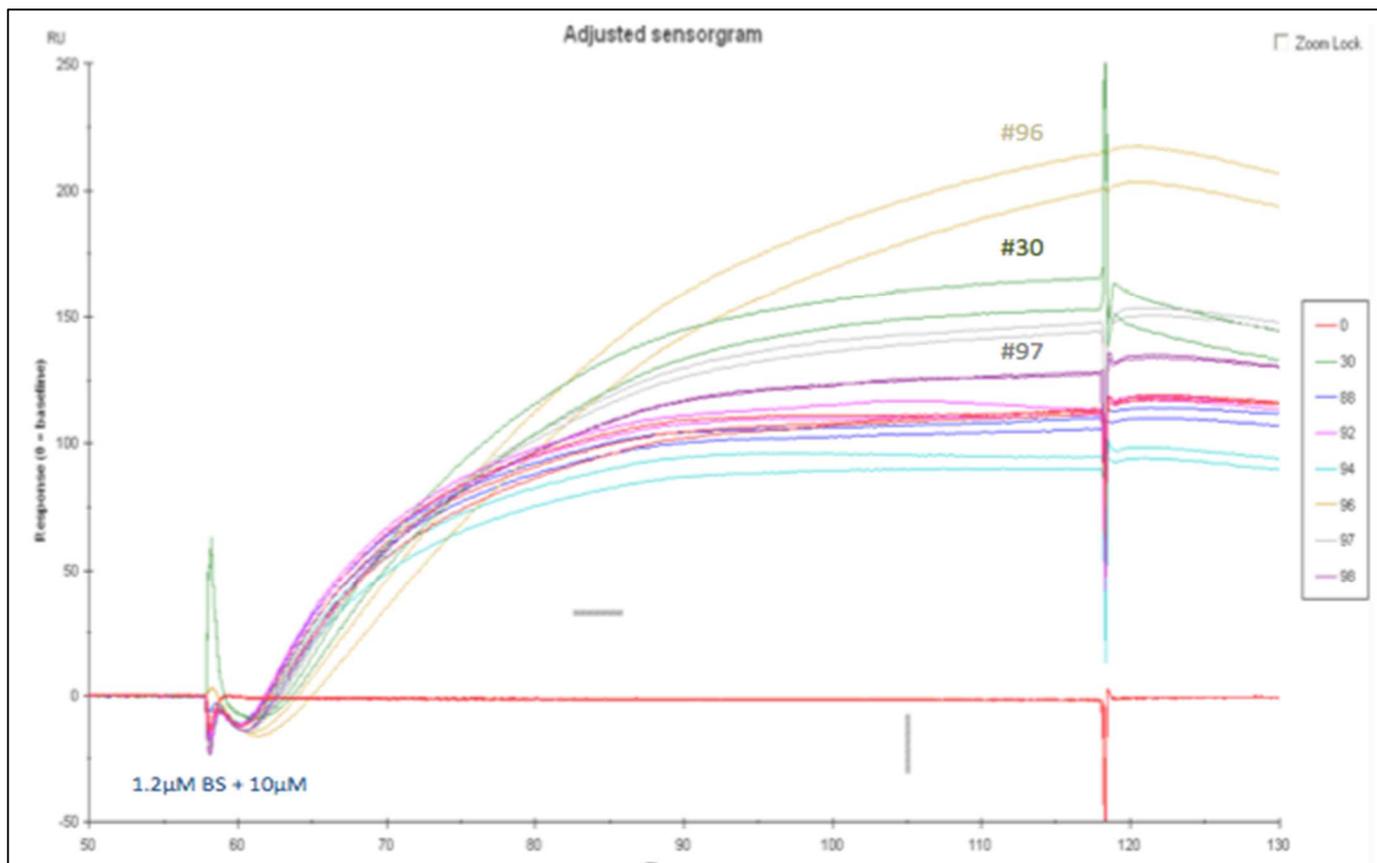


Figura 8: Sensorgrama resultante del tercer screening de compuestos. Vemos que el #96 está por encima del #30.

De este tercer screening de compuestos, extraemos que: hay diferentes compuestos que aumentan la afinidad entre CheY y CheYBSCheA, que están por encima de los runs en color rojo. En este caso, vemos, el compuesto #98, #97, que, si bien son positivos, porque corren por encima de los controles, cuando pasamos los compuestos sin proteína, ya dan señal por sí mismos, así que los descartamos.

También aparece el compuesto #96, que da más señal aún que el compuesto #30. Además, si pasamos, en cambio, el compuesto #96 por sí solo, este no da señal. De manera que es también un activador potencial, posiblemente más potente que el #30, puesto que lo ensayamos a una concentración 10 veces menor.

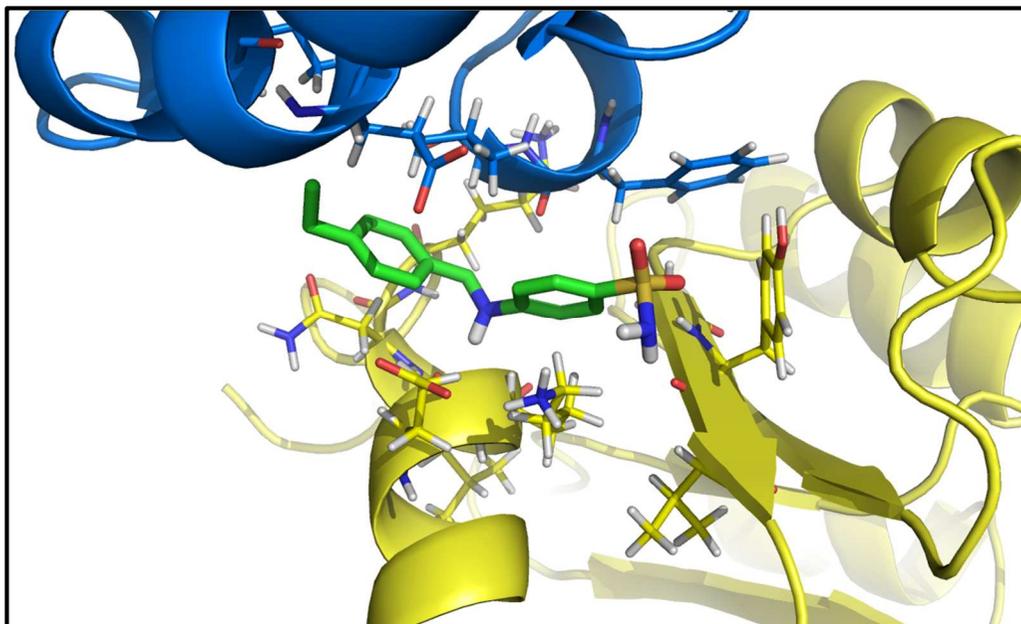


Imagen 49: Esquema del compuesto #96 (verde) y su localización en el espacio intraproteína entre CheY y CheYBSCheA.

4.1.1.2. Determinación de la Kd CheY/BS con compuestos, con el #30.

Para la determinación de la Kd entre CheY y CheYBSCheA junto con 100µM de compuesto #30, inmovilizamos primeramente 100Rus de CheY y después hacemos diluciones seriadas de CheYBSCheA a concentraciones 0µM, 0.12µM, 0.657µM, 1.25µM, 2.5µM, 5µM, 10µM y 50µM; a los que añadimos 100µM de compuesto, a cada vial (Figura 9, Figura 10).

Ensayamos cada una de las concentraciones de proteína por triplicado, con diferentes *blanks* al principio, al final y en medio del método. Se llevó a cabo a 25°C.

Los *runs* contienen dos tipos de *blanks*:

- *Blanks* con proteína pero sin compuestos.
- *Blanks* con compuestos pero sin proteína.

Cada ciclo consta de las diferentes fases:

- Binding Cycle: inyección de CheYBSCheA + 100µM de compuesto #30 durante 60" a 10µL/min
- Dissociation Cycle: 600" de Running Buffer a 10µL/min
- Regeneration Cycle_1: 30" 0.25% SDS a 10µL/min
- Regeneration Cycle_2: 0.1M HaOH a 10µL/min
- Stabilization Period: 60" de Running Buffer a 10µL/min

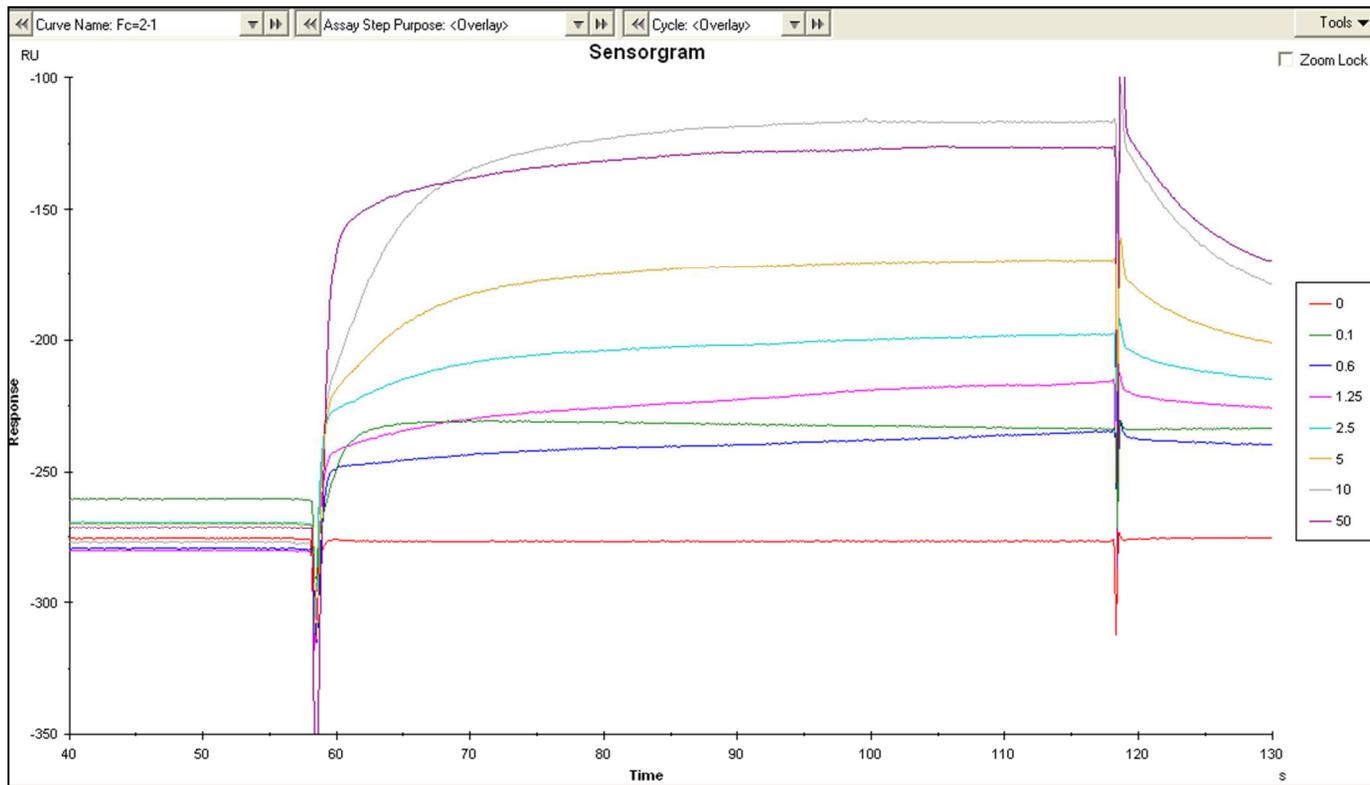


Figura 9: Sensorgrama resultante de la determinación de la K_d entre CheY/CheYBScheA.

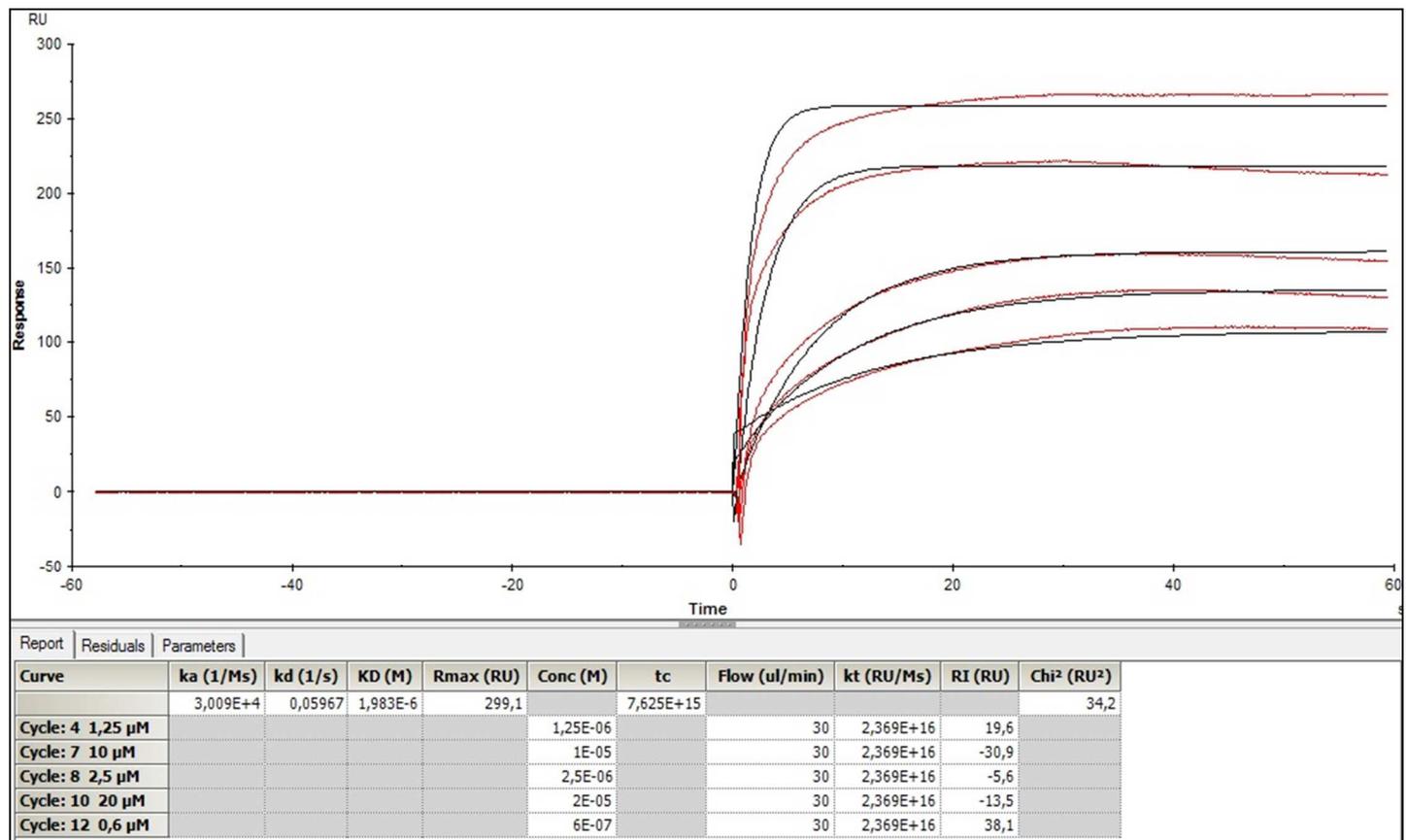


Figura 10: Resultado de la determinación de la Kd para CheY/CheYBScheA. Calculamos la Kd por Affinity.

Tras la determinación de la K_d en presencia del compuesto #30 a $100\mu\text{M}$ se extrae que la K_d es de $1.9\mu\text{M}$, lo cuál es 5.9 veces menor que sin el compuesto (Figura 10). Por tanto el compuesto #30 aumenta la afinidad del complejo casi 6 veces. Tiene características de "PP-glue".

Determinación de la K_d CheY/BS con compuestos (2), con el #96.

Para la determinación de la K_d entre CheY y CheYBSCheA junto con $10\mu\text{M}$ de compuesto #96 (este lo pasamos a $10\mu\text{M}$ porque este compuesto es muy insoluble). En un chip CM5 que tiene inmovilizadas unas 100 Rus de CheY, hacemos diluciones seriadas de CheYBSCheA a concentraciones $0\mu\text{M}$, $0.15\mu\text{M}$, $0.30\mu\text{M}$, $0.60\mu\text{M}$, $1.25\mu\text{M}$, $2.5\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$; a los que añadimos $10\mu\text{M}$ de compuesto #96, a cada vial.

Ensayamos cada una de las concentraciones de proteína, igual que anteriormente, por triplicado, con diferentes blancos al principio, al final y entremedio del método, que se llevó a cabo a 25°C .

