



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Búsqueda de fragmentos que interaccionen con la subunidad proteica de la RNasa P bacteriana como potenciales fármacos

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ezequiel Alejandro Madrigal Carrillo

Tutor Principal
Dr. Alfredo Torres Larios
[Instituto de Fisiología Celular](#)

[Miembros del comité tutor](#)
Dr. Enrique Rudiño Piñera
[Instituto de Biotecnología \(UNAM\)](#)

Dr. Abel Moreno Cárcamo
[Instituto de Química \(UNAM\)](#)

MÉXICO, D. F. Abril, 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres y Andrea

A mi amada Paty

“Si las resistencias en el camino de la perfección dependen de otros, conviene hacer de ellas caso omiso, como si no existiesen, y redoblar el esfuerzo enaltecedor. Ningún contratiempo material desvía al idealista. Si deseara influir de inmediato sobre cosas que de él no dependen, encontraría obstáculos en todas partes; contra esa hostilidad de su ambiente sólo puede rebelarse con la imaginación, mirando cada vez más hacia su interior. El que sirve a un ideal, vive de él; nadie le forzará a soñar lo que no quiere ni le impedirá ascender hacia su sueño”

José Ingenieros –*El hombre mediocre*

“No hay nadie menos afortunado que el hombre a quien la adversidad olvida, pues no tiene oportunidad de ponerse a prueba”

Séneca – *De la brevedad de la vida*

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi padre Ezequiel Madrigal y a mi madre Rosario Carrillo, por su apoyo incondicional durante mis estudios de toda mi vida y maestría, sin la beca Madrigal Carrillo (el apoyo económico más importante y prestigioso que he obtenido) no hubiera estado donde ahora estoy.

En especial me encuentro bastante agradecido con mi tutor principal, el Dr. Alfredo Torres Larios por haberme otorgado la oportunidad tan preciosa de trabajar en este emocionante proyecto.

Agradezco por su dedicación y su tiempo al comité tutor de los estudios de mi maestría. En particular al Dr. Enrique Rudiño del Instituto de Biotecnología de la UNAM y al Dr. Abel Moreno Cárcamo del Instituto de Química de la UNAM.

Y por supuesto, un saludo a los Rikis!! A Walter, Héctor, Alan, Yeya, Ivan, Pau y Andy. Mis amigos de toda la vida, siempre juntos a pesar de todo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Adelaida Díaz Vilchis quien me auxilió mucho en el afinamiento de la estructura de la proteína P, así como en el proceso de purificación y cristalización de la misma. Además, la Dra. Díaz me apoyó bastante en la preparación y en la metodología de experimentos variados que he necesitado a lo largo de mis estudios.

Al Dr. Miguel Costas Basín de la Facultad de Química de la UNAM por ayudarnos al llevar a cabo los experimentos por microcalorimetría diferencial de barrido.

Al Dr. Claude Sauter del CNRS, Universidad de Strasbourg, Francia por haberme enseñado a cristalizar en capilar con geles de agarosa.

Al Dr. Miguel Esparza por haberme enseñado mis primeros experimentos de cristalización de proteínas.

Al Dr. Felix Recillas y al biólogo Christian Valdés por su gran ayuda con el PCR tiempo real para llevar a cabo los ensayos de desplazamiento térmico.

Un especial agradecimiento a la Dra. Adela Rodríguez Romero por ayudarnos a difractar muestras de proteína P en el difractor del laboratorio nacional de estructuras de macromoléculas (LANEM) del Instituto de Química de la UNAM así como a la M. en C. Georgina Espinosa.

Nunca olvidaré la gran ayuda del Dr. Chi-Hao Luan, jefe del *High Throughput Analysis Laboratory* de la Northwestern University, Chicago, Ill. USA, quien nos ayudó en el escrutinio de alta eficiencia robotizado de bibliotecas de compuestos contra la proteína P.

Quiero agradecer además al Argonne National Laboratory, en Argonne, Illinois por permitirnos hacer uso de las instalaciones del sincrotrón APS LS-CAT, donde llevamos a cabo los experimentos de difracción de rayos X de cristales de la proteína P.

Por último, agradezco particularmente al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT), gracias al cual gocé de beca de manutención durante mis estudios dentro del Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) “Estudios estructurales sobre Ribonucleasa P”. Proyecto 164838.2012-2015.

Programa de Apoyo Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológico (PAPIIT). IN201213 “Estudios estructurales sobre Ribonucleasa P”.

“Toda nuestra Ciencia, comparada con la realidad, es primitiva e infantil, y sin embargo, es lo máspreciado que tenemos”

Albert Einstein

“Más vale encender una vela que maldecir la oscuridad”

Dicho popular

Índice de Figuras

Figura 1. Procesamiento del precursor del ARN de transferencia por la RNasa P bacteriana.....	12
Figura 2. Estructura tridimensional del complejo ternario de la RNasa P bacteriana.....	13
Figura 3. Estructura secundaria de la subunidad proteica de la RNasa P bacteriana de <i>T. maritima</i>	13
Figura 4. Motivo RNR.....	14
Figura 5. Posición del extremo 5' líder y sulfatos cocristalizados en la proteína P.....	14
Figura 6. Regiones de interacción con el extremo 5' líder y la subunidad de ARN.....	15
Figura 7. Diagrama de Venn.....	15
Figura 8. Diseño de fármacos basado en fragmentos.....	17
Figura 9. Número de casos estimados de tuberculosis multiresistente a antibióticos (MDR-TB) a nivel mundial.....	18
Figura 10. Vector de expresión pGEX-4Ta.....	20
Figura 11. Esquema general de la metodología utilizada para la búsqueda de fragmentos por cristalografía.....	25
Figura 12. Experimentos de inducción analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%.....	26
Figura 13. Cromatografía de intercambio catiónico en condiciones desnaturizantes.....	27
Figura 14. Intercambio de amortiguador por exclusión de tamaño molecular.....	28
Figura 15. Cromatografía de intercambio catiónico en condiciones no desnaturizantes.....	29
Figura 16. Perfil de absorbancia de la proteína purificada.....	29
Figura 17. Evaluación de la pureza de proteína mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante al 18%.....	30
Figura 18. Microcalorimetría diferencial de barrido de la proteína P.....	31
Figura 19. Ensayo de desplazamiento térmico de la proteína P en ausencia del osmolito estabilizador TMAO.....	32
Figura 20. Control positivo para ensayos de desplazamiento térmico.....	33
Figura 21. Curva de desnaturalización de la proteína P en presencia de 3.5 M de TMAO.....	33
Figura 22. Cristal de la subunidad proteica de la RNasa P de <i>T. maritima</i>	34
Figura 23. Patrón de difracción de la subunidad proteica de la RNasa P de <i>T. maritima</i>	35
Figura 24. Mapa de densidad electrónica de omisión de la proteína P.....	37
Figura 25. Etapas del escrutinio para la búsqueda de fragmentos con la biblioteca Zenobia™.....	38
Figura 26. Hit encontrado mediante análisis del mapa de diferencia isomorfo.....	39
Figura 27. Estructura química del fragmento 5-Cloro-2-Mercaptobenzoxazol (CMBX).....	40
Figura 28. Estructura nativa afinada con el fragmento CMBX.....	40
Figura 29. Sobreposición del fragmento CMBX en la estructura derivada afinada sin fragmento.....	41
Figura 30. Estructura cristalográfica de la proteína P con fragmento.....	41
Figura 31. Mapa de densidad electrónica de diferencia anómalo del fragmento CMBX.....	42
Figura 32. Mapa de densidad electrónica de diferencia del complejo proteína P y fragmento CMBX.....	42
Figura 33. Dos vistas de la interacción del fragmento CMBX con la proteína P.....	43
Figura 34. Interacción putativa de apilamiento entre el anillo bencénico y residuos K90 y K53.....	43
Figura 35. Modelo de potencial electrostático de la proteína P con el extremo 5' líder y el fragmento CMBX.....	44
Figura 36. Residuos clave para la estabilización del extremo 5' líder y fragmento CMBX en complejo con la proteína P.....	45
Figura 37. Fragmento CMBX flanqueado por las lisinas 53 y 90 que forman la cavidad donde se unió.....	46
Figura 38. Mapeo de cavidades hidrofóbicas <i>drogables</i> *.....	47
Figura 39. Sobreposición de proteína P nativa y remojada en fragmento.....	48
Figura 40. Desviación de residuos del complejo con respecto a la proteína P nativa.....	48
Figura 41. Gráfico de Ramachandran de la proteína P nativa.....	55
Figura 42. Gráfico de Ramachandran de la proteína P en complejo con el fragmento CMBX.....	55
Figura 43. Alineamiento de secuencia de la subunidad proteica de la RNasa P de varias bacterias.....	56

**Drogable*. Esta palabra es una traducción libre del idioma inglés al español que indica la capacidad de una molécula biológica blanco de interactuar con moléculas tipo fármaco y en esta tesis se utilizara para referirse a ello.