Cada ciclo consta de las diferentes fases:

- Binding Cycle: inyección de CheYBSCheA + $10\mu\text{M}$ de compuesto #96 durante 60" a $10\mu\text{L}/\text{min}$
- Dissociation Cycle: 600" de Running Buffer a $10\mu\text{L}/\text{min}$
- Regeneration Cycle_1: 30" 0.25% SDS a $10\mu\text{L}/\text{min}$
- Regeneration Cycle_2: 0.1M HaOH a $10\mu\text{L}/\text{min}$
- Stabilization Period: 60" de Running Buffer a $10\mu\text{L}/\text{min}$

Calculamos la K_d utilizando el software Biacore Evaluation, por Affinity.

De este ensayo de K_d determinamos que en presencia del compuesto #96 a $10\mu\text{M}$ la K_d del complejo es de $3.6\mu\text{M}$, lo cuál es 3.1 veces menor que sin el compuesto. Por tanto, el compuesto #96 aumenta la afinidad del complejo poco más de 3 veces. Tiene características de "PP-glue", más potente que el #30.

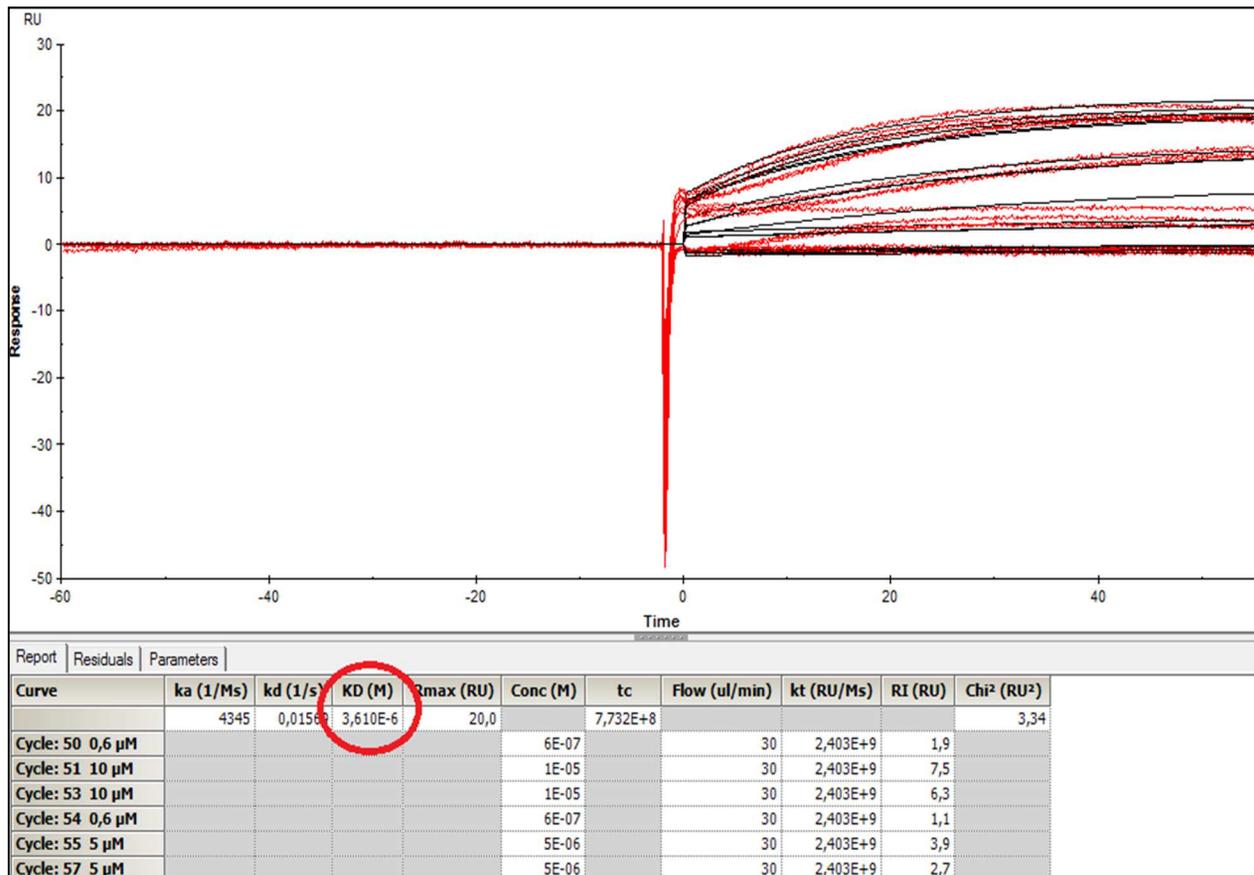


Figura 11: Cálculo de la Kd entre el complejo, con la adición de #96 a 10µM-

4.1.2. Termoforesis Microescala

4.1.2.1. Termoforesis del complejo Proteína-Proteína

Con el ensayo de NanoTemper detallado en el apartado anterior, queremos corroborar la afinidad del complejo CheY/CheYBSCheA, la del complejo CheY/CheA y también con los compuestos con características de activadores potenciales.

Primeramente medimos la afinidad del complejo CheY/CheYBSCheA. Para ello, tritramos 1.100nM de CheY y vamos añadiéndolo a los diferentes eppendorfs que contienen diluciones seriadas de CheYBSCheA desde 120 μ M a 30nM: añadimos 10 μ L de CheYBSCheA a 240 μ M en el primer tubo, y luego diluímos 5 μ L en 5 μ L + 0.1mg/mL de BSA (concentración final de 120 μ M en el primer tubo después de la adición de CheY*) y en cada tubo vamos añadiendo 5 μ L de CheY* a 2.2 μ M. Mezclamos bien y lo centrifugamos durante dos minutos a 11.000g. Añadimos 6 μ L de CheY* a la dilución seriada de CheYBSCheA a concentración final de 100 μ M.

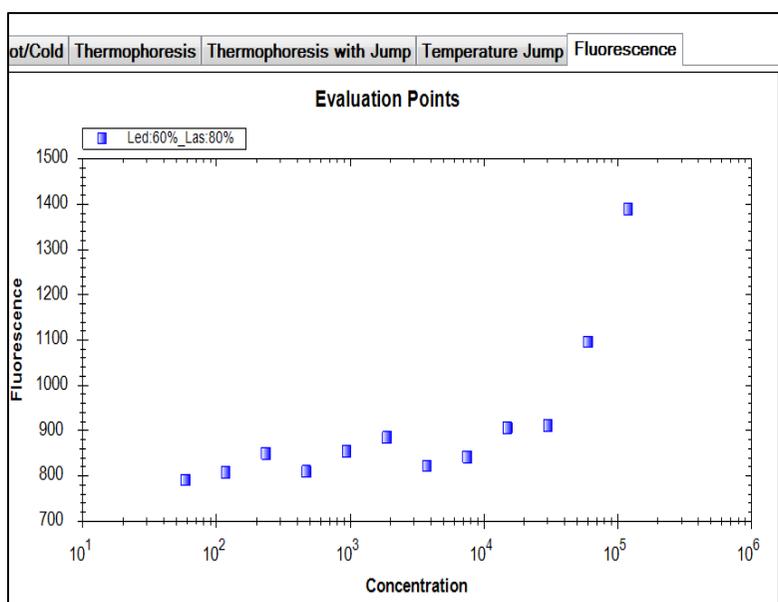


Figura 12: Termograma en el que se muestran los diferentes puntos de evaluación para cada medición de capilar, y que darán como resultado la curva termoforética. De izquierda a derecha, concentraciones crecientes de CheYBSCheA.

Repetimos lo mismo para el par CheA/CheY, para determinar qué complejo va mejor para probar los compuestos y fragmentos:

| CheA* (50nm) with : | Kd |
|-----------------------------------|------------------------------|
| CheY (19.5 nM to 80 μM) | 9.05 μM ± 0.6 [†] |
| CheY* + CheA | 0.9 μM ± 0.04 |
| CheY* + #30 at 5 μM + CheA | 500 nM ± 50 |
| # 30 (30.5 nM to 1 mM) | 2.9 μM |
| # 30 (25 μM) + CheY | 18.85 μM ± 0.35 [†] |
| # 80 (5 μM) + CheY | 10.3 μM |
| # 96 (25 μM) + CheY | 10.7 μM |

Analizando la tabla de Kd s, vemos que hay una diferencia de 10X dependiendo de si tritramos CheY o bien, CheA. Esta diferencia puede deberse a que, Cuando marcamos CheA con el fluoróforo, este se une a CheA impidiendo la posterior unión de CheY, de alguna manera afecta a la cavidad. Por eso, si tritramos CheA la afinidad es menor. Vemos que también hay diferencias notables dependiendo de si incubamos #30 previamente con CheY o con CheA, esto puede ser debido a que la entrada del #30 provoca un cambio conformacional en CheY, que facilita su unión con CheA.

4.1.2.2 Termoforesis del complejo ternario

En vista de estos resultados, acordamos trabajar con CheY/CheYBSCheA. Comprobamos la afinidad del complejo en presencia de los compuestos #30 y #96.

De aquí, al realizar la curva, se extrae la Kd final. En este caso, la Kd del complejo CheY/CheYBSCheA con 25μM de #30 es 3.9μM, y con 25μM de #96 es 10μM.

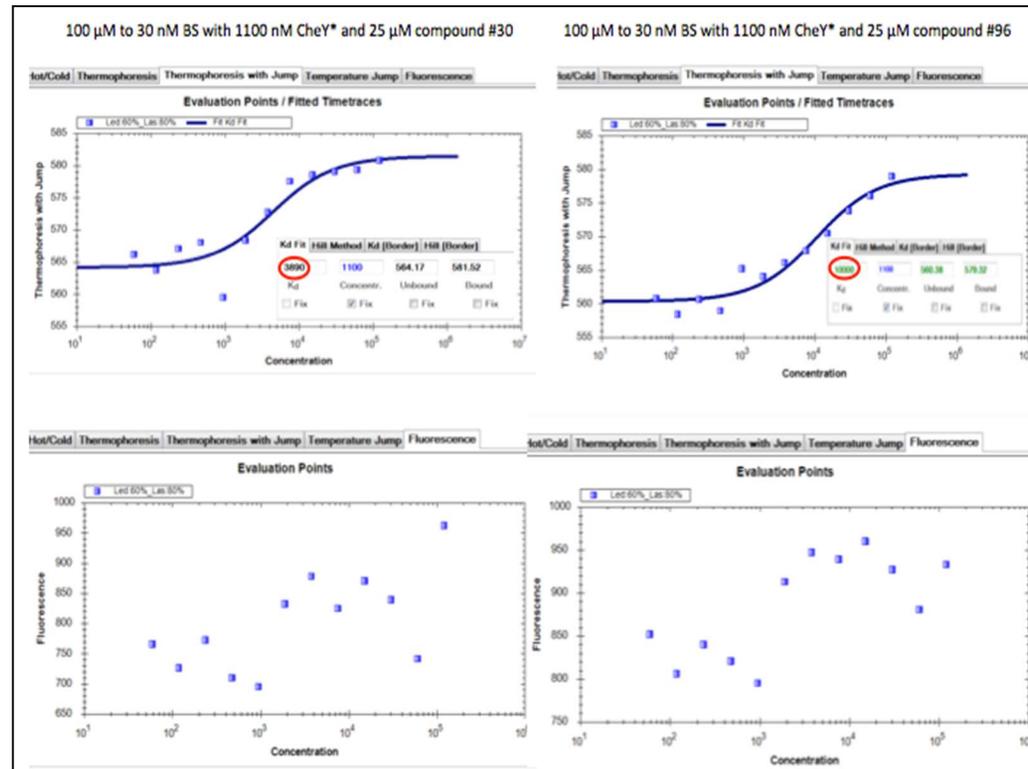


Figura 13: Estos sensogramas muestran la afinidad del complejo en presencia de #30 y de #96 respectivamente.

Concuerta con los datos obtenidos por Biacore, así que decidimos ensayar los fragmentos también, con este par. La siguiente tabla resume los resultados obtenidos:

| | CheY* | BS* |
|-------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| CheY | | 24.35 μ M \pm 1.95 |
| CheYBSCheA | 24.9 μ M \pm 2.4 | |
| # 30 (25 μM) + CheY | | 3.9 μ M |
| # 30 (5mM) + CheY | | 2.7 μ M \pm 0.68 |
| # 96 (25 μM) + CheY | | 10 μ M |
| F#1 (5mM) + BS | 7.09 μ M \pm 1.68 | |
| F#2 (5mM) + BS | 17.3 μ M \pm 1.71 | |
| F#3 (5mM) + BS | 25.4 μ M \pm 1.25 | |
| F#4 (5mM) + BS | 11.5 μ M \pm 1.67 | |

En la mayoría de pruebas, el tritrado fue CheY, mientras que CheYBSCheA se tritró para hacer la prueba de reciprocidad, la cuál sale consistente: 24.35 μ M si tritramos BS, contra 24.9 μ M si tritramos CheY.

La adición del compuesto #30 causa un incremento en la afinidad del complejo, de entre 6.25 y 9 veces, dependiendo de su concentración. A mayor concentración de 30 vemos que aumenta la afinidad, pero relativamente poco, lo que podría indicar que a 25 μ M el pocket del complejo se encontraría casi saturado. El compuesto #96 también aumenta la afinidad del complejo en 2.5 veces.

Por lo que a los fragmentos respecta, vemos que todos los fragmentos, excepto el número 3, aumentan la afinidad del complejo, sobretodo el fragmento #1, el cuál aumenta la afinidad del complejo casi 4 veces; lo cuál tiene sentido des del punto de vista de relaciones estructura-actividad, porque este fragmento contiene una amina en la misma posición que el compuesto #96. Por otro lado, el siguiente fragmento que más aumenta la afinidad es el fragmento #4, haciendolo en poco más de dos veces. En este caso, también parece un resultado congruente, porque el fragmento tiene una estructura más parecida al #30.

4.1.3. Cristalografía

4.1.3.1. Cristalización del complejo Proteína-Proteína.

Tras varias pruebas de cristalización, encontramos una condición a la cuál aparecen cristales de proteína bien formados. Es la condición **30% PEG3350, 0.1M Bis-Tris pH 5.75**.

Estos cristales se llevaron a difractar al ALBA y se obtuvo la estructura cristal del complejo CheY/CheYBsCheA a una resolución de unos 2.5 Å. La estructura es prácticamente idéntica a la publicada y nos sirve de punto de partida para intentar resolver la estructura de complejos ternarios.

4.1.3.2. Co-cristalización del complejo Proteína-Proteína + Compuestos.

Partimos de la misma condición a la que hemos obtenido cristales buenos para el complejo y que difractan. Añadiendo los compuestos, como hemos explicado, de dos maneras diferentes. De aquí, aparecieron algunos cristales interesantes, los cuáles fueron congelados en nitrógeno líquido, y también se llevaron al sincrotrón.

Solamente obtuvimos cristales con el complejo +#30, con el #96 también obtuvimos cristales, como se observa en la imagen de la derecha (página siguiente), pero estos cristales con forma de aguja son del compuesto, dado que este es muy insoluble y enseguida precipita.

Los cristales del complejo ternario, con el compuesto #30 difractaron, pero no lo suficientemente bien como para resolver su estructura. Bien podría ser que el cristal fuese heterogéneo y estuviese formado por complejos que habían incorporado el #30 y otros no, lo que dificultaba su resolución, o bien, que de alguna manera, la entrada del compuesto produjese un cambio conformacional en la estructura del complejo.

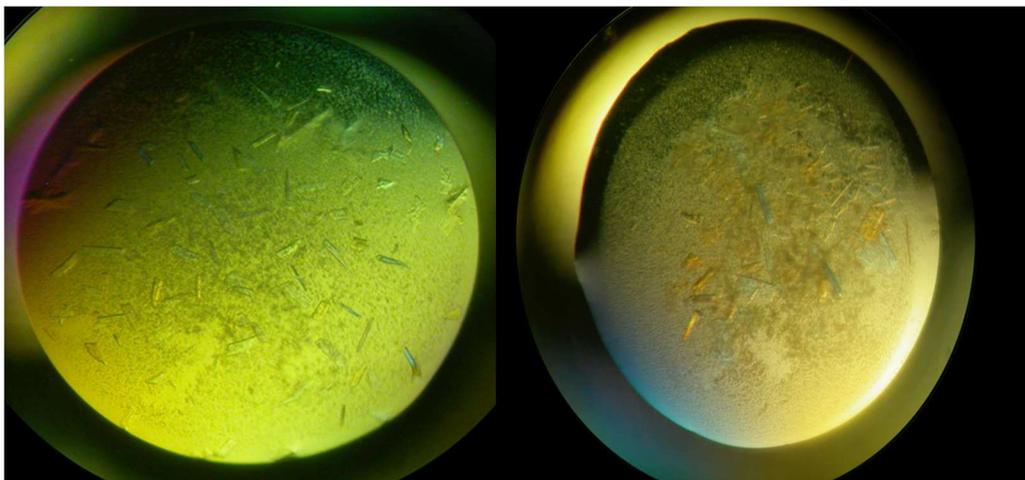


Imagen 51: Ejemplos de cristales del dímero CheY/CheYBSCheA que tras congelarse se llevaron a difractar.



Imagen 52: A la izquierda podemos ver cristales resultantes del complejo ternario con el compuesto #30, a la derecha, imagen de una condición de cristalización del complejo + #96.

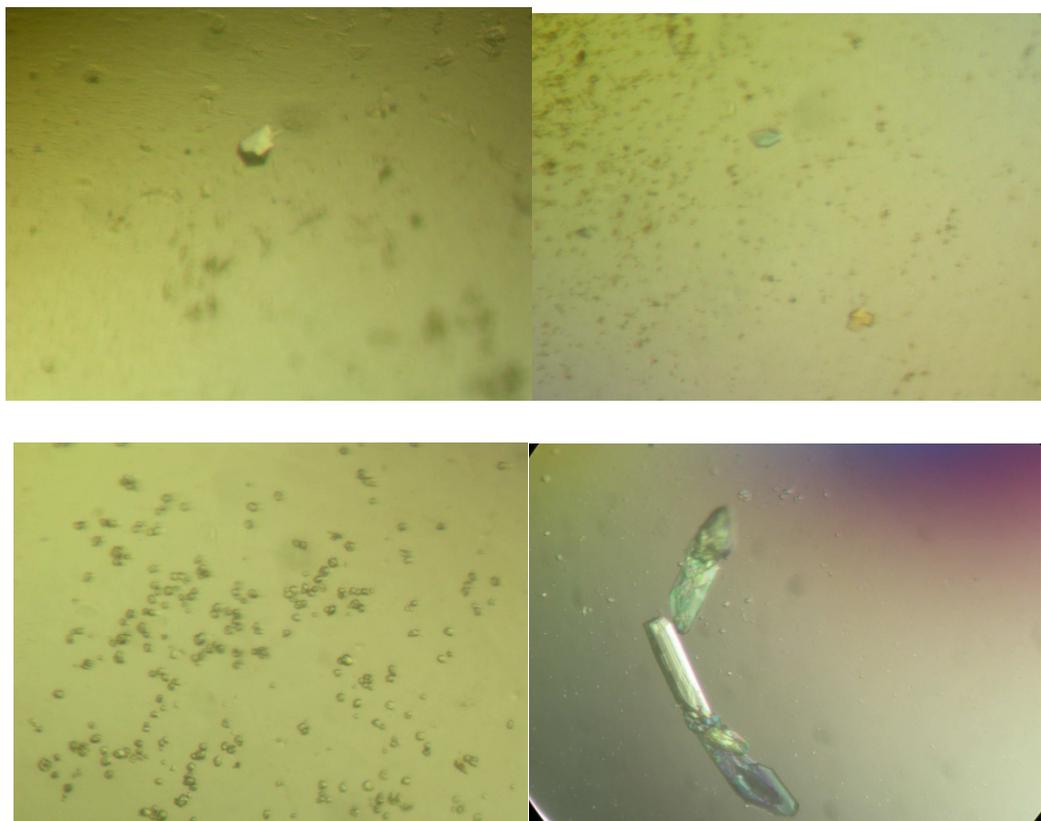


Imagen 53: Algunos de los cristales del complejo, junto con compuestos y fragmentos que se llevaron a difractar.

4.1.3.3. Soakings sobre el complejo

Sobre los cristales del complejo CheY/CheYBScheA, queremos probar soakings con los diferentes compuestos y también con los fragmentos.

Los soaks del primer intento, no dieron resultado. De la mayoría no se pudo obtener datos, y de los que se pudo, no se pudo resolver la estructura cristal. Han aparecido nuevos cristales sobre los que se intentarán soaks de nuevo, con pequeñas modificaciones en el proceso.

ENSAYOS *IN VIVO*

4.1.4. Ensayos de Motilidad

4.1.4.1. Ensayos de Viabilidad

La tabla inferior muestra los resultados de la O.D₆₀₀ para los diferentes cultivos celulares, en presencia o ausencia de compuesto, al cabo de 4h.

| REPLICA | 1 | 2 | 3 | 4 | TTEST |
|-------------|-------|-------|-------|-------|------------|
| DMSO | 0,19 | 0,18 | 0,15 | 0,222 | |
| 2 | 0,22 | 0,198 | 0,208 | 0,222 | 0,11774072 |
| 30 | 0,289 | 0,22 | 0,21 | 0,22 | 0,10095876 |
| 80 | 0,177 | 0,19 | 0,198 | 0,2 | 0,73709627 |
| 96 | 0,207 | 0,202 | 0,19 | 0,191 | 0,48643729 |

Tabla 3: resultados obtenidos de medir la D.O en presencia de los diferentes compuestos, con 4 réplicas cada uno. La TTEST no indica diferencias significativas en el crecimiento de los cultivos en presencia o en ausencia de compuestos, sean estos supuestos inhibidores o activadores.

4.1.4.2. Ensayos de Motilidad en Agar Semisólido

Inoculamos una gota de 5µL en el centro de una placa de agar motil, y al cabo de X horas vamos midiendo el diámetro del halo formado.

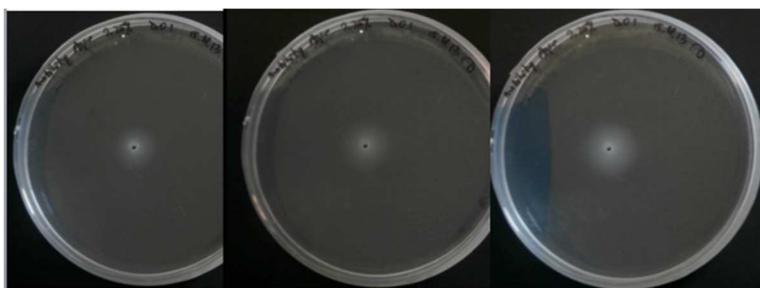


Figura 14: Estas imágenes muestran el halo de crecimiento/expansión pasadas 6, 8, 10h.

| (mm) | | 16h | 20h |
|---------|---|-----|-----|
| CONTROL | 1 | 52 | 60 |
| | 2 | 52 | 58 |
| | 3 | 53 | 57 |
| | 4 | 54 | 55 |
| #30 | 1 | 47 | 62 |
| | 2 | 46 | 62 |
| | 3 | 45 | 63 |
| | 4 | 43 | 64 |
| #96 | 1 | 57 | 69 |
| | 2 | 55 | 65 |
| | 3 | 56 | 67 |
| | 4 | 58 | 70 |

| | | AVERAGE | ST.DEV. | T-STUDENT |
|---------|-----|---------|---------|------------|
| CONTROL | 16h | 52,75 | 1 | |
| | 20h | 57,5 | 2,1 | |
| #30 | 16h | 45,25 | 1,7 | 0,00543491 |
| | 20h | 62,75 | 1 | 0,01951015 |
| #96 | 16h | 56,5 | 1,3 | 0,00216603 |
| | 20h | 67,75 | 2,2 | 0,00458597 |

Tabla 4: la tabla muestra el halo de crecimiento (en mm) de las placas de agar motil control, con #30 y con #96 a 1 μ M. La tabla inferior muestra la media, desviación estándar y la T-student.

La TTEST muestra que en este caso, sí que hay diferencias significativas en lo que al halo respecta, en presencia del compuesto #96 a partir de las 16h, indicando que la presencia del compuesto #96 contribuye a un mayor movimiento de las bacterias. Por otro lado, el compuesto #30 tiene un efecto también significativo a las 16h, pero en este caso, el efecto es el inverso, reduciendo el movimiento de las bacterias. El efecto parece haber desaparecido (o incluso invertido) a las 20h. En el apartado de discusión se dará una posible explicación a este comportamiento paradójico.

➤ Agar motil con glucosa.

Medimos el halo, en mm, pasadas varias horas desde que inoculamos el cultivo en el centro de la placa.

| LB | LB glc | LB #96 | LB glc #96 | en mm | LB | LB glc | LB #96 | LB glc #96 | 4h a 30°C | LB | LB glc | LB #96 | LB glc #96 | /n a 37°C |
|-------------|---------|----------|------------|------------|--------|--------|--------|------------|------------|--------|--------|----------|------------|------------|
| 13 | 11 | 8 | 6 | | 18 | 11 | 11 | 6 | | 19 | 13 | 19 | 6 | |
| 14 | 9 | 8 | 8 | | 17 | 10 | 10 | 8 | | 23 | 13 | 19 | 9 | |
| 13 | 9 | 8 | 7 | | 16 | 10 | 10 | 7 | | 21 | 12 | 19 | 7 | |
| 13 | 11 | 9 | 6 | | 16 | 12 | 11 | 6 | | 21 | 14 | 16 | 7 | |
| 12 | 10 | 7 | 7 | | 15 | 11 | 9 | 7 | | 20 | 13 | 18 | 7 | |
| 13 | 10 | 7 | | | 14 | 11 | 8 | | | 20 | 13 | 19 | | |
| 13 | 10 | 7,833333 | 6,8 | MEDIA | 16 | 10,833 | 9,833 | 6,8 | MEDIA | 20,667 | 13 | 18,33333 | 7,2 | MEDIA |
| 0,63246 | 0,89443 | 0,752773 | 0,83666 | DESVEST | 1,4142 | 0,7528 | 1,169 | 0,83666 | DESVEST | 1,3663 | 0,6325 | 1,21106 | 1,09545 | DESVEST |
| | 0,00107 | 6,81E-06 | 3,88E-05 | TT | | 0,0004 | 3E-06 | 7,23E-05 | TT | | 3E-05 | 0,013897 | 3,2E-07 | TT |
| | LB | LB glc | LB #96 | LB glc #96 | Resta | LB | LB glc | LB #96 | LB glc #96 | Resta | LB | LB glc | LB #96 | LB glc #96 |
| 48h frio | 13 | 10 | 7,833333 | 6,8 | 5 | 0 | 3 | 0 | 6 | 2 | 11 | 0 | | |
| (+4h 30°C) | 16 | 10,83333 | 9,833333 | 6,8 | 3 | 1 | 2 | 0 | 9 | 4 | 11 | 1 | | |
| (+o/n 37°C) | 20,6667 | 13 | 18,33333 | 7,2 | 3 | 1 | 2 | 0 | 8 | 3 | 11 | 0 | | |
| | | | | | 3 | 1 | 2 | 0 | 8 | 3 | 7 | 1 | | |
| | | | | | 3 | 1 | 2 | 0 | 8 | 3 | 11 | 0 | | |
| | | | | | 1 | 1 | 1 | 0 | 7 | 3 | 12 | | | |
| | | | | | 3 | 0,8333 | 2 | 0 | MEDIA | 7,6667 | 3 | 10,5 | 0,4 | MEDIA |

Tabla 5: la tabla muestra el halo de crecimiento (en mm) de las placas de agar motil control, con #30 y con #96 a 10µ.

Según el gráfico y las diferentes medidas en el tiempo, vemos que con la condición que más se mueven las bacterias es con LB, si añadimos glucosa (10 mM) o el compuesto #96 (10 µM) , las bacterias se mueven menos. De igual manera, parece que el efecto de la glucosa y el compuesto #96 se suma, puesto que cuando añadimos las dos, el movimiento es nulo (rojo), los 6mm hacen referencia al diámetro de la gota inoculada.

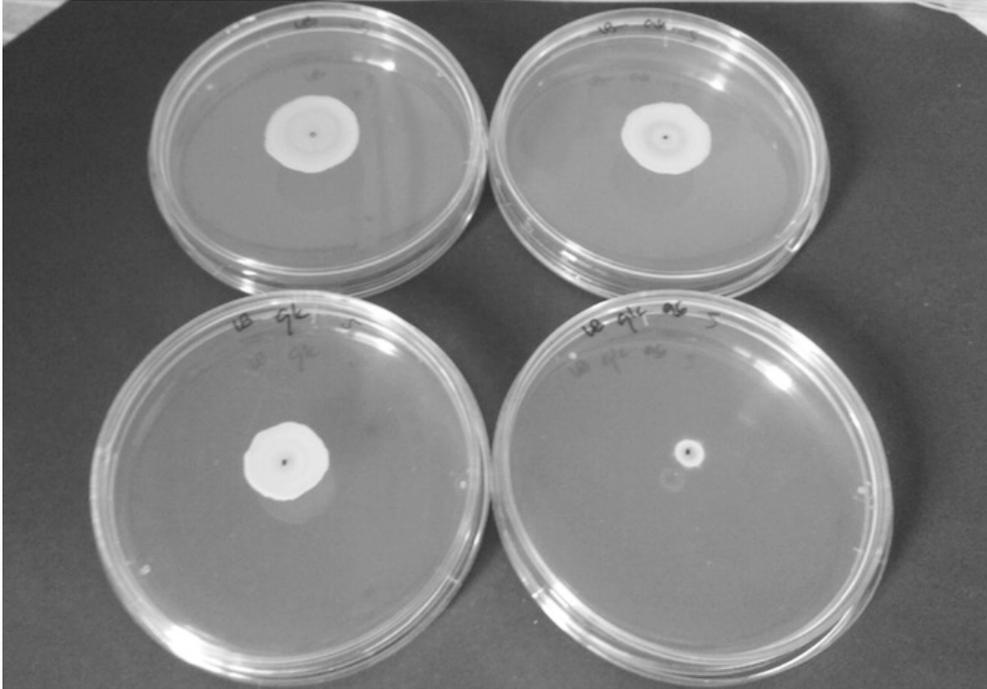
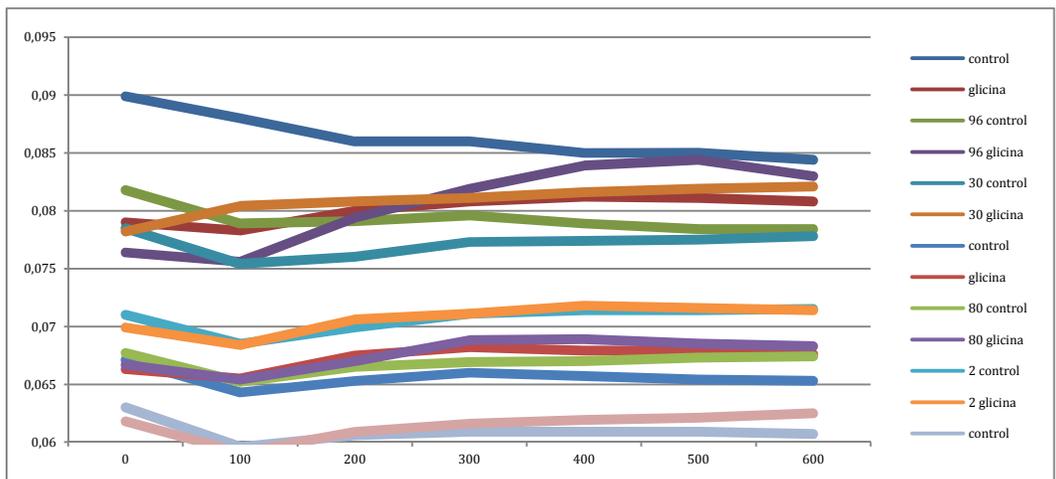
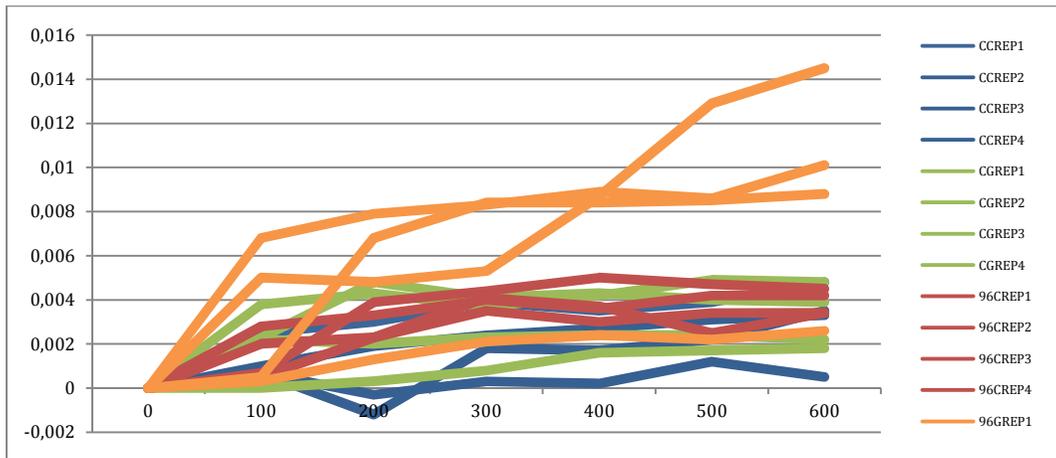
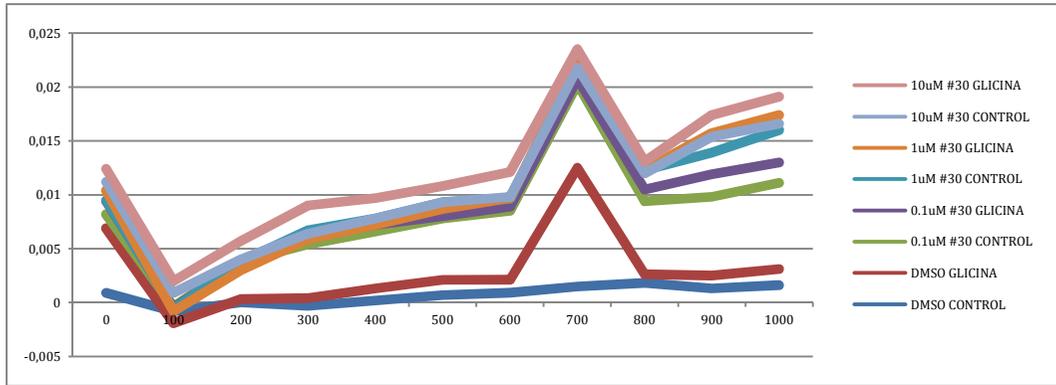


Figura 15: Imagen de las placas de agar motil. Arriba a la izquierda, imagen de una placa de agar motil control, a la derecha, con $10\mu\text{M}$ de #96. Abajo a la izquierda, agar motil con 10mM de glucosa, y a la derecha, agar motil con $10\mu\text{M}$ de #96 y 10mM de glucosa.