Índice de tablas

Tabla 1. Tren de purificación de la subunidad proteica de la RNasa P bacteriana.....	30
Tabla 2. Estadísticas de datos de colecta de la estructura cristalográfica de la RNasa P nativa y su derivado.....	36
Tabla 3. Estadísticos de afinamiento de la proteína nativa y su derivado.....	36
Tabla 4. Aminoácidos observados por cristalografía en el tetrámero de la unidad asimétrica.....	37
Tabla 5. Valores B de la proteína nativa, su derivado y del fragmento CMBX.....	46
Tabla 6. Valores B del fragmento CMBX.....	47

Abreviaturas y Acrónimos

CCP4	Collaborative Computational Project, No. 4
CDB	Calorimetría Diferencial de Barrido
CMBX	5- Cloro-2-Mercaptobenzoxazol
COOT	Crystallographic Object-Oriented Toolkit
DTT	Ditiotreitol
DFBF	Diseño de Fármaco Basado en Fragmentos
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GST	Glutación Transferasa
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico
NaOAc	Acetato de Sodio
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PEG	Polietilenglicol
PHASER	Program for phasing macromolecular crystal structure
PHENIX	Python-based Hierarchical ENvironment for Integrated Xtallography
Proteína P	Subunidad proteica de la RNasa P bacteriana de <i>Thermotoga maritima</i>
PyMoL	Python based Molecular Visualization system
REFMAC5	Refinement of macromolecular crystal structures version 5
R_{free}	Factor de error libre
RNasa P	Ribonucleasa P
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Amonio
T_m	Temperatura media
TMAO	N-óxido de Trimetilamina
tRNA	Ácido Ribonucleico de transferencia
XDS	X-Ray Detector Software

Resumen

La ribonucleasa P (RNasa P) es una endoribonucleasa ancestral que cataliza la maduración metalodependiente del término 5' de los precursores de tRNA y que es esencial en todos los dominios de la vida. Debido a las diferencias observadas en las subunidades proteicas tanto del dominio bacteria como el de eucaria, pensamos que la subunidad bacteriana representa un blanco interesante para el desarrollo de fármacos. La necesidad de disminuir el tiempo para el descubrimiento de nuevos fármacos ha llevado a innovaciones en varias etapas del proceso. Una de estas innovaciones se originó en la década de 1995-2005, con el desarrollo de la metodología del diseño de fármacos basado en fragmentos. El diseño racional de fármacos basado en fragmentos es un proceso mediante el cual compuestos de bajo peso molecular (<300 Da) y afinidades bajas (K_d 100 μ M – 1 mM) son modificados, a partir de su unión a la proteína blanco, para elaborar un nuevo compuesto inhibidor más complejo con una afinidad más alta el cual puede ser un buen candidato para el desarrollo de fármacos. Nuestro objetivo principal es encontrar fragmentos que se unan a la subunidad proteica de la RNasa P, mediante un enfoque estructural, que sirvan como moléculas candidato a partir de las cuales se puedan desarrollar inhibidores tipo fármaco. En el presente trabajo, se ha observado y confirmado mediante cristalografía de rayos X la presencia del fragmento 5-Cloro-2-Mercaptobenzoxazol (CMBX). Interacciones putativas se analizan con las lisinas 53 y 90 mediante apilamiento con el anillo bencénico del CMBX y con la serina 93 mediante un puente de hidrógeno. El fragmento se localiza en una zona que interactúa con el extremo 5' líder del pre-tRNA.

Palabras clave: RNasa P bacteriana, diseño de fármacos, fragmentos, cristalografía de proteínas.

Abstract

Ribonuclease P (RNase P) is an ancient endoribonuclease that catalyzes metallodependent 5`end maturation of all tRNA precursors and is essential in the three domains of life. Due to observed differences in bacteria and eukarya domains of protein subunits, we think the bacterial subunit represents an interesting target for drug design. The need to reduce the time for discovery of novel drugs has led to innovations in various stages of the process. One of such innovations developed in the 90`s is the fragment based drug design methodology. The rational drug design based on fragments is a process in which low-molecular, low-affinity compounds (typically <300 Da, K_d 100-1 mM) are evolved once they bind a target biomolecule in order to develop a more complex, higher affinity compound which can be candidate for drug development. Our main objective by means of a structural focus is to find fragments that bind RNase P protein subunit in order to obtain candidate molecules that can be evolved into drug-like compounds. So far we have observed and confirmed by Crystallography the binding of fragment 5-Chloro-2-Mercaptobenzoxazole (CMBX). Putative interactions are described between residues K53 and K90 with aromatic ring by stacking and residue Ser93. The fragment is located in a zone that interacts with 5`linder of pre-tRNA substrate.

Key words: Bacterial RNase P, drug design, fragments, protein Crystallography.

Índice

Introducción	12
La RNasa P y su función.....	12
Estructura de la RNasa P bacteriana.....	13
Divergencia de la subunidad proteica.....	15
Diseño de fármacos basado en fragmentos.....	16
Planteamiento del problema	18
Hipótesis	18
Objetivos	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Particulares.....	19
Materiales y Métodos	19
Sobreexpresión y purificación de la proteína P.....	19
Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida.....	21
Microcalorimetría diferencial de barrido.....	21
Ensayos de desplazamiento térmico.....	21
Cristalización de la proteína P.....	22
Cocrystalización y remojado de la proteína P con coctel de fragmentos.....	23
Colecta de datos mediante difracción de rayos X.....	24
Determinación de la estructura cristalográfica y afinamiento.....	24
Búsqueda de fragmentos por cristalografía.....	24
Resultados	26
Inducción de la expresión de la proteína P.....	26
Cromatografía por intercambio catiónico fuerte en condiciones desnaturizante.....	27
Cambio de amortiguador mediante cromatografía por exclusión de tamaño molecular.....	27
Cromatografía por intercambio catiónico fuerte en condiciones no desnaturizantes.....	28
Rendimiento del tren de purificación.....	29
Evaluación de la pureza de la proteína P.....	30
Determinación de la temperatura de desnaturización de la proteína P mediante microcalorimetría diferencial de barrido.....	30
Estabilización de la proteína P mediante ensayos de desplazamiento térmico.....	30
Cristalización de la subunidad proteica de la RNasa P de <i>T. maritima</i>	34
Cocrystalización y remojado de la proteína P con coctel de fragmentos.....	34
Construcción y afinamiento de la estructura tridimensional.....	34
Búsqueda de fragmentos mediante cristalografía.....	37
Confirmación y validación de la presencia del CMBX.....	40
Interacción del fragmento CMBX en el sitio de unión.....	43

Discusión	44
1) El fragmento CMBX se une en una zona de interacción con el extremo 5` líder del pre-tRNA.....	44
2) Comparación estructural de la proteína P nativa con la estructura de la proteína P en complejo con el fragmento CMBX.....	47
3) Presencia de otros fragmentos candidatos dentro de la biblioteca Zenobia TM	49
Conclusiones	50
Perspectivas	50
Referencias	51
Apéndice 1. Discusión suplementaria. Experimentos que se realizaron y que no funcionaron.....	53
Apéndice 2. Mapa de Ramachandran de la proteína nativa y en complejo.....	55
Apéndice 3. Conservación de la secuencia de la proteína P bacteriana.....	56
Apéndice 4. Biblioteca de fragmentos Zenobia TM	57

Introducción

La RNasa P y su función

La ribonucleasa P (RNasa P) es una endorribonucleasa ancestral que cataliza la maduración metalodependiente del término 5' de los precursores de tRNA (Figura 1) y que es esencial en todos los dominios de la vida (Revisado en Smith *et al*, 2007).

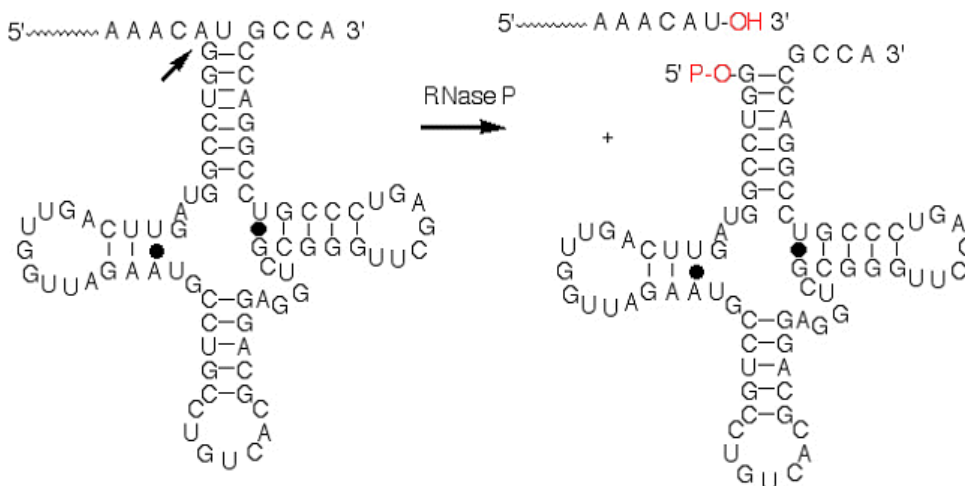


Figura 1. Procesamiento del precursor del ARN de transferencia por la RNasa P bacteriana. La flecha negra indica el sitio de corte donde la RNasa P remueve el extremo 5' líder para generar un ARN de transferencia activo. La RNasa P corta en una guanina y produce un segmento líder con extremo hidroxilado en el 3' y un tRNA maduro con un extremo 5' fosforilado. Tomado de Kurz y Fierke, 2000.

La RNasa P bacteriana se compone de una subunidad grande de ARN y una subunidad pequeña de proteína. La subunidad proteica contiene 117 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 14 kDa (Kazantsev *et al*, 2003) y forma un complejo ternario con el pre-tRNA (Figura 3).

La subunidad de ARN, que comprende entre 350-400 nucleótidos de longitud y un peso molecular aproximado de 130 kDa, es catalíticamente activa *in vitro* en ausencia de la subunidad proteica pero en presencia de altas concentraciones de sal (Guerrier-Takeda *et al*, 1983).

Sin embargo, la subunidad proteica es necesaria para la catálisis *in vivo*, aumenta su eficiencia catalítica en 2000 veces y mediante los contactos que hace con el extremo 5' líder, la holoenzima aumenta su afinidad por el pre-tRNA en 10,000 veces (Revisado en Smith *et al*, 2007).

La subunidad de ARN se compone de dos dominios (dominio de especificidad S, involucrado en el reconocimiento del sustrato y el dominio catalítico C, involucrado en la formación del sitio activo) que incluyen cinco regiones conservadas I a V (CR-1 a CR-V) y son comunes a todos los organismos. Además, en bacterias, el componente de ARN de la RNasa P puede ser dividida en dos grandes tipos, A para ancestral y B para *Bacillus* (Revisado en Torres-Larios *et al*, 2006).

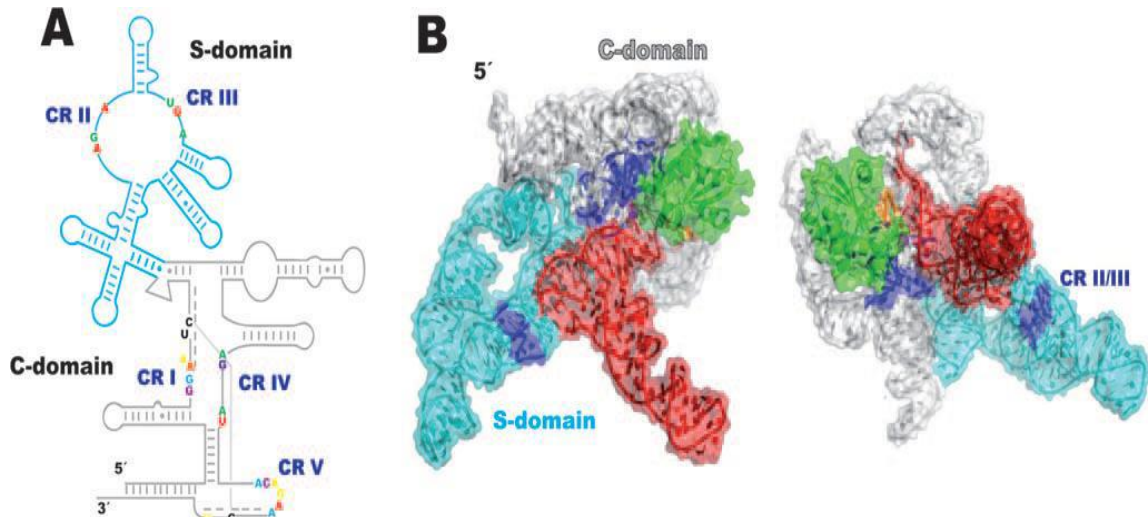


Figura 2. Estructura tridimensional del complejo ternario de la RNasa P bacteriana. A) Estructura secundaria del ARN de la RNasa P bacteriana tipo A. Se muestran las posiciones relativas de los nucleótidos conservados universalmente y las regiones conservadas (CR). B) Dos vistas de la estructura cristalográfica de la RNasa P bacteriana tipo A de *Thermotoga maritima*. El tRNA (en rojo) interactúa enteramente con la subunidad de ARN de la ribozima (gris para el dominio C y azul para el dominio S) y no interactúa con la subunidad proteica (verde), la cual estabiliza el extremo 5' líder del pre-tRNA (naranja). Tomado de Hernández-Cid *et al*, 2012.

Estructura de la subunidad proteica de la RNasa P bacteriana

La estructura cristalográfica de la proteína de la RNasa P bacteriana de *Thermotoga maritima* (de ahora en adelante denominada como proteína P) indica que es una proteína globular α/β que contiene una estructura secundaria general $\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$ (Figura 3). Además, posee una región que representa la mayor identidad en cuanto a secuencia entre proteínas P bacterianas y es conocida como el motivo RNR debido a sus tres residuos iniciales arginina-asparagina-arginina (Figura 4) (Stams *et al*, 1998).

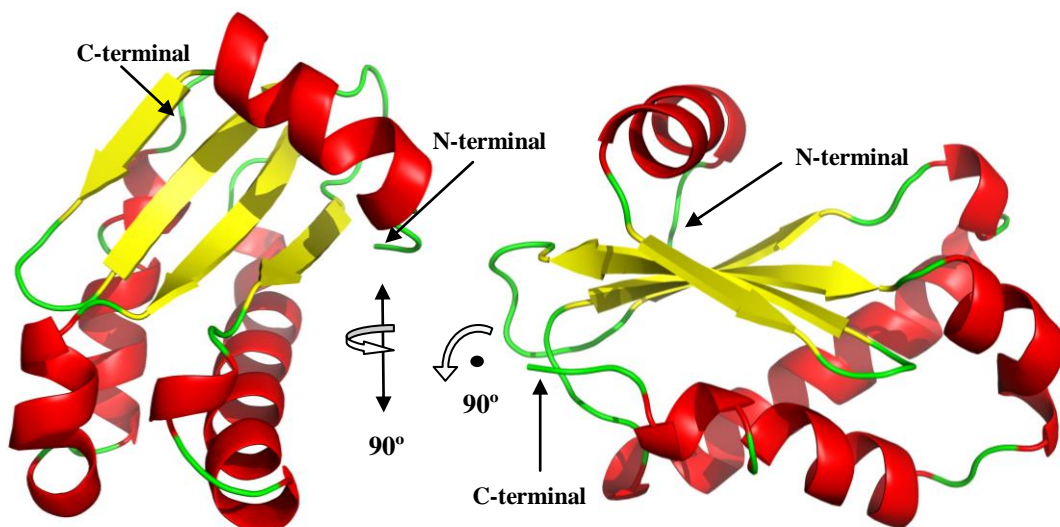


Figura 3. Estructura secundaria de la subunidad proteica de la RNasa P bacteriana de *T. maritima*. Se observa que la proteína está compuesta por 3 hélices alfa (en color rojo) y 4 hojas beta anti-paralelas (en color amarillo) con la conformación general $\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$. (PDB ID: 1NZ0; Kazantsev *et al*, 2003).