La diferencia de crecimiento, sobretodo con esta última condición es visualmente clara. De hecho, podemos decir que las bacterias no se han movido en absoluto, y que el halo que se aprecia, tan sólo hace referencia al crecimiento bacteriano dentro de la gota inoculada, los 6-7mm de diámetro solamente son de la gota de cultivo inoculada en el centro.

4.1.4.2. Quimiotaxis en cubetas hard-plug.

Repetimos este experimento varias veces, variando la concentración de los compuestos, partiendo de diferentes OD en el cultivo, midiendo la OD tras la adición del cultivo durante más o menos tiempo... pero cada vez obteníamos resultados distintos.



El método resultó ser poco robusto, poco reproducible. Cambiando el medio LB por buffer fosfato tampoco ayudó: los resultados no son reproducibles así que abandonamos este método.

4.1.4.3. Electroforesis y Western Blot con Phos-Tag.

Probamos el anticuerpo anti-CheA y con un Western blot normal.

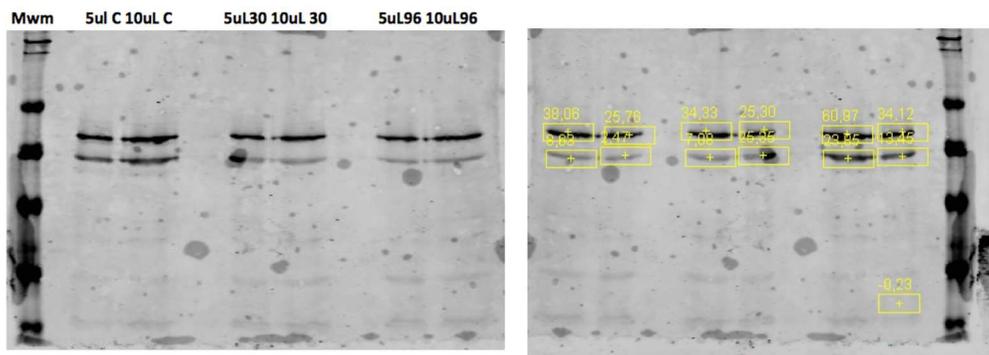


Figura 16: Imagen del WB anti-CheA normales (uno es la imagen especular del otro), El WB de la izquierda muestra la cantidad de CheA (l) y CheA (s) endógena en presencia de los diferentes compuestos. La imagen de la derecha muestra un detalle de la cuantificación.

CheA ya presenta doble banda por sí sola: se presenta en forma de dos isoformas, una corta y otra larga, pero sólo esperamos que se fosforile la forma larga, puesto que a la forma corta le faltan los 100aa del principio, entre los cuáles se encuentra el sitio de autofosforilación. La banda superior, parece ser más densa que la inferior. También comprobamos, que es un buen método para poder realizar una cuantificación relativa, y así, poder determinar si en presencia de alguno de los compuestos hay más cantidad de CheA fosforilada.

Las electroforesis de CheA y CheY se corrieron por separado, debido a la diferencia de tamaño entre ambas proteínas.

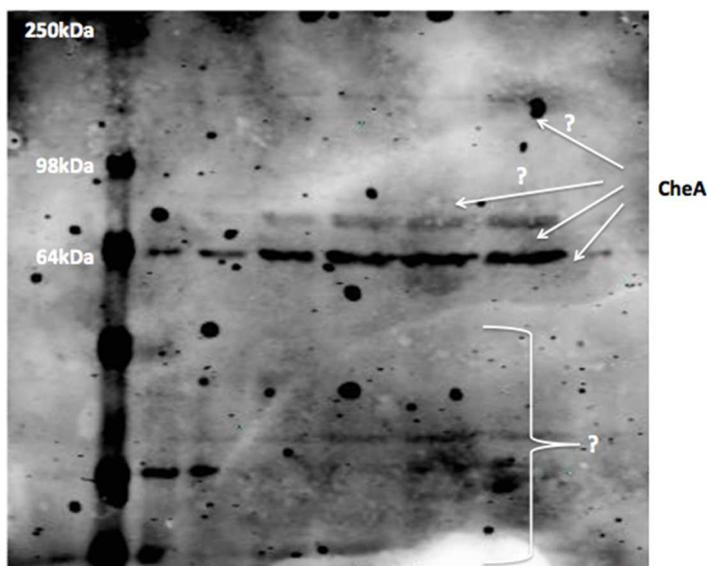


Figura 17: imagen del Western Blot Phos-tag anti-CheA sin compuestos.

En este Western Blot anti-CheA, se ha utilizado la electroforesis con Phos-Tag, no se han utilizado compuestos, y en los carriles se aprecia de izquierda a derecha, mayor concentración de extracto celular.

Vemos la doble banda correspondiente a CheA, pero esta vez, parece que la banda inferior de CheA es la más cuantitativa, al revés de lo que veíamos en el Western Blot tradicional, tiene sentido, puesto que aquí vemos una banda superior a la bi-banda, y la banda superior correspondiente a CheA (I) que es la que se puede fosforilar, es más ténue. Podría indicar que parte de la proteína que esperaríamos encontrar en esta banda, se encuentra ahora más arriba, siendo la fracción CheA(I)-P.

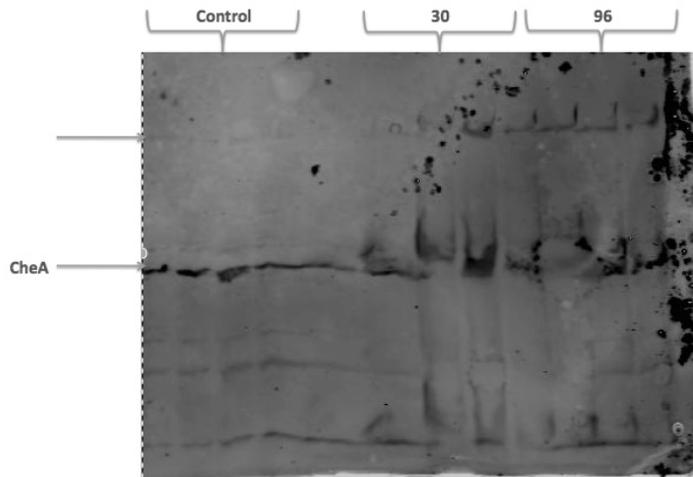


Figura 17: imagen del Western Blot Phos-tag anti-CheA con compuestos.

Si bien, el gel o el Western no son de muy buena calidad, parece que se aprecia una banda superior al tamaño de CheA. CheA está indicada con la flecha. Por encima de esta, parece que se intuye una banda superior en presencia de #30 y #96. Podría ser la banda correspondiente a la fracción fosforilada de CheA. Repetimos la electroforesis Phos-Tag y el Western Blot, esta vez anti-CheY:

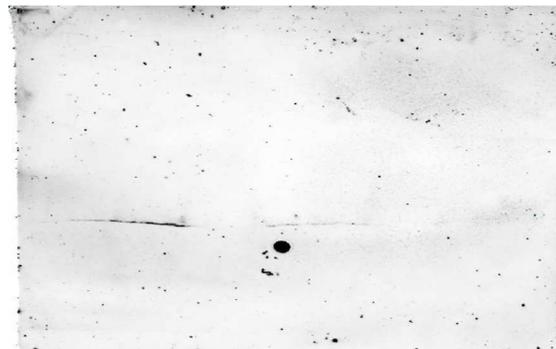


Figura 18: imagen del Western Blot Phos-tag anti-CheY sin compuestos.

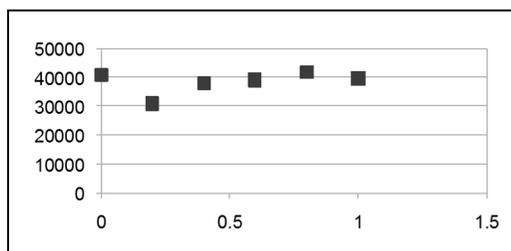
Este Western Blot es de mala calidad, si bien, es el único en el que se intuye alguna banda para CheY.

ENSAYO *IN VITRO*

4.1.5. Ensayo de Fosforilación *in vitro*

4.1.5.1. Obtención de las concentraciones de CheY y CheYBSCheA óptimas para llevar a cabo el ensayo: Empezamos con el STANDARD de ADP.

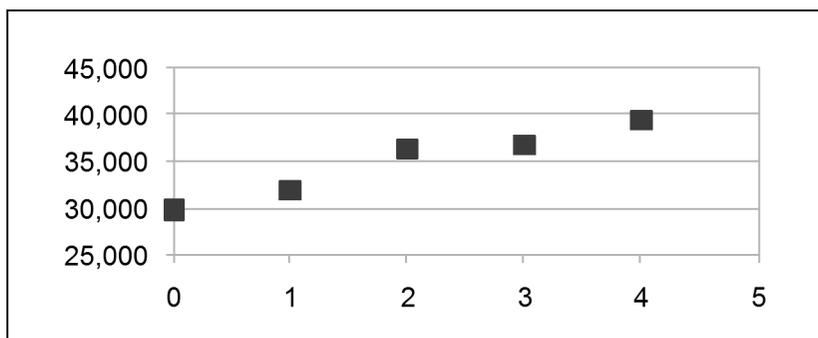
| STANDARD | | | |
|-----------|-------|-------|---------|
| nmol/well | REP1 | REP2 | AVERAGE |
| 0 | 35473 | 46038 | 40755,5 |
| 0,2 | 28348 | 33383 | 30865,5 |
| 0,4 | 40005 | 35526 | 37765,5 |
| 0,6 | 35364 | 42905 | 39134,5 |
| 0,8 | 38024 | 45743 | 41883,5 |
| 1 | 35359 | 43748 | 39553,5 |



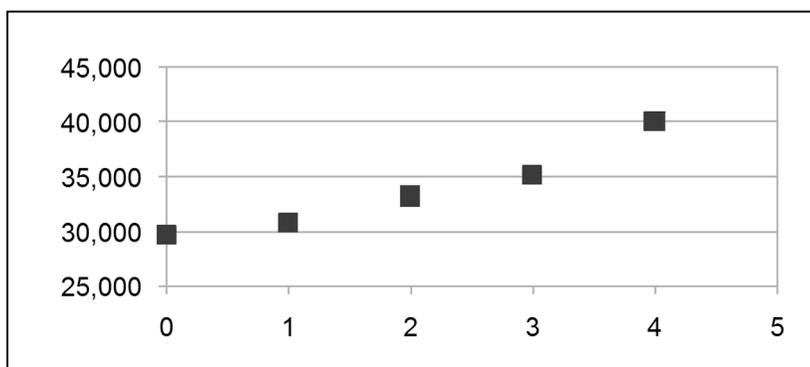
Tal cuál vemos en el gráfico, el Standard de ADP no reacciona cómo se esperaba: en ocasiones hay bastante variabilidad entre réplicas, y si graficamos la media, esta no sigue una progresión lineal como esperaríamos. De hecho, no hay diferencia entre concentraciones.

Se muestran las tablas a diferentes concentraciones de CheY y CheYBSCheA para ver qué concentraciones son las más adecuadas para ensayar compuestos. Incubamos la reacción a dos tiempos diferentes, para ver si hay diferencias.

| INC 30 min | A | Y | REP1 | REP2 | REP3 | AVG |
|------------|-----|-----|-------|-------|-------|---------|
| 0 | 0 | 0 | 35370 | 25720 | 28042 | 29710,7 |
| 1 | 0,6 | 1,2 | 31737 | 32646 | 27927 | 30770,0 |
| 2 | 1,2 | 2,5 | 33724 | 36491 | 29412 | 33209,0 |
| 3 | 2,5 | 5 | 36698 | 33172 | 35297 | 35055,7 |
| 4 | 5 | 10 | 40914 | 40354 | 38808 | 40025,3 |



| INC 60 min | | | | | | |
|------------|-----|-----|-------|-------|-------|---------|
| | A | Y | REP1 | REP2 | REP3 | AVG |
| 0 | 0 | 0 | 28518 | 30914 | | 29716,0 |
| 1 | 0,6 | 1,2 | 29540 | 33400 | 32505 | 31815,0 |
| 2 | 1,2 | 2,5 | 38418 | 33795 | 36311 | 36174,7 |
| 3 | 2,5 | 5 | 36413 | 38740 | 34669 | 36607,3 |
| 4 | 5 | 10 | 37945 | 38806 | 41287 | 39346,0 |

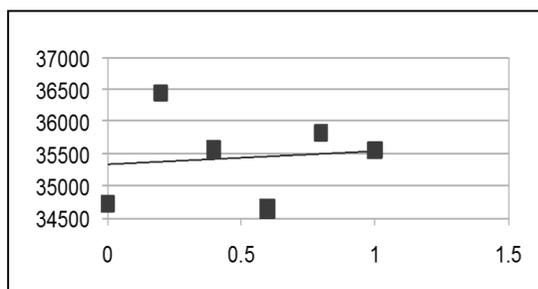


El gráfico superior, corresponde a la incubación a 30°C durante 30 minutos y la inferior, a la incubación a 30°C durante 60 minutos. A pesar de que ambos gráficos siguen la misma tendencia, a más concentración de proteína, más formación de ADP, las concentraciones más altas a 60 minutos parecían turbias, desnaturalizadas, es por eso que decidimos trabajar con la incubación a 30 minutos y con 2.5µM de CheA y 5µM de CheY.

5.2. Ensayo de Fosforilación *in Vitro* en presencia de compuestos.

Se espera que, si los compuestos incrementan la afinidad del complejo CheA-CheY, disminuirá la eficiencia de la transferencia de fosfato de CheA a CheY, por lo que se esperara que disminuya el consumo de ATP, por ello pretendemos medir el efecto de los compuestos sobre esta reacción. No obstante, como se muestra en las siguientes tablas, los resultados obtenidos con el standard de ADP en una nueva calibración del método son totalmente deficientes. Estos resultados se volvieron a obtener en una repetición del ensayo, concluyendo que el kit era defectuoso.

| STANDARD | | | |
|----------|-------|-------|---------|
| nmol | REP1 | REP2 | AVG |
| 0 | 34641 | 34742 | 34691,5 |
| 0,2 | 34157 | 38738 | 36447,5 |
| 0,4 | 37117 | 33989 | 35553 |
| 0,6 | 36415 | 32842 | 34628,5 |
| 0,8 | 33987 | 37641 | 35814 |
| 1 | 34921 | 36164 | 35542,5 |



4.2. Estudio de la Función Regulatoria por Alostereismo en HDAC8.

4.2.1. Expresión de HDAC8 wt y Mutantes

> *Expresión con kit cell-free expression (Human) de Thermo Scientific ®:*

Tras la TRANSCRIPCIÓN corremos un gel de agarosa para comprobar que el RNA perteneciente a HDAC8 y los diferentes mutantes se forma de manera adecuada:

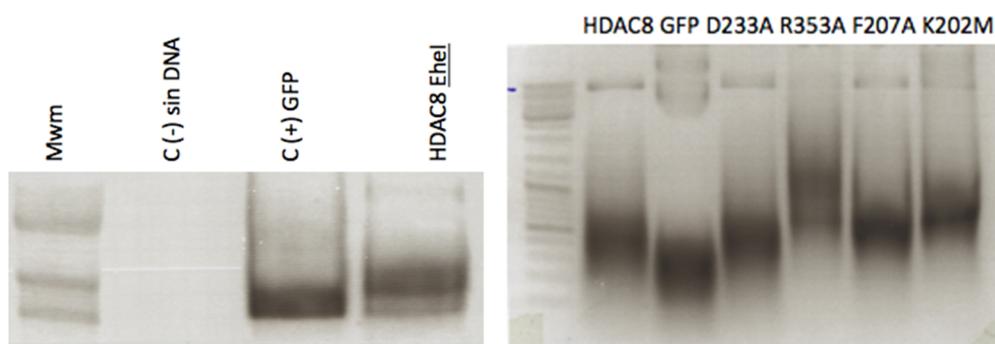


Figura 19: gels de agarosa de comprobación. A la derecha, el RNA resultante de todos los mutantes.

Una vez comprobamos que la transcripción funciona, tanto para HDAC8 como para los diferentes mutantes, proseguimos con el siguiente paso, la traducción. Primeramente, probamos la traducción a diferente tiempo y temperaturas.

Tras las diversas pruebas, corremos un gel de acrilamida, y realizamos un Western Blot anti-FLAG (Figura 20).

El Western Blot contra FLAG funciona, según el control positivo, pero no vemos expresión de proteína en los diferentes carriles, ni a diferentes tiempos de traducción. Repetimos el proceso diferentes veces, variando los tiempos de traducción, y cargando más cantidad en el gel, pero el resultado siempre es el mismo: No se observa expresión de HDAC8.

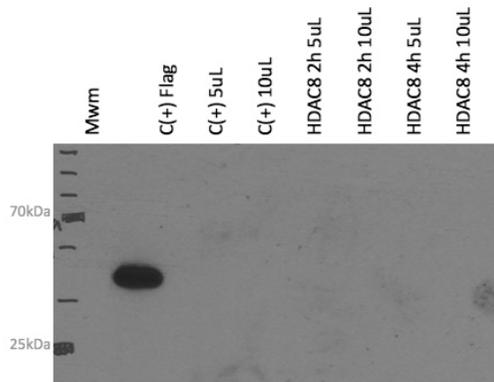


Figura 20: Western Blot de comprobación anti- Flag.

Decidimos realizar una pequeña prueba de expresión de este vector que contiene GFP, y observar si tiene lugar la expresión de GFP bajo el microscopio de fluorescencia:

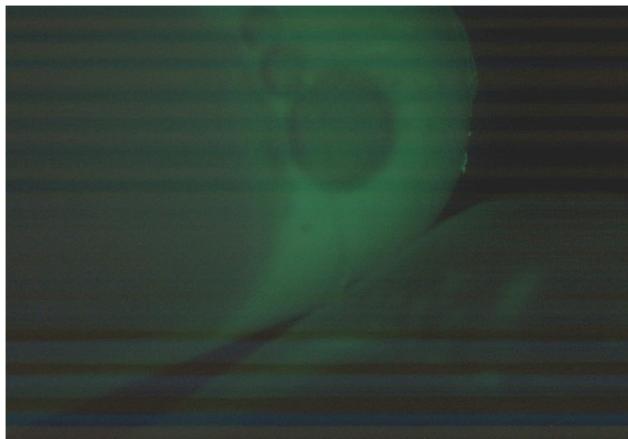


Figura 21: fotografía del eppendorf donde se ha expresado GFP, bajo el microscopio de fluorescencia.

Comprobamos así, bajo el microscopio que la expresión de GFP se está llevando a cabo de manera correcta. Acordamos entonces, que posiblemente, la expresión de HDAC8 también esté

teniendo lugar, pero a baja concentración, lo que dificulta su detección, así que decidimos cambiar de método y expresar HDAC8 en células humanas.

4.3.1. Ensayo de Fosforilación de HDAC8 por parte de PKA.

4.3.1.1. Expresión de HDAC8 en HEK293T.

HDAC8 y los diferentes mutantes se expresan bien en células humanas HEK293T. Comprobamos su expresión mediante Western Blot anti-Flag.

4.3.1.2. Western Blot

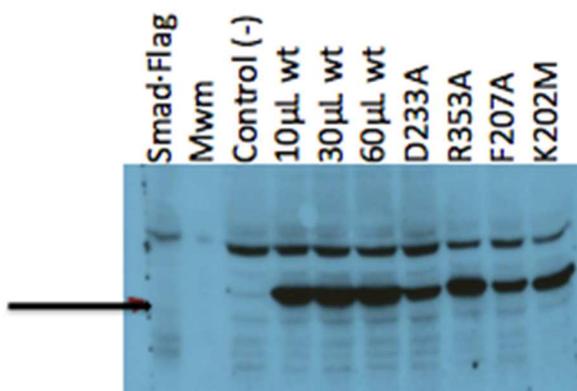
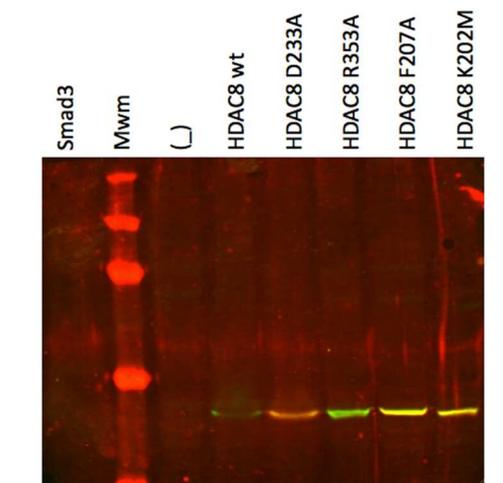


Figura 22: Western Blot anti-FLAG. La flecha señala a la altura que migra HDAC8.

En este Western Blot anti-Flag vemos que HDAC8 se expresa bien, tanto wt como los diferentes mutantes. En el control negativo no aparece la proteína de 43kDa.



Con este Western Blot comprobamos que anti-FLAG y anti-pSer39 co-localizan: por la presencia de color Amarillo, resultante de la fluorescencia roja+verde, siendo rojo anti-pSer39. El Western Blot se realizó sin fosforilar HDAC8 con PKA, así que detecta el nivel de fosforilación endógeno en la célula.

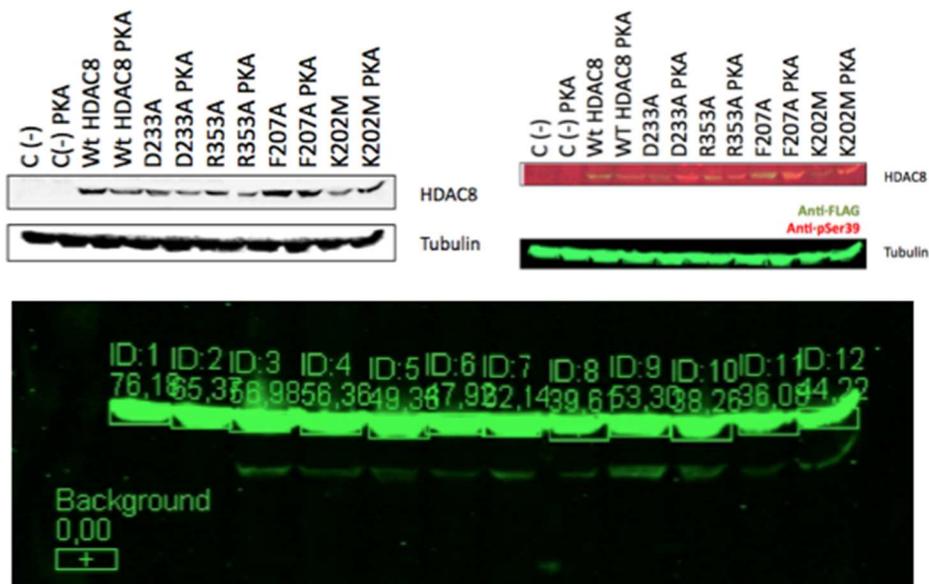


Figura 23: Western Blots anti-HDAC8 revelados con Odyssey. La imagen inferior muestra la cuantificación posterior.

Las imágenes superiores (Imagen 23) corresponden al Western Blot anti-FLAG (del HDAC8) que se muestra en verde, y el anti-pSer39 que se muestra en rojo, y que reconoce la fracción de HDAC8 fosforilada. En el Western superior derecho, se muestra que la anti-pSer39 se localiza solo cuando actúa previamente la PKA. También se muestra la anti-tubulina, que sirve para normalizar las cantidades de extracto.

4.3.1.3. Ensayo de Actividad

Recogemos los resultados de Actividad del kit de Cayman Chemicals, y normalizamos los resultados obtenidos en base a la cuantificación realizada mediante el software de Odyssey. En el gráfico superior vemos en azul, el resultado de la actividad de HDAC8 y los diferentes mutantes en ausencia de PKA, y en rojo, después de la inhibición por fosforilación por PKA.

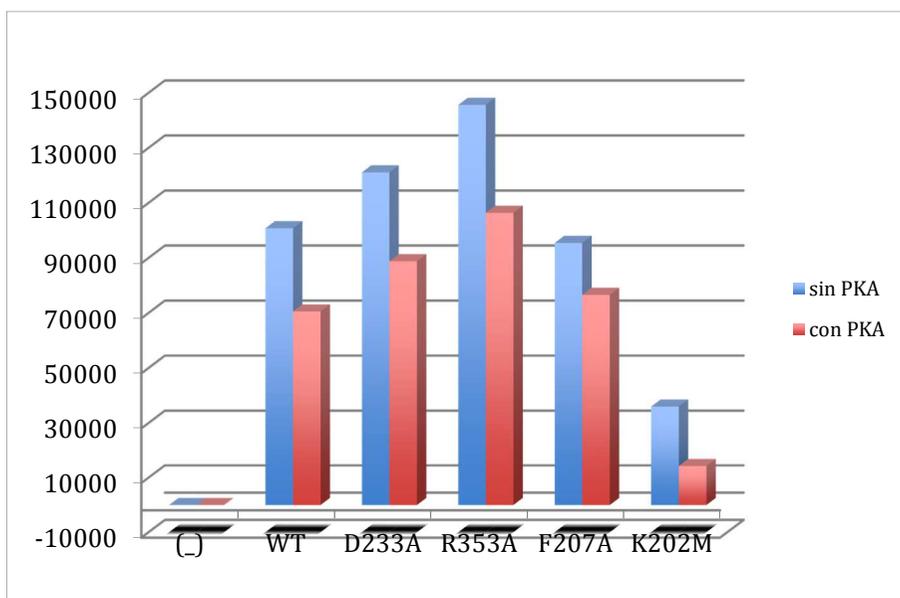


Figura 24: Gráfico de la actividad desacetilasa de los diferentes mutantes después de la normalización por cantidad.

Todos los mutantes y la Wt disminuyen su actividad tras la inhibición por fosforilación de PKA. El mutante K202 tiene bastante menos actividad que el Wt, según las dinámicas esto es respecto a que es la conformación cerrada la que está favorecida. En cuanto al mutante F207, pasa al contrario, tiene la misma actividad que Wt. Los mutantes D233A y R353A tienen más actividad que Wt: cuando falta uno de ellos, se desestabilizan las interacciones con K202M, propiciando la conformación abierta del loop. Lo que concuerda con los resultados computacionales.

5. Discusión

En esta tesis se aborda un ambicioso proyecto en el que se quiere demostrar, por primera vez, que es posible utilizar métodos racionales para identificar estabilizadores específicos de dímeros proteína-proteína mediante ligandos que se unen a la interfaz del complejo. Éste es un mecanismo de acción que explotan un buen número de productos naturales, pero que permanece eminentemente inexplorado en aproximaciones racionales. Si bien se ha trabajado abundantemente en la modificación química de ligandos pre-existentes para modular sus propiedades¹²⁶, el progreso en este campo se ve limitado en parte por una falta de conocimiento sobre este tipo de mecanismo de acción y en parte por la dificultad intrínseca de las cavidades interfaciales. Que estos sitios son objetivamente difíciles se pone de manifiesto en el hecho que el screening virtual ha fracasado incluso cuando se ha intentado identificar nuevos ligandos para cavidades ya explotadas por compuestos naturales¹²⁷. En este proyecto se intenta ir todavía un paso más allá, trabajando sobre un sitio interfacial que no ha sido descrito previamente y para el que no se ha descrito ligandos conocidos. Para poder afrontar este reto, previamente se desarrollaron en el grupo herramientas computacionales de predicción de sitios "druggable", que se han aplicado en tándem para primero filtrar todas las estructuras del PDB¹⁵, identificando unas pocas cavidades candidatas en la interfaz de heterodímeros y, posteriormente, confirmar su capacidad para unir moléculas orgánicas¹⁴. El sistema seleccionado (heterodímero CheA-CheY) ofrecía, a priori, importantes ventajas metodológicas, puesto que se trata de un sistema muy bien caracterizado a todos los niveles y abre la posibilidad de evaluar la actividad de los compuestos in vivo, mediante ensayos de motilidad. Una vez identificado el sitio diana, se procedió a seleccionar compuestos con el potencial para unirse a la interfaz mediante un screening virtual con el programa de docking molecular rDock¹²⁸.

Los programas de docking identifican complementariedad química entre pequeñas moléculas y las cavidades de las proteínas usando métodos aproximados pero suficientemente rápidos

como para aplicarlos a gran escala¹²⁹. Las imprecisiones de las funciones de puntuación de los programas de docking hacen necesario suplementarlas con información empírica para tener ciertas garantías de éxito en las aplicaciones de screening virtual. Puesto que no existía información previa para el sitio de interés, se utilizó la técnica MDmix para identificar puntos de interacción especialmente favorables (los denominados “hot spots”), que se usaron como restricciones en el proceso de docking³⁸. Sin duda, éste procedimiento tuvo un papel determinante en el éxito del proceso.

De entre los distintos métodos experimentales posibles para evaluar la actividad de los compuestos seleccionados se optó por la técnica de resonancia de plasmón en la superficie (SPR^{91,130}) puesto que, por un lado permite evaluar directamente la propiedad deseada (incremento de la afinidad aparente el complejo) y por otro ofrece suficiente capacidad como para evaluar todos los compuestos seleccionados en el paso anterior. La puesta a punto del ensayo SPR requirió por un lado la producción de las proteínas de interés y, por otro, identificar un método de inmovilización y unas condiciones de ensayo adecuadas al problema. La producción de proteína ha sido un presión continua a lo largo del proyecto puesto que al investigar un heterodímero ha sido necesario producir dos proteínas distintas. Además, una de ellas (CheA) ha sido necesario producirla en dos formas distintas: la versión completa y la versión corta, la cuál sólo contiene el dominio de unión a CheY.

Retrospectivamente, uno de los aspectos que hubiese sido interesante considerar desde el inicio es la estandarización de los protocolos de producción y, tal vez, la investigación de constructos alternativos (tags, eliminación de zonas desordenadas, etc.) que ofrecieran ventajas en los distintos experimentos que se han realizado y/o incrementasen la estabilidad de las proteínas resultantes. La obtención de un protocolo de SPR adecuado para testar la actividad de los compuestos seleccionados también resultó mucho más laboriosa de lo esperado y el limitado acceso a un recurso compartido en alta demanda (Biacore T100, en los servicios científico técnicos de la universidad) también retrasó el proyecto. Este tipo de consideraciones, que ignorábamos al inicio del proyecto, hubiesen hecho deseable considerar otras opciones, aunque no existe una alternativa claramente superior y las existentes (tales como los ensayos de fluorescencia) también implican múltiples pasos de prueba y error con una viabilidad incierta. A pesar de las dificultades, el proceso culminó con éxito, pudiéndose:

1. Determinar la constante de afinidad entre CheY y el dominio de CheA que la une ($K_d = 11.3 \text{ } \mu\text{M}$, muy parecido a datos publicados con otras técnicas)
2. Analizar el efecto de los compuestos seleccionados sobre la formación del complejo
3. Identificar un compuesto (#30) con capacidad de multiplicar por 6 la afinidad aparente del mismo ($K_d = 1.9 \text{ } \mu\text{M}$, en presencia de #30 a $100 \text{ } \mu\text{M}$).

Esto dio pie a la búsqueda de compuestos más potentes con una estructura química parecida a la del compuesto activo. En base al modo de unión previsto, y buscando en catálogos de compuestos comerciales, se seleccionaron y ensayaron dos decenas de compuestos adicionales, entre los cuales el compuesto #96 apareció como más potente que el compuesto original. No obstante, la inferior solubilidad del #96 introduce limitaciones y el compuesto #30, gracias a una solubilidad superior a 1mM , ha ofrecido un mejor comportamiento en buen número de los ensayos posteriores.