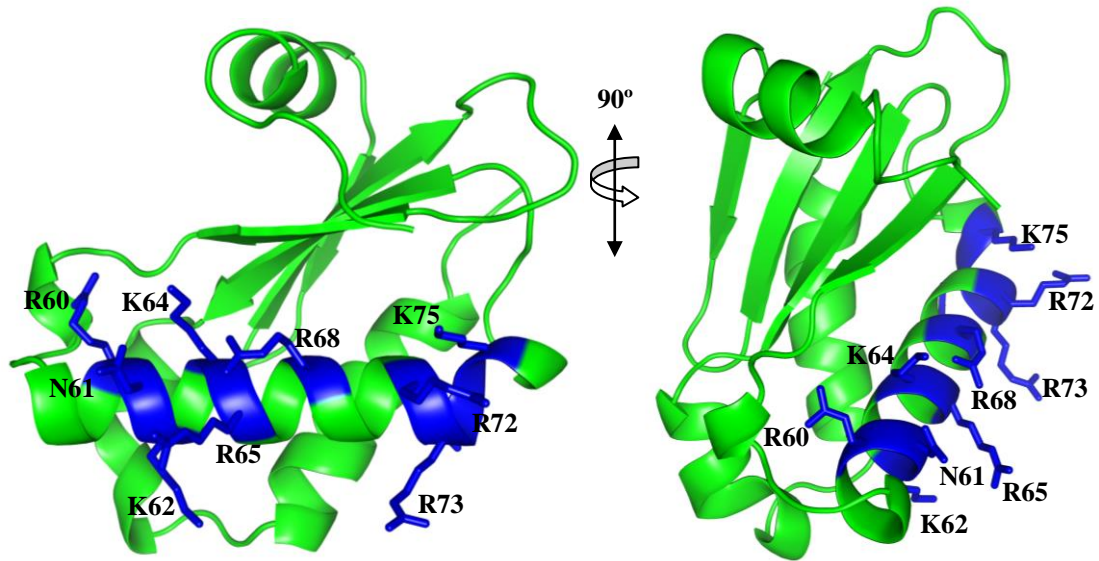


Figura 4. Motivo RNR. Llamado así por los residuos de arginina y asparagina que contiene. En color azul se muestra el motivo RNR que abarca los residuos R60-K75 que interaccionan con la subunidad de ARN.

La subunidad proteica en bacteria posee un surco (Figura 5 y Figura 6) el cual interacciona con el extremo 5' líder del precursor del ARN de transferencia otorgándole estabilidad (Reiter *et al*, 2010). Tanto el surco donde interacciona el 5' líder como el motivo RNR, son ambas regiones interesantes como blanco para el diseño de inhibidores que impidan la formación del complejo ternario (Figura 2).

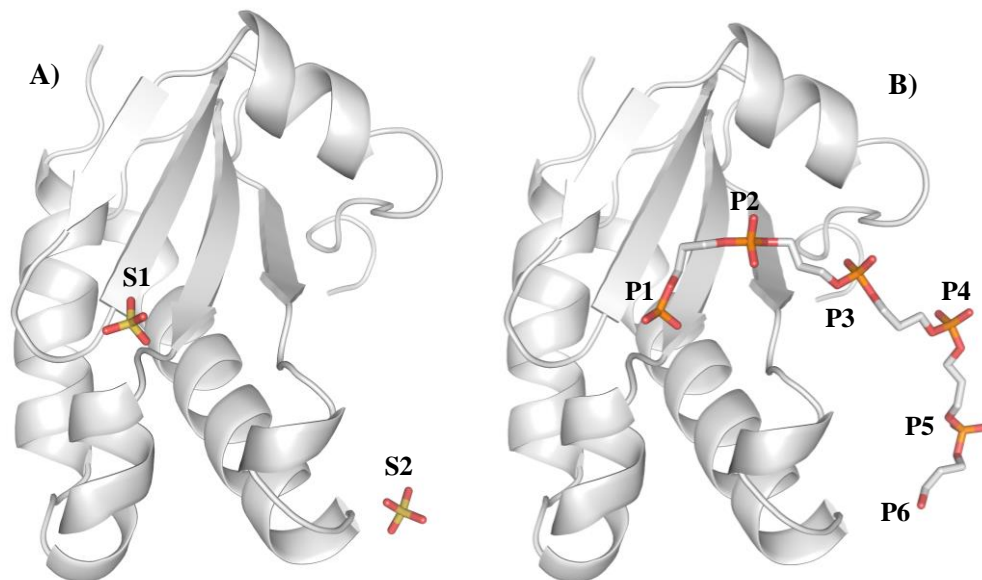


Figura 5. Posición del extremo 5' líder y de los sulfatos cocrystalizados en la proteína P. A) Sulfatos cocrystalizados con la proteína P. B) Modelo de la superposición del extremo 5' líder que corresponde a la posición de los sulfatos S1 y S2 con los fosfatos P1 y P6 respectivamente.

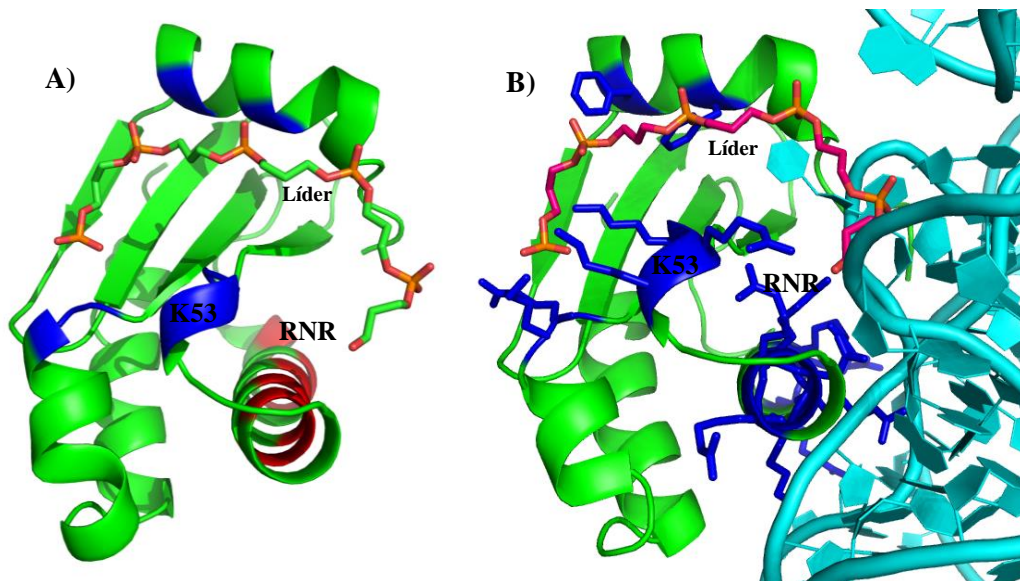


Figura 6. Regiones conservadas de interacción con el extremo 5' líder y la subunidad de ARN. A) En color azul oscuro se muestra la región que interacciona con el extremo 5' líder (esqueleto de carbonos y fosfatos) y en color rojo la región que interacciona con la subunidad de ARN (véase Figura 45). B) Modelo del complejo de la holoenzima donde en color azul claro se muestra la subunidad de ARN (PDB ID: 3Q1R, 3Q1Q; Reiter *et al*, 2010).

Divergencia de la subunidad proteica

La complejidad organizacional de la holoenzima RNasa P varía de manera extensa a través de los dominios filogenéticos debido a diferencias en la subunidad proteica de la RNasa P (Revisado en Frank y Pace, 1998); como ejemplo de esto, en bacterias existe exclusivamente una subunidad de la proteína P y hay hasta nueve subunidades proteicas en humano (Figura 7).

Un punto a hacer notar es que la proteína P bacteriana no tiene relación alguna con el dominio eucaria ni arquea, ya que no presenta relación filogenética ni estructural con ninguna subunidad proteica de estos dominios (Figura 7).

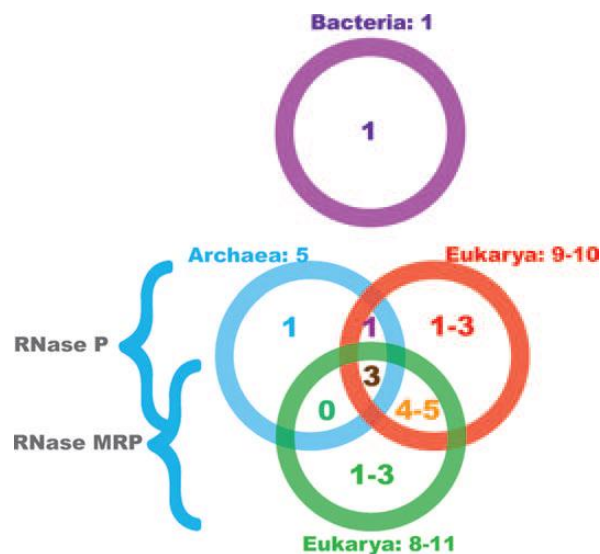


Figura 7. Diagrama de Venn. Se muestra la distribución general de las subunidades de proteína de las RNasas P/MRP en los tres dominios de la vida. Tomado de Hernández-Cid *et al*, 2012. Los números indican cuantas proteínas se encuentran en cada dominio.

Debido a las diferencias observadas en las subunidades proteicas del dominio bacteria como el eucaria, pensamos que la subunidad bacteriana representa un blanco interesante para la búsqueda de nuevos fármacos por cristalografía de rayos X ya que la subunidad proteica es esencial *in vivo*, además de que:

- El tamaño de la proteína es pequeño, lo que facilita la búsqueda de inhibidores en la estructura y el manejo de la muestra, así como la reproducibilidad de los experimentos.
- La proteína tiene motivos muy conservados en el dominio bacteria (véase Figura 45).
- Es la única subunidad de proteína de la RNasa P en el dominio bacteria.
- No hay homólogos en estructura ni secuencia, ni dentro del dominio bacteria ni fuera del mismo.
- Se cuenta con información de la estructura tridimensional de la holoenzima, por lo que se sabe que sitios en la proteína son más relevantes.
- En un primer acercamiento, se busca unión a la proteína más que inhibición de actividad, por lo que la relación costo-beneficio para la realización de ensayos de cristalografía es alta.
- Se obtienen cristales fácilmente que difractan a muy alta resolución (1.5 Å), lo cual facilita la identificación de inhibidores putativos y en poco tiempo (3-7 días), permitiendo un recambio y optimización constante.
- Los cristales son compatibles con el agente precipitante (PEG-1000 12%), que actúa como solvente para los fragmentos de la biblioteca Zenobia (siguiente sección) (PEG-400 50%) y es además el crioprotector de los cristales (PEG-1000 35%).

Diseño de fármacos basado en fragmentos

El diseño racional de fármacos basado en fragmentos comenzó en la década de los 90's y es ahora una estrategia de gran importancia implementada en el ámbito académico y en varias grandes compañías farmacéuticas a nivel mundial (Revisado en Hajduk and Greer, 2007).

Para llevar a cabo este tipo de metodologías, se hace uso de bibliotecas de fragmentos moleculares que comprenden cientos a miles de compuestos de bajo peso molecular y tienen la ventaja de explorar un espacio químico mucho mayor que las bibliotecas de moléculas tipo fármaco que comprenden millones compuestos de alto peso molecular. Una de estas bibliotecas de fragmentos es la biblioteca ZenobiaTM (Apéndice 5. *Biblioteca de fragmentos ZenobiaTM*), la cual fue utilizada en el presente trabajo con un tamaño de 352 fragmentos y que además está enfocada para escrutinios por cristalografía de rayos X (Nienaber *et al*, 2000).

Es un proceso mediante el cual compuestos de bajo peso molecular (menores a 300 Da) y afinidades bajas (K_d en el rango de mM) que forman parte de bibliotecas de cientos a miles, son modificados a partir de su identificación por unión a la proteína blanco mediante cristalografía de rayos X para elaborar un nuevo compuesto más complejo con una afinidad más alta el cual puede ser un buen candidato para el desarrollo de fármacos (Revisado en Murray y Blundell, 2010). Un esquema general de ésta metodología se observa en la Figura 8.

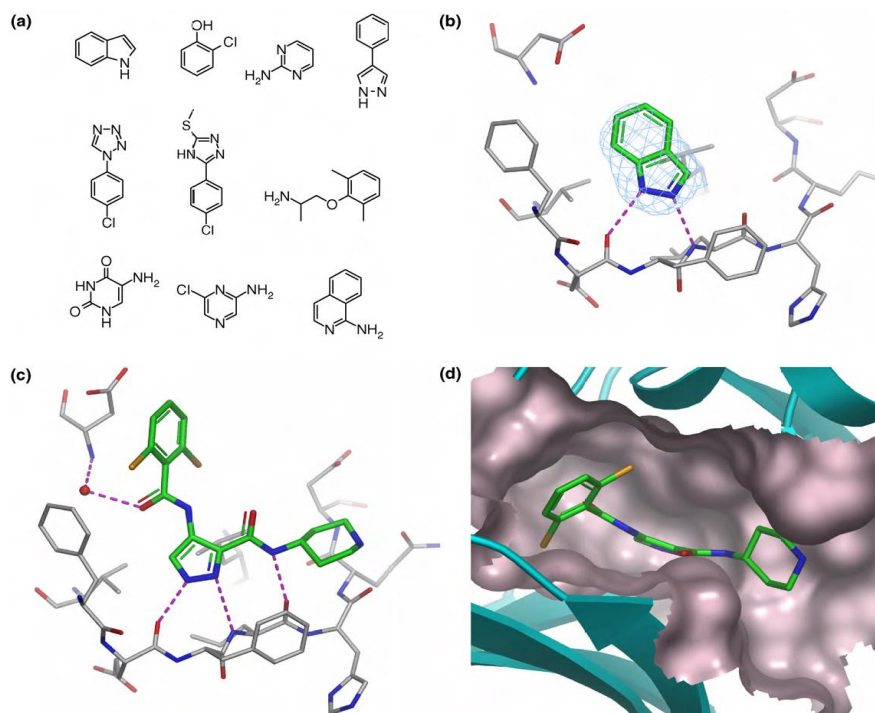


Figura 8. Diseño de fármacos basado en fragmentos. a) Las bibliotecas de fragmentos consisten en cientos o miles de pequeñas moléculas cuya unión al blanco es examinada mediante cristalografía de rayos X. b) Los hits son cristalizados en el sitio activo. c) y d) El diseño basado en estructura ayuda a incrementar la potencia del inhibidor. Tomado de Murray y Blundell, 2010.

Una característica esencial de la naturaleza de esta metodología es que se comienza el escrutinio encontrándose fragmentos de baja afinidad, promiscuos y poco selectivos que sin embargo, en etapas subsecuentes del proceso son optimizados en moléculas muy selectivas por su blanco (Bamborough *et al*, 2011). Existen varios ejemplos en la literatura de inhibidores que comenzaron su vida a partir de fragmentos poco afines y se encuentran actualmente en diferentes fases clínicas (Revisado en Baker, 2013), mientras que en Agosto de 2011 fue aprobado el primer fármaco basado en fragmentos (Bollag, 2010) el cual se desarrolló a partir de un compuesto promiscuo (Tsai *et al*, 2008).

Planteamiento del Problema

En años pasados, se ha observado un incremento en la resistencia de bacterias patógenas (Figura 9) a la mayoría de las clases de fármacos antibacteriales, creando un problema de salud a nivel mundial (Sebahia *et al*, 2006).

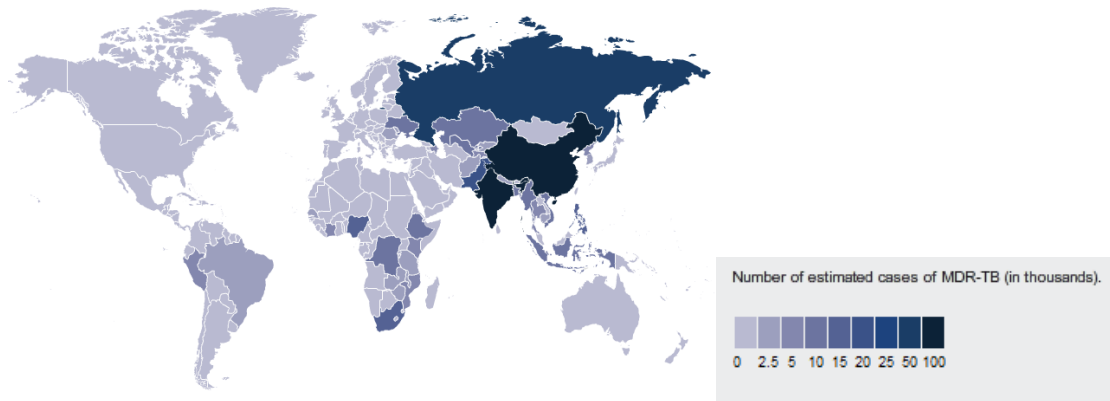


Figura 9. Número de casos estimados de tuberculosis multiresistente a antibióticos (MDR-TB) a nivel mundial. Fuente: Center for Global Development.

http://www.cgdev.org/section/initiatives/_active/drugresistanceglobalhealth/drug_resistance_by_disease

Es por esta razón que se hace más evidente la necesidad de diseñar fármacos novedosos que tengan como blanco moléculas vitales de patógenos bacterianos e irrumpir en su ciclo de vida tal como lo puede ser la RNasa P.

A pesar del gran interés existente en cuanto al estudio de la RNasa P como enfoque para diseño de fármacos inhibidores de su procesamiento del pre-tRNA, no hay disponible información sobre moléculas tipo fármaco en complejo con la parte proteica de la RNasa P bacteriana (Revisado en Liu and Altman, 2010).

Hipótesis

Es posible encontrar un fragmento que se una a la subunidad proteica de la RNasa P bacteriana de *Thermotoga maritima*.

Objetivos

Objetivo General

- Identificar un fragmento que interaccione con la subunidad proteica de la RNasa P bacteriana.

Objetivos Particulares

1. Purificar la subunidad proteica de la RNasa P de *Thermotoga maritima*.
2. Cristalizar la subunidad proteica nativa y en presencia del fragmento.
3. Obtener la estructura cristalográfica nativa y en presencia del fragmento.
4. Determinar qué fragmento se une y su modo de interacción.