En el proceso de screening con SPR, también se han identificado compuestos inhibidores de la interacción CheA-CheY. Aunque tal vez resulte contra-intuitivo que compuestos con una estructura química muy similar tengan comportamientos contrarios, éste tipo de comportamiento se ha descrito con anterioridad, y se explica por el hecho que los compuestos que favorecen la asociación establecen interacciones favorables con las dos proteínas en la interfaz, mientras que los inhibidores mantienen interacciones favorables con una de las proteínas, pero dificultan la formación del complejo al formar interacciones desfavorables con la otra¹³¹. La obtención de inhibidores de interacciones proteína-proteína es un gran reto, con gran potencial terapéutico y está recibiendo mucha atención en el mundo del diseño de fármacos. Por este motivo, y también como proyecto secundario, hubiera sido interesante poder caracterizar mejor a los inhibidores y es un objetivo a tener en cuenta en el futuro²⁷.

Una vez identificados compuestos con la actividad deseada ("PP-glue"), se procedió a caracterizar los compuestos a nivel estructural, biofísico y biológico. Una gran parte del esfuerzo se ha centrado en la elucidación estructural mediante la técnica de cristalografía por rayos X. En primer lugar, se investigaron un buen número de condiciones de cristalización, tomando como referencia las condiciones estándares de screening general que utilizan en el

IRB-PCB, de hecho, esta parte se realizó en colaboración con el grupo del Dr. Miquel Coll, y en las instalaciones de la PAC-IRB-PCB-UB y el fin principal era el de reproducir la estructura del dímero.

Éste ejercicio culminó con éxito, se pudo resolver la estructura cristalina del dímero con una resolución de 2,5Å, así que se usaron estas mismas condiciones de cristalización como punto de partida para intentar obtener cristales del complejo ternario. Asimismo, se ha hecho soaking de los cristales obtenidos del dímero. Por el momento no ha sido posible obtener cristales que generen un patrón de difracción suficientemente bueno como para poder resolver la estructura. Si bien los cristales presentan una forma nítida, difractan a una resolución superior a 3Å, lo cuál, de resolver la estructura, posiblemente no nos permitiría determinar la localización de los compuestos. Como estrategia alternativa, se han llevado a cabo estudios de dinámica molecular para evaluar la estabilidad del modo de unión predicho. Los dos compuestos activos presentan un modo de unión muy parecido y estable en todas las simulaciones realizadas (tiempo de simulación agregado de 0.45μs, por triplicado). Estos resultados computacionales animan a creer que los compuestos realmente se unen a la interfaz del dímero, pero la caracterización estructural directa mediante rayos X añadiría credibilidad y robustez a los resultados.

La caracterización biofísica del complejo y de los diferentes compuestos, por Termoforesis, muestra unos resultados muy similares y comparables a los obtenidos mediante SPR: la Kd del dímero CheY/CheYBSCheA es de 24.35 o 24.9μM dependiendo de si tritramos una unidad u otra, ambos resultados son claramente similares. Sin embargo, si evaluamos la constante de afinidad entre el dímero CheA/CheY los resultados cambian de 9 a 0.9μM dependiendo de si tritramos en el primer lugar a CheA y en el segundo lugar a CheY. La caracterización de los compuestos cuando CheA está en juego y es la proteína a tritar, tampoco resulta del orden del obtenido por SPR, sospechamos que el motivo podría deberse al marcaje de CheA para la prueba, la adición de las moléculas de fluoróforo, bien podrían estar enmascarando el lugar de unión a CheY, o bien, podrían propiciar un cambio conformacional de CheA dificultando así su unión a CheY. Si nos centramos en el dímero CheY/CheYBSCheA, podemos ver que en presencia del compuesto #30 la afinidad del complejo aumenta 6 veces, mientras que con el compuesto #96 aumenta unas 2,5 veces. (ambos compuestos a 25μM). Estos datos invierten la potencia relativa de los compuestos activos respecto a lo observado por SPR, de modo que no

podemos estar seguros de cual de los dos compuestos es más activo, y es un aspecto que merece ser investigado. No obstante, el compuesto #96 sufre de baja solubilidad y, a la práctica, resulta mucho más conveniente seguir caracterizando el compuesto #30. Hemos podido comprobar la afinidad con el compuesto #30 a alta concentración (5mM), comprobando que la afinidad del dímero aumentaba aún más, llegando a 9 veces la del dímero sin tratar. Esto indica que el efecto del compuesto #30 es próximo a la saturación a 25 μ M. Con el compuesto #96 no hemos podido reproducir este experimento, debido a su baja solubilidad, que ya ha sido comentada anteriormente. Precisamente, para evitar problemas de solubilidad en esta y otras pruebas biofísicas, así como cristalografía, elegimos 4 fragmentos que contienen la benzensulfonamida. Estos son de tamaño menor y más solubles que los compuestos, por ello los ensayamos a mayor concentración y, en general, todos ellos, excepto el fragmento #3 (benzensulfonamida sin sustituir) aumentan la afinidad del dímero. De todos ellos, el que más aumenta la afinidad es el #1, el cuál casi triplica la afinidad del dímero, y esto tiene sentido si comparamos estructuras puesto que contiene una amina en la misma posición que el compuesto #96. A su vez, el fragmento #4 aumenta la afinidad a el doble, lo que también tiene sentido si comparamos estructuras, porque contiene un átomo hidrofóbico (Cloro) en la posición donde el compuesto #30 presenta el anillo de furano, también hidrofóbico. Este limitado conjunto de relaciones estructura-actividad dan soporte al modo de unión predicho, pero son insuficientes para validarlo.

Para obtener datos más robustos y poder determinar con confianza cual de los dos compuestos es más potente, quizá podrían llevarse a cabo más experimentos de Termoforesis, evitando BSA y usando menor concentración de compuestos, situandonos en un rango donde #96 sea completamente soluble. También se podría complementar/corroborar con el uso de alguna otra técnica como ITC. Al principio de empezar con el sistema, se realizó un intento, pero no se obtuvieron resultados concluyentes y se consumió mucha proteína, en un momento en que su producción era un factor limitante. Una vez solventado este problema con los nuevos vectores, podría ser interesante realizar mediciones de afinidad del dímero y de los diferentes compuestos ternarios con esta técnica. Por otro lado, pruebas de cristalización llevadas a cabo con los fragmentos tampoco han resultado, los cristales aparecidos no difractan bien, o no lo hacen a suficiente resolución, y en ocasiones se aprecia un halo intenso exterior

correspondiente al fragmento, dificulta el análisis del mismo. En lo que a los soakings de fragmentos respecta, tampoco ha habido suerte. Parece que la concentración de fragmentos es tan elevada que enmascara la estructura del cristal, por ello, más adelante se volverá a intentar, con pequeños cambios a fin de intentar disminuir la concentración de fragmento antes de la difracción.

La caracterización biológica de los compuestos y su actividad en la célula, se ha estudiado mediante ensayos de motilidad, western blots anti proteína fosforilada y ensayo de fosforilación. En primer lugar, mediante simples ensayos de viabilidad celular en medio líquido, acordamos que la presencia de los compuestos, ni tampoco la cantidad de DMSO añadida, afectaba al crecimiento de la célula, ni a su división. Los ensayos de motilidad en medio mínimo y con 100 μ M de compuesto muestran un comportamiento paradójico, puesto que a 16h el #30 disminuye el desplazamiento celular mientras que el #96 lo aumenta, ambos de manera estadísticamente significativa. En principio, esperaríamos que los compuestos estabilizasen el complejo CheA-CheY, y que esto impidiese (parcialmente) la transferencia de fosfato, resultando en una disminución de la cantidad de CheY-P, lo cual propicia el movimiento lineal (swimming), mientras que si la cantidad de CheY fosforilada aumenta, se activa el movimiento aleatorio (tumbling).^{55,132} Sin embargo, hay que tener en cuenta que en agar motil, al contrario que en medio líquido, mayor frecuencia de swimming respecto a tumbling no implica necesariamente mayor desplazamiento. Esto se debe a que si no modifican su dirección, las bacterias quedan eventualmente atrapadas en la matriz de agar, lo que impide su avance^{110,62}. De hecho, según Cluzel et. Al¹³³, las bacterias están en un estado "trapped" hasta que ocurre el primer tumble, y es entonces cuando se desplazan. De hecho, alternar fases de swimming con fases de tumbling, modifican su dirección y consiguen un avance neto mayor¹³⁴. De este modo se comprende que una frecuencia de tumbling muy alta o muy baja implique menor desplazamiento y que una frecuencia de movimiento lineal superior a la "natural" pueda resultar en menores desplazamientos (Figura 25). Este comportamiento puede reproducirse usando el software RapidCell¹³⁵ que simula el comportamiento motil de una célula de *E. coli* a partir de la ecuaciones (algebraicas y diferenciales) del sistema quemotáctico. Efectivamente, obtenemos que al reducir el porcentaje de CheY fosforilada al 50%, la distancia recorrida aumenta levemente, mientras que una reducción de CheY-P del 95% disminuye la distancia notablemente. Esto nos permite postular que el compuesto #96 modifica la interacción entre CheA y CheY, estabilizándola, pero consigue tan sólo una

moderada reducción de la transferencia de fosfato, lo que aumenta la velocidad de desplazamiento de las células. El compuesto #30 tiene un efecto estabilizante mayor (bien por ser más potente, bien por ser más soluble), lo que produce una reducción mucho mayor en el porcentaje de CheY fosforilada, disminuyendo la frecuencia de tumbling a niveles que retardan el avance.

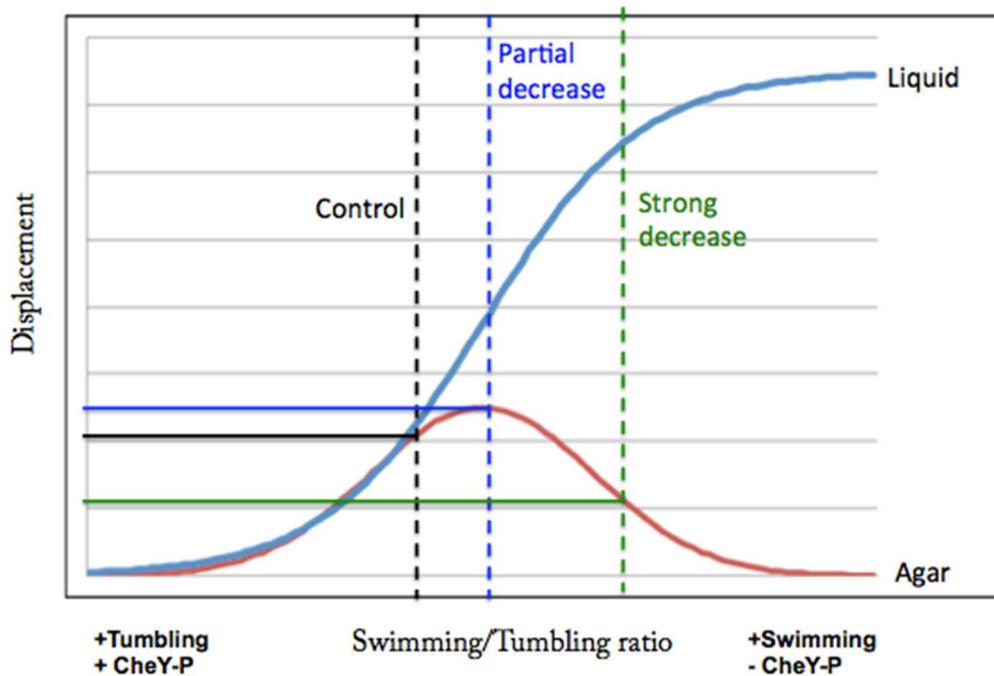


Figura 25: Esquema conceptual donde se muestra de modo cualitativo la relación entre la frecuencia de swimming/tumbling y la velocidad de desplazamiento de una bacteria en medio líquido (azul) y en agar motil (rojo). También se muestra tres situaciones teóricas, correspondientes a la célula sin tratar (negro), una disminución parcial de la cantidad de CheY fosforilada (rojo), y una disminución fuerte de la cantidad de CheY fosforilada (verde).

La presencia de nutrientes también afecta los niveles de CheY fosforilada, por lo que hemos querido investigar el efecto de nuestros compuestos en distintas condiciones. En este caso

hemos usado una concentración inferior de #96 (10 μ M) para estar dentro de su rango de solubilidad. En este caso vemos que el compuesto reduce la motilidad de las células en medio rico (LB), y que este efecto es sinérgico con el que produce una alta concentración de glucosa. Esto parece indicar que en situaciones en que la proporción de tumbling es menor (debido a la presencia de nutrientes), una estabilización del complejo CheA-CheY también consigue disminuir la concentración de CheY fosforilada, favoreciendo todavía más el movimiento lineal, lo que (en medio agar motil) limita la velocidad de desplazamiento. A pesar de que se tienen que realizar algunos experimentos más (por ejemplo, sería conveniente también realizar experimentos de quimiotaxis, porque los realizados son sólo de motilidad). estos datos apuntan en la dirección que nuestros compuestos podrían estar actuando in vivo mediante el mecanismo deseado.

Para comprobar que el mecanismo de acción es el descrito, y que en presencia de compuestos vemos en general, mayor movimiento aleatorio y que esto es causa de una menor fosforilación de CheY, realizamos western blots para detectar el nivel de fosforilación de CheY tras la acción de diferentes compuestos. El Western blot phos-tag anti CheA, parece que apoya esta premisa: en presencia de #30 y #96 aparece una banda superior, que podría corresponder con la fracción de CheA fosforilada, esta es mayor en presencia de #96 que en presencia de #30.. Por el contrario, el Western Blot anti-CheY resultó poco informativo, no se aprecia la presencia de CheY ya sea fosforilada o no, y probablemente sea causa del anticuerpo; debe utilizarse a muy alta concentración pero pese a ello, no se detecta CheY, y está descrito que CheY se expresa al mismo nivel que CheA. El ensayo de fosforilación de CheY por parte de CheA para identificar diferencias en el nivel de fosforilación de ambas proteínas en presencia y ausencia de compuestos no ha dado resultados, pero ofrece otra posible vía para validar el mecanismo de acción. En cuanto a los western blot, el nuevo sistema tendría que proporcionarnos resultados más fiables: sobreexpresando en vez de intentar detectar la endógena, tendremos mayor cantidad de proteína para ser detectada y además con el anticuerpo contra las colas de histidina esperamos solventar el problema del anticuerpo anti CheY.

En definitiva, hemos logrado el difícil objetivo de identificar compuestos que estabilicen un heterodímero mediante la explotación de una cavidad interfacial sin ligandos conocidos y para

la cual se desconocía completamente su capacidad para unir pequeñas moléculas orgánicas. No obstante, los resultados obtenidos son todavía insuficientemente conclusivos como para poder afirmar que los compuestos actúan a través del mecanismo de acción esperado y, sobretodo, creemos que hace falta una mejor caracterización de los compuestos a nivel biológico, que se podría complementar con estudios teóricos del efecto de los compuestos sobre la red de interacciones de las proteínas implicadas en quimiotaxis, un sistema para el cual se conocen todos los componentes y las relaciones entre ellas^{136,137,111,41}. Yendo un paso más allá, sería interesante optimizar la potencia de los compuestos y evaluar su potencial como antibióticos, puesto que alterando la quimiotaxis, podemos alterar la motilidad y esta, se ha descrito que es un factor de virulencia bacteriana¹³⁸.

La capacidad de los métodos computacionales desarrollados en el grupo para poder encontrar compuestos que actúan sobre lugares en las proteínas no descritos como sitios de unión abre un gran abanico de posibilidades. Además de las interfaces entre dímeros, las interfaces entre dominios de una misma proteína también ofrecen grandes posibilidades terapéuticas, es el mecanismo de acción de algunos fármacos conocidos¹³⁹ y podrían ser abordados con técnicas parecidas a las usadas en esta tesis. En general, los sitios alostéricos ofrecen la posibilidad de modular la actividad de un gran número de proteínas, muchas de las cuales podrían no presentar sitios ortoestéricos. La respuesta biológica obtenida va a depender de la localización del sitio y de la naturaleza del compuesto, pero en todos los casos esta respuesta va ser el resultado de una alteración del comportamiento dinámico de la(s) proteína(s). Por esta razón es tan importante poder entender y predecir las relaciones estructura-dinámica-actividad. Lo cual sólo puede ser abordado desde una aproximación multidisciplinar, que combine estudios computacionales y experimentales. Esto es precisamente lo que se ha logrado en el caso de HDAC8.

Los resultados obtenidos de las dinámicas moleculares pertinentes de HDAC8 wt y los diferentes mutantes, sugieren un mecanismo de propagación alostérica en el que Ser39 tiene un papel crucial. Podemos apreciar el cambio conformacional que se propaga desde esta Ser39, recorriendo diferentes cadenas de la proteína hasta llegar al loop que da acceso a la

entrada del sustrato. Todo ello se inicia con la adición de un fosfato a este residuo clave. Como claves han sido las mutaciones seleccionadas: dos de ellas, afectan directamente al loop: K202M y F207A, y las otras dos establecen uniones con el loop cuando este está cerrado. Los resultados experimentales, apoyan las premisas establecidas tras el estudio computacional: si mutamos F207A, D233A o R353A, el resultado es el mismo: tanta o mayor actividad que la proteína wt, puesto que lo que se rompe es el cierre del loop en alguno de los puntos, esto propicia la conformación abierta, lo que se traduce en una mayor actividad. El western blot anti HDAC8 y a su vez anti pSer39, muestra, diferencias en lo que a fosforilación respecta tras el ensayo con PKA (inhibidor directo de HDAC8 por fosforilación). En el revelado, se aprecia bien ambas colocalizan, y que, en todos los mutantes existe fosforilación, esto es debido a que el experimento se realizó con extracto celular sin purificar y en él, se encuentra la HDAC8 endógena, al tratarse de células humanas. Al normalizar por cantidad a partir de la tubulina y asumiendo que la HDAC8 endógena actúa por igual en los ensayos de actividad sea cual sea el mutante, los resultados son comparables, pero quizás, trabajando con proteínas purificadas en vez de partir de extracto, hubiésemos podido ver el efecto más claro.

6. Conclusiones

6.1. Método Experimental de Diseño de Moléculas “PP-glue”.

Con este estudio queremos presentar las interacciones proteína-proteína como una manera de expandir el “genoma druggable” anteriormente explicado, mediante el estudio y caracterización de un complejo bien conocido como CheA/CheY.

De los resultados del apartado anterior se derivan las siguientes conclusiones:

- La Kd del sistema CheA/CheY determinada por métodos biofísicos, es del orden de la que encontramos en la bibliografía.
- Las Kds determinadas por Biacore y Termoforesis están en consonancia entre ellas, lo cuál le da robustez al sistema y a los métodos elegidos para estudiarlo.
- A pesar de no ser lo que estábamos buscando en un principio, también encontramos que los compuestos #2 y #5 tienen características de inhibidores. Estos compuestos, a nivel estructural son también muy útiles e interesantes. Según el paper de Susanne Wisén et.al. llamado “Binding of a Small Molecule at a Protein-Protein Interface Regulates the Chaperone Activity of Hsp70-Hsp40”.
- Estos compuestos estarían cerca de ser potentes activadores, con un pequeño cambio, ya que su capacidad de inhibidores, nos indica que están actuando allí donde queremos, y con un pequeño cambio de la estructura podemos revertirlos, de inhibidores a activadores.
- Los dos compuestos que aparecen como activadores tras las pruebas, son el compuesto #30 y el #96. Estos vemos que aumentan la afinidad del complejo 6 y 3 veces respectivamente, según datos obtenidos de Biacore y Termoforesis. Estos resultados hay que matizarlos:

- Vemos que con el #30 aumenta la afinidad sobre 6 veces, tanto por Biacore como por Termoforesis, 6 veces. A concentración μM , pero esta afinidad aumenta, si aumentamos la concentración de #30.
- En lo que al compuesto #96 respecta, vemos que tanto en Biacore como en Termoforesis, vemos que aumenta la afinidad del complejo unas 3 veces, igual en ambos métodos, si bien, la concentración de #96 a la que podemos trabajar es inferior a la de #30, debido a que es bastante menos soluble que el #30 y si aumentamos la concentración, tenemos problemas en el método, tanto en Biacore como en Termoforesis.
- Los ensayos de motilidad, muestran diferencias significativas en lo que al halo de crecimiento respecta.
- Si a esto le sumamos que los ensayos de viabilidad no presentan diferencias significativas, podemos extraer que las diferencias en el diámetro del halo generado se deben posiblemente a un menor nivel de CheY fosforilada, lo que, dependiendo de la concentración y potencia del compuesto, así como del estado de la bacteria puede resultar tanto en un aumento como en una disminución de la motilidad. El halo que se aprecia en el agar motil es suma del crecimiento y división bacteriana y de la motilidad de las células de la capa exterior del halo. Si bien, hemos visto que la presencia del complejo no se traduce en diferencias significativas en lo que al crecimiento respecta, las diferencias entendemos que son debidas a la motilidad diferencial promovida por acción de los compuestos. También es señal de que aumenta la cantidad de CheY sin fosforilar, y esto propicia el movimiento lineal de la bacteria, disminuyendo el “tumbling”. En agar motil, este comportamiento resulta en menor desplazamiento neto.
- En el Western Blot anti CheA, intuimos que la banda superior de CheA, CheA(L), en presencia de los compuestos, parece que se diluye y a cambio aparece una banda de mayor tamaño, que podría corresponder a la fracción fosforilada. Esta banda de nueva formación, reconocida por el anti cuerpo anti-CheA y de mayor tamaño, cuadra con nuestro modelo y con lo observado en el ensayo de actividad: en el momento en el que CheY y CheA interactúan, cuando CheA fosforila a CheY, si aumentamos esta afinidad, eso se traduce en una menor cantidad de CheY fosforilada (que está pendiente de determinar mediante Western blot) pero sí es cierto que hay una mayor cantidad de CheA fosforilada, puesto que no acaba de ceder el fosfato a CheY.

- Respecto a las pruebas de cristalización, se han obtenido cristales del complejo CheY/CheYBSCheA, sin embargo, posteriores pruebas de co-cristalización y soaking de momento han fallado, el cristal resultante no era homogéneo y o bien no ha difractado, o bien, no se han podido recoger buenos datos de la difracción del cristal. Esto puede ser debido a dos causas diferentes:
 - Los compuestos podrían inducir en cierta manera un cambio conformacional en el cristal
 - bien, un compendio de factores entre la baja afinidad de los compuestos por el complejo, y la baja solubilidad de los compuestos por sí mismos, hacen que sólo una parte de los complejos contenidos en el cristal contienen el ligando, lo que convierte al cristal heterogéneo y hace que no se pueda resolver bien la estructura.
- En lo que al ensayo de fosforilación *in vitro* respecta, vemos una tendencia a disminuir la concentración de ADP libre, a medida que aumentamos la concentración de compuestos, y esto cuadra con una mayor cantidad de CheA fosforilada, pero una menor cantidad de CheY fosforilada, lo que concuerda con nuestro modelo de unión que dice que si aumentamos la afinidad del complejo, no se podrá completar la fosforilación de CheY mediante CheA.

6.2. Estudio de la Función Regulativa por Alosterismo en HDAC8.

A diferencia de estudios previos, los cuáles están más concentrados en explorar la cavidad entorno al centro catalítico, nosotros pretendemos entender el mecanismo molecular envuelto en la regulación de su actividad mediante fosforilación en la Ser39. Las siguientes conclusiones, se extraen del apartado previo de resultados:

- La fosforilación de HDAC8 tiene numerosas consecuencias estructurales, tanto en el backbone, como en las cadenas laterales, incluyendo dominios como el K-F loop.
- El Alosterismo en HDAC8 implica diferentes vías de señalización y no sólo puede ser atribuído a una serie de eventos secuenciales.
- El K-F loop muestra una preferencia por la conformación cerrada observada en la estructura cristal cuando la proteína está fosforilada, pero tiene una marcada tendencia para abrirse en la forma no-fosforilada.
- La abertura del loop deja expuestos residuos aromáticos, los F207 y F208 de cara al solvente. En vista de estos, postulamos que la abertura del loop K-F es necesaria para el reclutamiento del sustrato
- La abertura del loop está controlada por un interruptor conformacional que envuelve a F207 y la tríada iónica: K202, D233 y R353. De manera que postulamos que estos tres residuos, actúan de manera cooperativa y en ausencia de alguno de ellos, como hemos visto tras los mutantes, la red de puentes de hidrógeno se rompe, y resulta en una repulsión de las interacciones entre el grupo cargado K202 y el fenil F207, lo que causa la abertura del loop.
- Las mutaciones puntuales fueron designadas para probar el mecanismo de acción del alosterismo postulado, y la actividad enzimática de las proteínas actúa en consonancia con las esperadas:
 - La mutación K202M se opone a la interacción repulsiva con F207, atrapando la proteína con su forma inactiva, en la que el loop está cerrado.
 - La mutación F207A hace que la conformación cerrada sea inestable. Aunque el residuo está localizado cerca del sitio de unión conservado en las HDACs de Clase

I, el mutante permanece activo y se vuelve menos sensible a la regulación por PKA.

- La mutación D233A promueve la abertura del loop y aumenta la actividad enzimática en un 20% aproximadamente.
- La mutación R353A, el único miembro no-conservado de la tríada iónica, también promueve la abertura del loop y aumenta la actividad enzimática en un 40% aproximadamente.
- Con la excepción parcial del mutante D233A, todos los mutantes siguen siendo regulados negativamente por fosforilación, indicando así que la abertura del K-F loop es sólo uno de los mecanismos de inactivación que tienen lugar en HDAC8.
- Según el estudio computacional previo que se llevó a cabo por otros miembros del grupo, las simulaciones de dinámica molecular y el análisis de divergencia KL, apuntan a otros mecanismos complementarios de regulación en HDAC8 tales como:
 - Que el bloqueo de la cavidad interna está involucrado en la liberación del acetato del producto de la reacción.
 - La reagrupación de los dominios III y IV puede conducir a la alteración en el sustrato o con las interacciones proteína-proteína.
 - El incremento de la rigidez del dominio II con la fosforilación, previene el reconocimiento del sustrato.
- Los puntos de vista estructurales proporcionados por este estudio podrían ayudar en el diseño de inhibidores específicos de subtipos, aunque hasta la fecha, no está disponible.

7. Bibliografía

1. Munos, B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 959–68 (2009).
2. Stelzl, U. *et al.* A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* **122**, 957–68 (2005).
3. Mohan, C. & Diego, S. New Tools and Techniques for Proteomics Research Proteome. *Proteome*
4. Overington, J. P., Al-lazikani, B. & Hopkins, A. L. How many drug targets are there? *Discovery* **5**, 993–996 (2006).
5. Rask-Andersen, M., Masuram, S. & Schiöth, H. B. The druggable genome: Evaluation of drug targets in clinical trials suggests major shifts in molecular class and indication. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **54**, 9–26 (2014).
6. Molecular Drug Targets.
7. Imming, P., Sinning, C. & Meyer, A. and number of drug targets. *Nature* **5**, 821–835 (2007).
8. Rask-Andersen, M., Almén, M. S. & Schiöth, H. B. Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 579–90 (2011).
9. Hopkins, A. L. & Groom, C. R. The druggable genome. *Discovery* **1**, 7–10 (2002).
10. Brown, D. & Superti-Furga, G. Rediscovering the sweet spot in drug discovery. *Drug Discov. Today* **8**, 1067–1077 (2003).
11. Kola, I. & Landis, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 711–715 (2004).
12. Macarron, R. Critical review of the role of HTS in drug discovery. *Drug Discov. Today* **11**, 277–279 (2006).
13. Russ, A. P. & Lampel, S. The druggable genome: An update. *Drug Discov. Today* **10**, 1607–1610 (2005).

14. Seco, J., Luque, F. J. & Barril, X. Binding site detection and druggability index from first principles. *J. Med. Chem.* **52**, 2363–71 (2009).
15. Schmidtke, P. & Barril, X. Understanding and predicting druggability. A high-throughput method for detection of drug binding sites. *J. Med. Chem.* **53**, 5858–67 (2010).
16. Barril, X. in *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* **3**, 327–338 (2013).
17. Keller, T. H., Pichota, A. & Yin, Z. A practical view of “druggability”. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 357–61 (2006).
18. Swinney, D. C. & Anthony, J. How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 507–19 (2011).
19. Eder, J., Sedrani, R. & Wiesmann, C. origins and evolution. *Nat. Publ. Gr.* **13**, 577–587 (2014).
20. Jin, L., Wang, W. & Fang, G. Targeting protein-protein interaction by small molecules. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **54**, 435–56 (2014).
21. Thiel, P., Kaiser, M. & Ottmann, C. Small-molecule stabilization of protein-protein interactions: an underestimated concept in drug discovery? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 2012–8 (2012).
22. Pommier, Y. & Marchand, C. Interfacial inhibitors: targeting macromolecular complexes. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 25–36 (2012).
23. Sharma, S., Verma, A., Teja, B. V., Shukla, P. & Mishra, P. R. European Journal of Pharmaceutical Sciences Development of stabilized Paclitaxel nanocrystals: In-vitro and in-vivo efficacy studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2015). doi:10.1016/j.ejps.2014.11.012
24. Sloboda, R. D. Isolation of microtubules and microtubule-associated proteins using Paclitaxel. *Cold Spring Harb. Protoc.* **January**, (2015).
25. Zhulin, G. and I. Poster Sessions Á Abstract P259 Switch to raltegravir-based regimens and HIV DNA decrease in patients with suppressed HIV RNA. **17**, 19791 (2014).
26. Wang, W., Liu, Y. & Lazarus, R. a. Allosteric inhibition of BACE1 by an exosite-binding antibody. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 797–805 (2013).
27. Watkins, A. M. & Arora, P. S. Structure-based inhibition of protein-protein interactions. *Eur. J. Med. Chem.* 1–9 (2014). doi:10.1016/j.ejmech.2014.09.047

28. Mossesso, E., Corpina, R. a. & Goldberg, J. Crystal Structure of ARF1???Sec7 Complexed with Brefeldin A and Its Implications for the Guanine Nucleotide Exchange Mechanism. *Mol. Cell* **12**, 1403–1411 (2003).
29. Renault, L., Guibert, B. & Cherfils, J. Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* **426**, 525–530 (2003).
30. Rajagopala, S. V *et al.* The protein network of bacterial motility. *Mol. Syst. Biol.* **3**, 128 (2007).
31. Kumar, M. & Balaji, P. V. C-H...pi interactions in proteins: prevalence, pattern of occurrence, residue propensities, location, and contribution to protein stability. *J. Mol. Model.* **20**, 2136 (2014).
32. Leeuwen, I. J. D. V. *et al.* Interaction of 14-3-3 proteins with the Estrogen Receptor Alpha F domain provides a drug target interface. *PNAS* **110**, 8894–8899 (2013).
33. Thakor, H., Nicholas, S., Porter, I. M., Hand, N. & Stewart, R. C. Identification of an Anchor Residue for CheA-CheY Interactions in the Chemotaxis System of Escherichia coli . *J. Bacteriol.* **193**, 3894–3903 (2011).
34. Schmidtke, P., Bidon-chanal, A., Luque, F. J. & Barril, X. MDpocket: open-source cavity detection and characterization on molecular dynamics trajectories. *Bioinformatics* **27**, 3276–3285 (2011).
35. Bilwes, A. M., Alex, L. A., Crane, B. R. & Simon, M. I. Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. *Cell* **96**, 131–141 (1999).
36. Stewart, R. C. & Van Bruggen, R. Association and Dissociation Kinetics for CheY Interacting with the P2 Domain of CheA. *J. Mol. Biol.* **336**, 287–301 (2004).
37. Conley, M. P., Wolfe, A. J., Blair, D. F. & Berg, H. C. Both CheA and CheW Are Required for Reconstitution of Chemotactic Signaling in Escherichia coli. *Microbiology* **171**, 5190–5193 (1989).
38. Alvarez-garcia, D. & Barril, X. Molecular Simulations with Solvent Competition Quantify Water Displaceability and Provide Accurate Interaction Maps of Protein Binding Sites. *J. Med. Chem.* **57**, 8530–8539 (2014).