Materiales y Métodos

Métodos

Sobreexpresión y purificación de proteína P

El plásmido empleado para la sobreexpresión de la proteína P fue el vector de expresión pGEX-4Ta (Amersham) inducible con isopropil β -D tiogalactósido (IPTG); contiene el promotor de la ARN polimerasa T7, la proteína de fusión GST y un sitio de corte para trombina (Figura 10). El plásmido derivado, el cual se obtuvo de Krivenko *et al* (2002), porta el inserto del gen *mpA* codificante para la subunidad proteica de la RNasa P bacteriana de *T. maritima*.

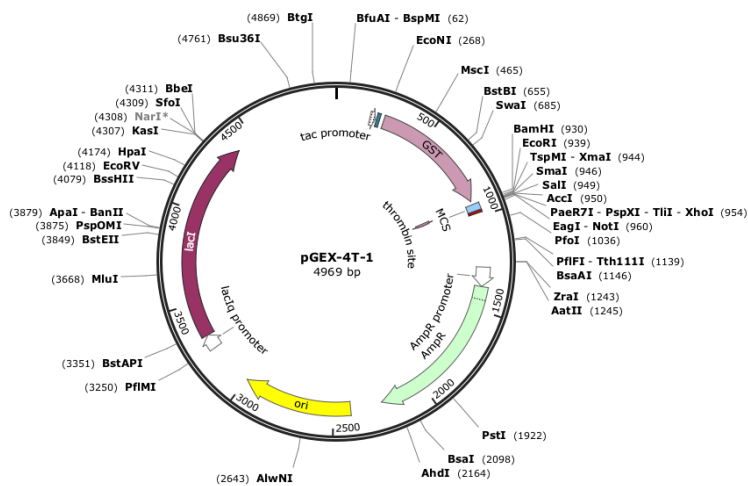


Figura 10. Vector de expresión pGEX-4Ta. Vector de expresión usado para la sobre-expresión de la subunidad proteica de la RNasa P de *T. maritima*. Contiene un sitio de corte para trombina y una proteína de fusión GST.

Células de *E. coli* BL21(DE3) pLysS fueron transformadas con ADN plasmídico pGEX-4Ta (Krivenko *et al.*, 2002) y crecidas a 37°C en medio LB adicionado con ampicilina a 100 µg/µL y cloranfenicol a 34 µg/µL.

La expresión de la proteína fue inducida añadiendo 0.25 mM de IPTG en medio LB, cuando las células alcanzaron una OD₆₀₀ de 0.4, se cosecharon después de 6 horas por centrifugación (30 min, a 6000 rpm, 4°C) y la pastilla celular fue almacenada a -20°C.

Las células descongeladas provenientes de 3 litros de cultivo, fueron resuspendidas en 40 mL de amortiguador de lisis (100 mM Tris-HCl, 4 mM EDTA, 10% glicerol a pH 7.5) y sonicadas con un equipo Branson Sonifier 250 (30 s., encendido, 40 s., apagado, control de salida 70%), con el objeto de remover la proteína de fusión GST se añadieron 600 unidades NIH de trombina bovina al extracto y se dejó reposar la solución por 16 horas a temperatura ambiente y los restos celulares fueron removidos por centrifugación (30 min, 13000 rpm, 4°C).

El sobrenadante se recuperó y se trató con 5 M de urea; la solución resultante se sometió a una cromatografía de intercambio catiónico con una columna de matriz de sulfopropil Sefarosa, (SP SepharoseTM, GE Healthcare) de 13 cm de alto por 2 cm de diámetro interno. Se inyectaron 40 mL de muestra y el flujo de trabajo fue de 7 mL/min con amortiguador de unión 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA y 5 M Urea; la proteína fue eluida con un gradiente lineal de 0.1 a 3 M de NaCl con 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA y 5 M Urea. El gradiente se llevó a cabo en un volumen de 150 mL y la proteína P eluyó entre 1.3 y 1.8 M de NaCl.

En seguida se llevó a cabo un cambio de amortiguador mediante una cromatografía de exclusión de tamaño molecular (columna HiPrep Desalting 26/10, Sephadex G-25, GE Healthcare). Las dimensiones de columna fueron de 10 cm de alto por 2.6 cm de diámetro interno, con un volumen máximo de inyección de 15 mL y un volumen de columna de 53 mL. Se inyectaron 10 mL dos veces y el flujo de operación fue de 10 mL/min usando como amortiguador 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA y 1M NaCl.

Las fracciones obtenidas del paso de purificación anterior se juntaron y se hizo una dilución a una concentración final de 0.2 M NaCl. Esta dilución se destinó a una cromatografía de intercambio catiónico en una columna de matriz de metilsulfonato, de 10 cm alto por 1.5 cm de diámetro interno empacada con resina SourceTM 15S (GE Healthcare). Se inyectaron 20 mL de muestra y el flujo de trabajo fue de 7 mL/min con el amortiguador de unión 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5 y 0.2 mM EDTA, mientras que la muestra fue eluida en un gradiente lineal de 0.1 a 3 M NaCl con amortiguador 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5 y 0.2 mM EDTA. La longitud del gradiente se llevó a cabo en un volumen de 150 mL y la proteína P eluyó entre 1.0 y 1.2 M de NaCl. El tren de purificación fue llevado a cabo en un equipo ÄKTAprime plus de GE Healthcare.

La proteína se concentró a 13.23 mg/mL usando un filtro de centrifugación Amicon Ultra 10K (Millipore), cuantificada por un espectrofotómetro NanoDrop 1000 UV-Vis (Thermo Scientific) y almacenada a 4°C hasta su uso.

Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida

Al final del tren de purificación, la pureza de la proteína fue monitoreada mediante separación electroforética en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 18%. Se llevó a cabo en un sistema de electroforesis Mini-PROTEAN 3 Multi-Casting Chamber de Bio-Rad. El voltaje fue constante de 200 Volts y el tiempo de corrida fue de 1 h, 45 min. El amortiguador de corrida fue Tris-HCl 25 mM, Glicina 200 mM y SDS 0.1 %. El volumen de amortiguador de muestra fue de 2 µL, El volumen que se cargó de muestra fue de 8 µL, cargando 3, 6 y 12 µg de proteína y se cargó un volumen de 10 µL de marcador de peso molecular SeeBlueTM Pre-stained Standard (Life Technologies). El gel se reveló tiñendo con azul de coomassie en inmersión calentando en horno de microondas en 5 ciclos de periodos de 50 segundos y destiñendo en agua destilada toda la noche.

Microcalorimetría diferencial de barrido

Se llevó a cabo un análisis termodinámico para determinar la temperatura de desnaturalización mediante una calorimetría diferencial de barrido realizado por el Dr. Miguel Costas Basín de la Facultad de Química de la UNAM, en donde se monitoreó la variación en la capacidad calorífica en un rango de temperatura de 20 °C – 120 °C, con un incremento de temperatura de 90 K/Hr. Para el ensayo se utilizó proteína P a una concentración de 0.4 mg/mL en solución amortiguadora Tris-HCl 10 mM y EDTA 0.2 mM a pH 7.5. El ensayo se llevó a cabo en un microcalorímetro tipo VP-DSC (MICROCAL).

Ensayos de desplazamiento térmico

En el presente trabajo, los ensayos de desplazamiento térmico (*Thermal Shift Assay*) se desarrollaron como una alternativa al escrutinio mediante cristalografía de rayos X, ya que es un método rápido y preciso para conocer ligandos de bajo peso molecular que estabilicen térmicamente a proteínas (Niesen *et al*, 2007; Kranz *et al*, 2011) para el escrutinio de nuevos fármacos (Pantoliano *et al*, 2001). Actualmente, en el laboratorio estamos en el proceso de poner a punto este tipo de ensayos.

Estos experimentos se llevaron a cabo en un aparato de PCR Tiempo Real StepOne™ (Applied Biosystems) en formato de 48 pocillos donde las condiciones para los experimentos fueron las siguientes:

- Rango de temperatura: 0 – 99.9°C.
- Primer paso: 2 min a 25°C.
- Segundo paso: rampa de temperatura continua a 1% de incremento con respecto a la Temperatura final.
- Tercer paso: 2 min a 99.9°C.
- Filtro para el fluoróforo reportero: excitación a 492 nm y excitación a 610 nm. Se utilizó el fluoróforo reportero SYPRO Orange™ (Invitrogen) a 1X (el fabricante no especifica la concentración).

El volumen final por ensayo fue de 10 µL y cada ensayo se compone de 1 µL de solución proteína-SYPRO Orange a 4 mg/mL y 1X respectivamente; 8.75 µL del osmolito estabilizador N-óxido de trimetilamina (TMAO) a 3.5 M y 0.25 µL de amortiguador de purificación (10 mM de Tris-HCl, pH 7.5 y 0.2 mM EDTA).

Además, como un control positivo, se utilizó la proteína triosafosfato isomerasa (TIM) a concentración de 1 mg/mL debido a su comportamiento estable y reproducible en curvas de desnaturalización.

Cristalización de la proteína P

Todos los reactivos y materiales utilizados en el presente estudio para experimentos de cristalización, cocrystalización y remojado fueron de la compañía Hampton Research.

En base a estudios previos de Kazantsev *et al* (2003) sobre la cristalización de la proteína P, se realizó una búsqueda de las condiciones idóneas de cristalización mediante el método de difusión de vapor en modalidad de gota sedente. Las soluciones, concentraciones, así como los rangos de porcentaje y de pH fueron las siguientes:

- 100 mM, Acetato de Sodio (NaOAc), pH = 4.8 – 5.2
- Polietilenglicol (PEG) 1000 = 12-18%
- 200 mM Sulfato de Potasio (K₂SO₄)
- Proteína = 2 – 14 mg/mL

La búsqueda de las condiciones ideales de cristalización dentro de estos rangos se realizó en placas de cristalización Swissci™ de 96 pocillos.

En estos experimentos se colocó una gota con 1 μL de proteína a 3 mg/mL y 1 μL de solución madre añadiendo 40 μL de la misma en el reservorio y fue sellado con una película plástica (HR3-609, Crystal Clear Sealing Film). En esta configuración los experimentos se llevaron a cabo a 23°C.

En estas condiciones, los cristales crecieron dentro de una semana hasta alcanzar dimensiones aproximadas de 300 μm x 200 μm x 90 μm . Previo al sobreenfriamiento en nitrógeno líquido, los cristales se sumergieron por 1 minuto en una solución crioprotectora que tuvo la siguiente formulación:

- Polietilenglicol 1000, 35%
- Acetato de Sodio trihidratado (NaOAc), pH 5.2, 100 mM
- Sulfato de Potasio (K_2SO_4), 20 mM
- Ditioneitol (DTT), 1 mM

Cocrystalización y remojo de la proteína P en coctel de fragmentos

Para llevar a cabo la búsqueda de fragmentos de una manera sistemática, se usó la biblioteca ZenobiaTM (Nienaber *et al*, 2000), que se compone de 352 compuestos (también denominados fragmentos) de bajo peso molecular (<300 Da), agrupados y clasificados en columnas con 8 moléculas de acuerdo a forma y tamaño molecular (Apéndice 5. Biblioteca de fragmentos ZenobiaTM).

Los experimentos de cocrystalización se llevaron a cabo colocando 1 μL de proteína a 3 mg/mL y 1 μL de solución madre que además contenía un coctel de 4 fragmentos a 20 mM (5 mM por fragmento), sellando con una película plástica y dejando a 21°C.

Una vez observados cristales crecidos mediante cocrystalización, estos se sometieron a experimentos de remojo en coctel de fragmentos de la siguiente manera:

1. Se tomaron los cristales crecidos por cocrystalización y se colocaron en un cubreobjetos de vidrio añadiendo 2 μL de solución madre para evitar daño al cristal.
2. Se añadió 1 μL de solución crioprotectora adicionada con fragmentos (9 μL de solución crioprotectora más 1 μL de coctel de 4 fragmentos a 200 mM por lo que la concentración final de cada fragmento fue de 5 mM) y se incubó por 4 minutos; al cabo de ese tiempo, se tomó el cristal e inmediatamente se sumergieron y almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Una ventaja técnica notable es que el PEG-1000 tuvo una triple función en los experimentos de cristalización y en la búsqueda de fragmentos, pues se utilizó como agente precipitante durante la cristalogénesis (PEG-1000 12%), funcionó como solvente de los compuestos de la biblioteca ZenobiaTM (PEG-400 50%) así como de crioprotector de los cristales (PEG-1000 35%). De tal manera, el daño al cristal fue mínimo al estar siempre en contacto con el mismo agente precipitante.

Colecta de datos mediante difracción de rayos X

A partir de los experimentos de **cocrystalización y remojado** en presencia de cocteles de fragmentos, se obtuvieron 55 cristales de buena calidad en los que no se observó daño y de los cuales 50 de ellos se llevaron al sincrotrón donde 21 difractaron a una resolución en un rango desde 1.5–2.8 Å. Este juego de datos de 21 cristales correspondió a 84 fragmentos escaneados de la biblioteca ZenobiaTM y equivale al 24% de los 352 fragmentos.

Todos los juegos de datos fueron colectados a partir de monocristales a temperatura criogénica (100 K) en el sector LS-CAT, línea 21-ID-G (energía de 12.7 keV) en el sincrotrón Advanced Photon Source (APS) del laboratorio nacional Argonne en Illinois, U.S.A.

Durante la estrategia de colecta, la longitud de onda fue de 0.97854 Å, la distancia al detector varió entre 180-360 mm y se colectaron 180° con oscilaciones de 0.20°-0.35° por imagen, el tiempo de exposición promedio por imagen fue de 2.25 s y el tiempo de colecta promedio por cristal fue de 30 minutos. Las reflexiones se indexaron con el programa MOSFLM (Leslie *et al*, 2007), se integraron con el programa XDS (Kabsch, 2010) y se escalan con SCALA (Evans, 2005). Los estadísticos de los datos se muestran en la Tabla 2 (*Resultados, Determinación de la estructura cristalográfica y afinamiento*).

Determinación de la estructura cristalográfica y afinamiento

La estructura de la proteína P fue determinada por el método de reemplazo molecular con el uso del programa PHASER de CCP4 (McCoy *et al*, 2007). El modelo estructural de la subunidad proteica de la RNasa P de *T. maritima* fue usada como modelo de búsqueda (PDB ID: 1NZ0; Kazantsev *et al*, 2003).

Las mejores soluciones del reemplazo molecular fueron obtenidas con el grupo espacial monoclinico primitivo $P 2_1$ y dimensiones de celda unitaria $a=56.8$ Å, $b=64.8$ Å, $c=68.5$ Å y ángulos $\beta=101.5^\circ$, $\alpha=\gamma=90.0^\circ$, mientras que la probabilidad más alta para el coeficiente de Matthews ($V_m=2.12$, $MW=57264$, $\%solvente=42.02$) indicó que pueden existir 4 moléculas de proteína en la unidad asimétrica.

El modelo inicial fue sujeto a varias rondas de inspección manual con Coot (Emsley and Cowtan, 2004) y el afinamiento cristalográfico con REFMAC5 (Skubak *et al*, 2004). El afinamiento final fue hecho con el programa PHENIX (Adams *et al*, 2010). Las estadísticas de afinamiento se presentan en la Tabla 3 (apartado de *Resultados, Determinación de la estructura cristalográfica y afinamiento*).

La estructura final fue determinada a una resolución de 1.5 Å. El modelo final tuvo valores $R_{free}=21\%$ y $R_{work}=17\%$. El modelo resultante se caracteriza por tener buenos parámetros estereoquímicos y ningún aminoácido se encontró en regiones prohibidas del mapa de Ramachandran (*Apéndice 4. Mapa de Ramachandran de la proteína nativa y en complejo*). Las figuras fueron preparadas con PyMOL (DeLano, 2002). El modelo final del complejo proteína-fragmento se inspeccionó a través del cálculo de un mapa de omisión por recocido simulado (*simulated annealing omit map refinement*).

Búsqueda de fragmentos por cristalografía

Con objeto de buscar fragmentos que se pudieran haber unido a la proteína P, se calcularon mapas de diferencia isomorfos auxiliándonos con el programa LigandFit de PHENIX.

Como parámetros de búsqueda que hemos definido en el laboratorio que los cristales derivados con respecto a los cristales nativos deberían de ser isomorfos por lo que la celda unitaria debía variar menos de 1 Å en sus dimensiones. Si este criterio se cumplía, entonces se calculaba un un mapa de diferencia isomorfo.

Después, se llevó a cabo el análisis de dichos mapas con el fin de localizar picos de densidad electrónica que sobresalieran en el mapa de diferencia isomorfo y que pudieran pertenecer a algún fragmento.

Otro criterio manejado en el laboratorio es que sólo se obtuvieran hits positivos con aquellos modelos de fragmentos que se ajustaran al menos en un 75% de coeficiente de correlación a la densidad electrónica del mapa de diferencia isomorfo (comunicación personal de Tom Terwilliger). La metodología general puede apreciarse en la Figura 11.