39. Roman, S. J., Meyers, M., Volz, K., Matsumura, P. & Al, R. E. T. A Chemotactic Signaling Surface on CheY Defined by Suppressors of Flagellar Switch Mutations. *Microbiology* **174**, 6247–6255 (1992).
40. Communication, S. Chemotaxis as a Factor in Interactions between HeLa Cells and Salmonella typhimurircm. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 415–418 (1982).
41. Homma, M., Shiomi, D., Homma, M. & Kawagishi, I. Attractant binding alters arrangement of chemoreceptor dimers within its cluster at a cell pole. *PNAS* **2003**, 3462–3457 (2004).
42. Lowry, D. F. *et al.* Signal Transduction in Chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **269**, 26358–26362 (1994).
43. Boyd, a & Simon, M. Bacterial chemotaxis. *Annu. Rev. Physiol.* **44**, 501–517 (1982).
44. Adler, J. My life with nature. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 42–70 (2011).
45. Porter, S. L., Wadhams, G. H. & Armitage, J. P. Signal processing in complex chemotaxis pathways. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 153–165 (2011).
46. Armstrong, J. B. & Adler, J. Genetics of motility in Escherichia coli: complementation of paralysed mutants. *Genetics* **56**, 363–373 (1967).
47. Liu, Z. W. & Papadopoulos, K. D. Unidirectional Motility of Escherichia-Coli in Restrictive Capillaries. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3567–3572 (1995).
48. Adler, J. Chemotaxis in bacteria. *J. Supramol. Struct.* **4**, 305–317 (1976).
49. Parkinson, J. S. cheA , cheB , and cheC Genes of Escherichia coli and Their Role in Chemotaxis. *Journal* **126**, 758–770 (1976).
50. Britain, G., Adler, J. & Templeton, B. The Effect of Environmental Conditions on the Motility of Escherichia coli. *J. Gen. Microbiol.* **46**, 175–184 (1967).
51. Kirby, J. R., Saulmon, M. M., Kristich, C. J. & Ordal, G. W. CheY-dependent Methylation of the Asparagine Receptor , McpB , during Chemotaxis in Bacillus subtilis *. *Biochemistry* **274**, 11092–11100 (1999).
52. Bi, S. & Lai, L. Bacterial chemoreceptors and chemoeffectors. *Cell. Mol. Life Sci.* (2014). doi:10.1007/s00018-014-1770-5
53. Chea-short, C. P. *et al.* CheZ Phosphatase Localizes to CheZ Phosphatase Localizes to Chemoreceptor Patches. *J. Bacteriol.* **185**, 2354–2361 (2003).

54. Wang, H. & Matsumura, P. Characterization of the CheA S / CheZ complex : a specific interaction resulting in enhanced dephosphorylating activity on CheY-phosphate. *Mol. Microbiol.* **19**, 695–703 (1996).
55. Sanders, D. A., Gillette-castrog, B. L., Stock, A. M., Burlingameg, A. L. & Koshland, D. E. Identification of the Site of Phosphorylation of the Chemotaxis Response Regulator Protein, CheY*. **264**, 21770–21778 (1989).
56. Barak, R. & Eisenbach, M. Co-regulation of acetylation and phosphorylation of CheY, a response regulator in chemotaxis of Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* **342**, 375–81 (2004).
57. Protein, B., Stewart, R. C. & Vanbruggen, R. Phosphorylation and Binding Interactions of CheY Studied by Use of. *Biochemistry* **43**, 8766–8777 (2004).
58. Bourret, R. B., Hess, J. F. & Simon, M. Conserved aspartate residues and phosphorylation in signal transduction by the chemotaxis protein CheY. *Reactions* **87**, 41–45 (1990).
59. Morrison, T. O. M. B. & Parkinson, J. S. Liberation of an interaction domain from the phosphotransfer region of CheA , a signaling kinase of Escherichia coli. *Biochemistry* **91**, 5485–5489 (1994).
60. Zhu, X., Rebello, J., Matsumura, P. & Volz, K. Crystal Structures of CheY Mutants Y106W and T871 / Y106W. *Biochemistry* **272**, 5000–5006 (1997).
61. Falke, J. J., Piasta, K. N. & Plate, K. B. ScienceDirect Architecture and signal transduction mechanism of the bacterial chemosensory array : Progress , controversies , and challenges Adaptor. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **29**, 85–94 (2014).
62. Mariconda, S., Wang, Q. & Harshey, R. M. A mechanical role for the chemotaxis system in swarming motility. *Mol. Microbiol.* **60**, 1590–1602 (2006).
63. Kojima, M., Kubo, R., Yakushi, T., Homma, M. & Kawagishi, I. The bidirectional polar and unidirectional lateral flagellar motors of Vibrio alginolyticus are controlled by a single CheY species. *Mol. Microbiol.* **64**, 57–67 (2007).
64. Morrison, T. O. M. B. & Parkinson, J. S. A Fragment Liberated from the Escherichia coli CheA Kinase That Blocks Stimulatory , but Not Inhibitory , Chemoreceptor Signaling. *Microbiology* **179**, 5543–5550 (1997).

65. Gregory, K. J., Sexton, P. M. & Christopoulos, A. Overview of receptor allostery. *Current Protocols in Pharmacology* (2010). doi:10.1002/0471141755.ph0121s51
66. Ehlert, F. J. Analysis of allostery in functional assays. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315**, 740–754 (2005).
67. Birdsall, N. J. M. & Lazareno, S. Allostery at muscarinic receptors: ligands and mechanisms. *Mini Rev. Med. Chem.* **5**, 523–543 (2005).
68. Schwartz, T. W. & Holst, B. Allosteric enhancers, allosteric agonists and ago-allosteric modulators: where do they bind and how do they act? *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 366–373 (2007).
69. Geitmann, M. *et al.* Identification of a novel scaffold for allosteric inhibition of wild type and drug resistant HIV-1 reverse transcriptase by fragment library screening. *J. Med. Chem.* **54**, 699–708 (2011).
70. Heinrich, T., Grädler, U., Böttcher, H., Blaukat, A. & Shutes, A. Allosteric IGF-1R inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **1**, 199–203 (2010).
71. Lindsley, C. W. *et al.* Allosteric Akt (PKB) inhibitors: Discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **15**, 761–764 (2005).
72. Simard, J. R. *et al.* A new screening assay for allosteric inhibitors of cSrc. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 394–396 (2009).
73. García-Echeverría, C. Allosteric and ATP-competitive kinase inhibitors of mTOR for cancer treatment. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **20**, 4308–4312 (2010).
74. Nickols, H. H. & Conn, J. P. Development of allosteric modulators of GPCRs for treatment of CNS disorders. *Neurobiology of Disease* **61**, 55–71 (2014).
75. Yang, X.-J. & Seto, E. Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 143–153 (2003).
76. Tordera, V., Sendra, R. & Pérez-Ortín, J. E. The role of histones and their modifications in the informative content of chromatin. *Experientia* **49**, 780–788 (1993).
77. Murko, C. *et al.* Expression of class I histone deacetylases during chick and mouse development. *Int. J. Dev. Biol.* **54**, 1527–37 (2010).
78. Balasubramanian, S. *et al.* A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas. *Leukemia* **22**, 1026–34 (2008).
79. Buggy, J. J. *et al.* Cloning and characterization of a novel human histone deacetylase, HDAC8. *DNA Seq.* **350**, 199–205 (2000).

80. Ni, X., Li, L. I. & Pan, G. HDAC inhibitor-induced drug resistance involving ATP-binding cassette transporters (Review). 515–521 (2015). doi:10.3892/ol.2014.2714
81. Carrupt, P., Deschamps, N., Simo, C. A. & Nurisso, A. How the flexibility of human histone deacetylases influences ligand binding : an overview. *Rev. Informatics* **00**, 1–7 (2015).
82. Chakrabarty, S. *et al.* Inhibitors of human histone deacetylase: synthesis and enzyme assay of hydroxamates with piperazine linker. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **343**, 167–72 (2010).
83. Vannini, A. *et al.* Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase , human HDAC8 , complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *PNAS* **101**, 15064–15069 (2004).
84. Wyngaert, I. Van Den *et al.* Cloning and characterization of human histone deacetylase 8. *Structure* **478**, 77–83 (2000).
85. Khan, F., He, M. & Taussig, M. J. Double-Hexahistidine Tag with High-Affinity Binding for Protein Immobilization , Purification , and Detection on Ni-Nitrilotriacetic Acid Surfaces. *Anal. Chem.* 7810–7811 (2005).
86. Hefti, M. H., Van Vugt-Van der Toorn, C. J., Dixon, R. & Vervoort, J. A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Anal. Biochem.* **295**, 180–5 (2001).
87. Fivash, M., Towler, E. M. & Fisher, R. J. BIAcore for macromolecular interaction. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 97–101 (1998).
88. Handbook, C. A. Biacore. *Analysis*
89. Rich, R. L. & Myszka, D. G. BIACORE J: A new platform for routine biomolecular interaction analysis. *J. Mol. Recognit.* **14**, 223–228 (2001).
90. Nieba, L. *et al.* BIACORE Analysis of Histidine-Tagged Proteins Using a Chelating NTA Sensor Chip. **228**, 217–228 (1997).
91. Gopinath, S. C. B. & Kumar, P. K. R. Biomolecular discrimination analyses by surface plasmon resonance. *R. Soc. Chem.* **139**, 2678–82 (2014).
92. Healthcare, G. E. & Sciences, L. Biacore™ Assay Handbook. *Small*

93. Niesen, F. H., Berglund, H. & Vedadi, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Most* **2**, 2212–2221 (2007).
94. Layton, C. J. & Hellinga, H. W. Quantitation of protein-protein interactions by thermal stability shift analysis. *Protein Sci.* **20**, 1439–50 (2011).
95. Krishna, S. N. *et al.* A fluorescence-based thermal shift assay identifies inhibitors of mitogen activated protein kinase kinase 4. *PLoS One* **8**, e81504 (2013).
96. Afanador, G. A. *et al.* NIH Public Access. *Biochemistry* **52**, 9155–9166 (2014).
97. Soon, F.-F. *et al.* Abscisic acid signaling: thermal stability shift assays as tool to analyze hormone perception and signal transduction. *PLoS One* **7**, e47857 (2012).
98. Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **44**, 98–104 (1958).
99. Schellman, J. A. & Schellman, C. G. Kaj Ulrik Linderstrfml-Lang (1 896- 1959). *Protein* 1092–1100 (1997).
100. Smyth, M. S. & Martin, J. H. J. Review x Ray crystallography. *Mol Pathol* **53**, 8–14 (2000).
101. Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z. & Jaskolski, M. Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS J.* **275**, 1–21 (2008).
102. Hassell, A. M. *et al.* Crystallization of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **63**, 72–9 (2007).
103. Drenth, J. *Principles of Protein X-ray Crystallography. Biophysical Chemistry* 1–19 (1994). doi:10.1038/256705a0
104. Le Maire, A. *et al.* In-plate protein crystallization, in situ ligand soaking and X-ray diffraction. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 747–755 (2011).
105. Nikaido, H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**, 5853–5859 (1996).
106. Pos, K. M. Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochim. Biophys. Acta* **1794**, 782–793 (2009).
107. Masi, M. & Pagès, J.-M. Structure, Function and Regulation of Outer Membrane Proteins Involved in Drug Transport in Enterobacteriaceae: the OmpF/C - TolC Case. *Open Microbiol. J.* **7**, 22–33 (2013).
108. Vakharia, H., German, G. J. & Misra, R. Isolation and Characterization of Escherichia coli tolC Mutants Defective in Secreting Enzymatically Active Isolation and Characterization

- of *Escherichia coli* tolC Mutants Defective in Secreting Enzymatically Active Alpha-Hemolysin. *J. Bacteriol.* **183**, 6908–6916 (2001).
109. Soft Agar Assay for Colony Formation Protocol Soft Agar Assay for Colony Formation Protocol. *Media* 10–12
110. Wolfe, A. J. & Berg, H. C. Migration of bacteria in semisolid agar. *Biophysics (Oxf)*. **86**, 6973–6977 (1989).
111. Lewus, P. & Ford, R. M. Quantification of random motility and chemotaxis bacterial transport coefficients using individual-cell and population-scale assays. *Biotechnol. Bioeng.* **75**, 292–304 (2001).
112. Weis, R. M. & Koshland, D. E. Chemotaxis in *Escherichia coli* proceeds efficiently from different initial tumble frequencies. *J. Bacteriol.* **172**, 1099–1105 (1990).
113. Deepika, D. & Karmakar, R. Variation in swimming speed of *Escherichia coli* in response to attractant. (2014). doi:10.1007/s00203-014-1044-5
114. Adler, J. A Method for Measuring Chemotaxis and Use of the Method to Determine Optimum Conditions for Chemotaxis by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **74**, 77–91 (1972).
115. Zhulin, G. and I. A Rapid Method for the Measurement of Bacterial Chemotaxis. *Curr. Microbiol.* **22**, 307–309 (1991).
116. Kinoshita-kikuta, E., Yamada, A., Inoue, C., Kinoshita, E. & Koike, T. A novel phosphate-affinity bead with immobilized Phos-tag for separation and enrichment of phosphopeptides and phosphoproteins. *Life Sci.* **1**, 81–82 (2011).
117. Kinoshita, E., Kinoshita-kikuta, E. & Koike, T. Biochimica et Biophysica Acta Advances in Phos-tag-based methodologies for separation and detection of the phosphoproteome ☆. *BBA - Proteins Proteomics* (2014). doi:10.1016/j.bbapap.2014.10.004
118. Kinoshita-kikuta, E., Kinoshita, E., Matsuda, A. & Koike, T. Tips on improving the efficiency of electrotransfer of target proteins from Phos-tag SDS-PAGE gel. *Proteomics* **14**, 2437–2442 (2014).
119. Barbieri, C. M. & Stock, A. M. Universally applicable methods for monitoring response regulator aspartate phosphorylation both in vitro and in vivo using Phos-tag-based reagents. *Anal. Biochem.* **376**, 73–82 (2008).

120. Brzovic, P. S., Lissounov, A., Christensen, D. E., Hoyt, D. W. & Klevit, R. E. A Ubch5/ubiquitin noncovalent complex is required for processive BRCA1-directed ubiquitination. *Mol. Cell* **21**, 873–80 (2006).
121. Aguilar, H. N., Zielnik, B., Tracey, C. N. & Mitchell, B. F. Quantification of Rapid Myosin Regulatory Light Chain Phosphorylation Using High-Throughput In-Cell Western Assays : Comparison to Western Immunoblots. *Signals* **5**, (2010).
122. Zeenko, V. V *et al.* An efficient in vitro translation system from mammalian cells lacking the translational inhibition caused by eIF2 phosphorylation. *RNA* **14**, 593–602 (2008).
123. Kingston, R. E., Chen, C. A. & Okayama, H. Calcium phosphate transfection. *Curr. Protoc. Immunol.* **Chapter 10**, Unit 10.13 (2001).
124. Jordan, M. & Wurm, F. Transfection of adherent and suspended cells by calcium phosphate. *Methods* **33**, 136–143 (2004).
125. Schutz-geschwender, A. *et al.* Quantitative , Two-Color Western Blot Detection With Infrared Fluorescence. *Odyssey* **800**, 1–8 (2004).
126. Flaherty, D. P. *et al.* Potent and selective inhibitors of the TASK-1 potassium channel through chemical optimization of a bis-amide scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 3968–73 (2014).
127. Jakobi, S. *et al.* Hot-spot analysis to dissect the functional protein-protein interface of a tRNA-modifying enzyme. *Proteins* **82**, 2713–32 (2014).
128. Ruiz-Carmona, S. *et al.* rDock: a fast, versatile and open source program for docking ligands to proteins and nucleic acids. *PLoS Comput. Biol.* **10**, (2014).
129. Vakser, I. A. Protein-Protein Docking: From Interaction to Interactome. *Biophys. J.* **107**, 1785–1793 (2014).
130. Christopheit, T. *et al.* A surface plasmon resonance-based biosensor with full-length BACE1 in a reconstituted membrane. *Anal. Biochem.* **414**, 14–22 (2011).
131. Wise, S., Bertelsen, E. B., Thompson, A. D., Patury, S. & Ung, P. A RTICLE. *ACS Chem. Biol.* **5**, 611–622 (2010).
132. Roman, S. J., Meyers, M., Volz, K. & Matsumura, P. A Chemotactic Signaling Surface on CheY Defined by Suppressors of Flagellar Switch Mutations. *Microbiology* **174**, 6247–6255 (1992).
133. Cluzel, P., Surette, M. & Leibler, S. An ultrasensitive bacterial motor revealed by monitoring signaling proteins in single cells. *Science* **287**, 1652–1655 (2000).

134. Sourjik, V. & Berg, H. C. Receptor sensitivity in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 123–127 (2002).
135. Vladimirov, N., Lebedez, D. & Sourjik, V. Predicted auxiliary navigation mechanism of peritrichously flagellated chemotactic bacteria. *PLoS Comput. Biol.* **6**, (2010).
136. Sourjik, V. & Berg, H. C. Localization of components of the chemotaxis machinery of *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions. *Mol. Microbiol.* **37**, 740–751 (2000).
137. Bren, A. & Eisenbach, M. MINIREVIEW How Signals Are Heard during Bacterial Chemotaxis: Protein-Protein Interactions in Sensory Signal Propagation. *J. Bacteriol.* **182**, 6865–6873 (2000).
138. Ünal, C. M. & Steinert, M. FKBP in bacterial infections. *Biochim. Biophys. Acta* (2014). doi:10.1016/j.bbagen.2014.12.018
139. Mukhopadhyay, J. *et al.* HHMI Author Manuscript THE RNA POLYMERASE “ SWITCH REGION ” IS A TARGET FOR INHIBITORS. **135**, 295–307 (2008).