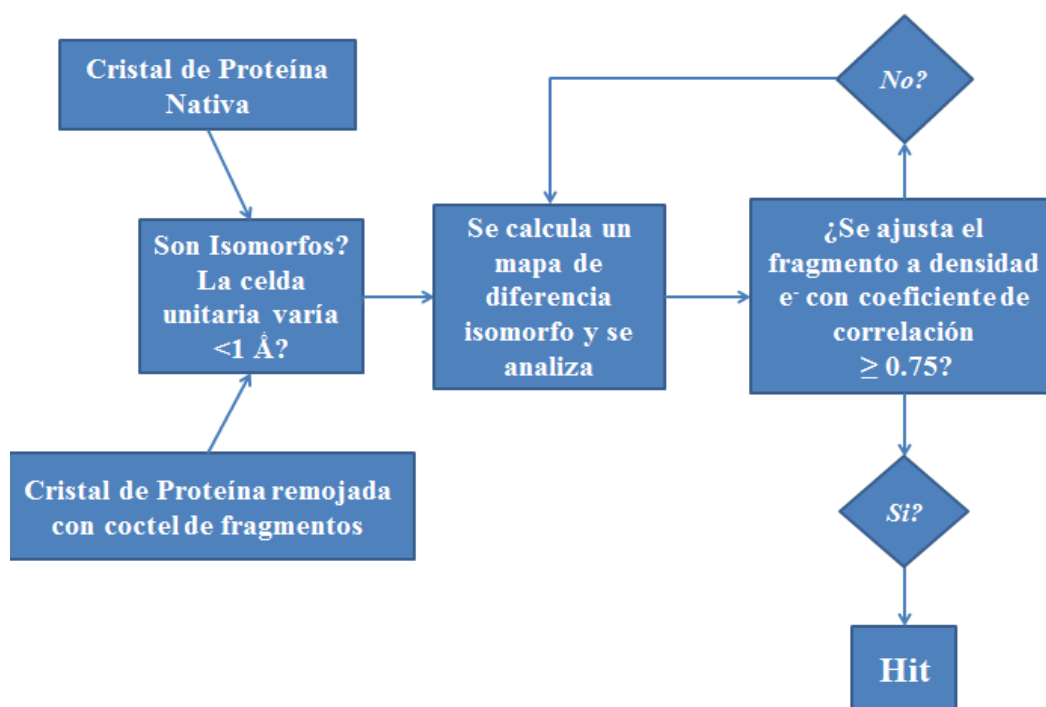


Figura 11. Esquema general de la metodología utilizada para la búsqueda de fragmentos por cristalografía.

RESULTADOS

Inducción de la expresión de la proteína P

Se realizaron experimentos de inducción a diferentes concentraciones de IPTG a 0, 0.25, 0.30 y 0.5 Mm en los lotes de cultivo bacteriano y cargando en los pocillos muestras de proteína total. La inducción se llevó a cabo por un tiempo de 6 horas a 37°C con 3 litros de cultivo después de que las células alcanzaran una $OD_{600} = 0.4$.

A este rango de concentraciones (0.25, 0.3 y 0.5 mM) se obtuvieron los mismos resultados en cuanto a sobreexpresión a juzgar por el análisis en los geles de poliacrilamida al 12%. Se observó que la concentración de 0.25 mM de IPTG dio el mismo resultado que la concentración más alta de 0.5 mM, así que para subsecuentes inducciones conducentes a purificación de proteína se utilizó la concentración más baja de IPTG que corresponde a 0.25 mM (Figura 12).

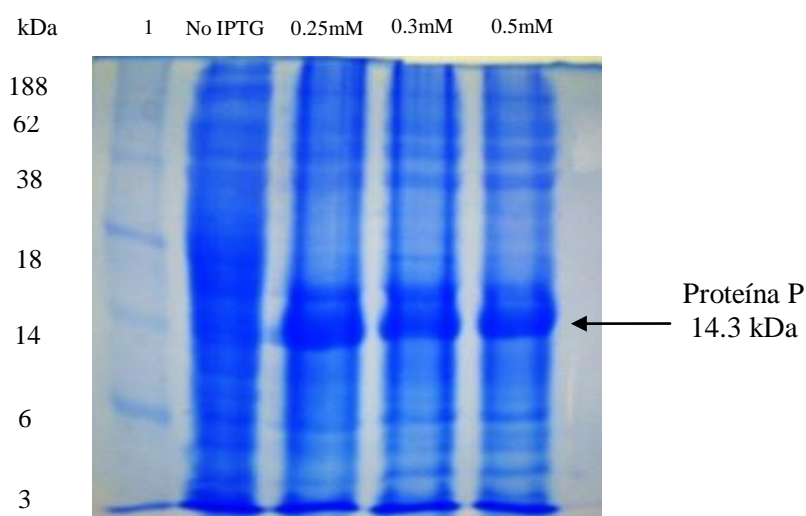


Figura 12. Experimentos de inducción analizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. 1: marcador de peso molecular. Se cargaron 10 μ g en cada pozo.

Cromatografía por intercambio catiónico fuerte en condiciones desnaturizantes

De acuerdo a los antecedentes, la proteína de fusión era soluble en condiciones desnaturizantes, pero precipitaba durante el intercambio de amortiguador bajo condiciones no desnaturizantes. Por otro lado, la proteína expresada en forma soluble pero precipitaba al plegarla o cuando se trata de unir a una resina cromatografía (Krivenko *et al*, 2002).

Sin embargo, la digestión con trombina de la proteína de fusión llevada a cabo en el lisado celular inmediatamente después de la lisis celular resultó en mejores rendimientos de proteína P muy soluble bajo condiciones desnaturizantes y nativas (Krivenko *et al*, 2002).

En base a estos antecedentes de purificación de la proteína P, el extracto crudo sonificado se trató con 600 unidades NIH de trombina bovina por 16 h y el sobrenadante de la centrifugación del extracto crudo sonificado, se recuperó y se trató con 5 M de urea; la solución resultante se sometió a una cromatografía de intercambio catiónico en condiciones desnaturizantes. Este paso desnaturizante fue requerido para evitar cualquier pérdida de la proteína P debido a la agregación con ácidos nucleicos en el lisado, debido a que es una proteína que une ARN, puede unir ácidos nucleicos de manera inespecífica durante el proceso de sonicación y promover un fenómeno de agregación. En la siguiente imagen (Figura 13) se muestra el cromatograma obtenido a partir de esta primera etapa de purificación de la subunidad proteica de la RNasa P en condiciones desnaturizantes con 5 M de urea.

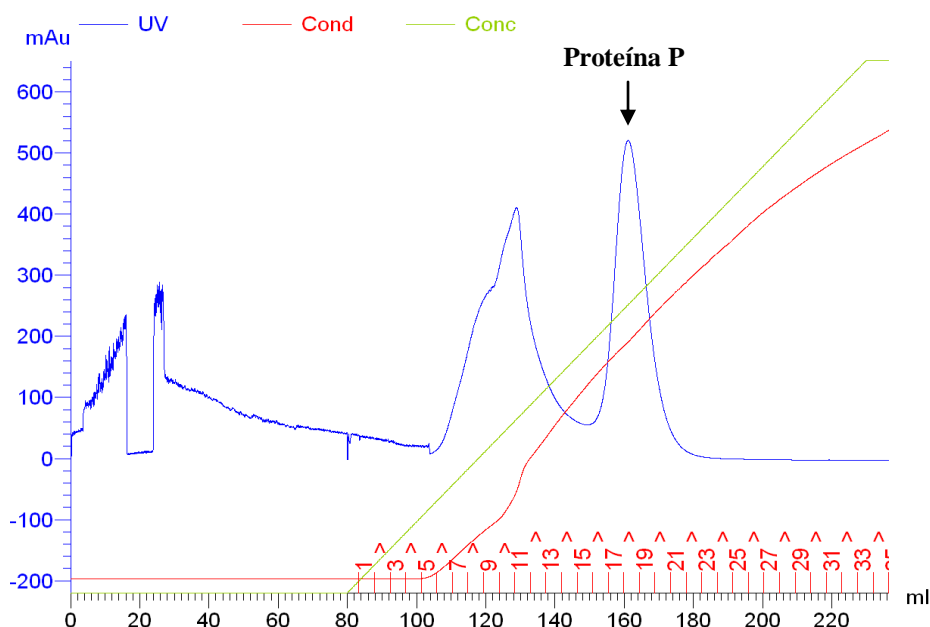


Figura 13. Cromatografía de intercambio catiónico en condiciones desnaturizantes (columna de matriz de sulfopropil Sefarosa, SP Sepharose™, GE Healthcare). Se inyectaron 40 mL de muestra y el flujo de trabajo fue de 7 mL/min con amortiguador de unión 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA y 5 M Urea; la proteína fue eluida con un gradiente lineal de 0.1 a 3 M de NaCl con 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA y 5 M Urea. El gradiente se llevó a cabo en un volumen de 150 mL y la proteína P eluyó entre 1.3 y 1.8 M de NaCl.

Cambio de amortiguador de la muestra mediante exclusión de tamaño molecular

Este paso se llevó a cabo para promover la renaturalización de la subunidad proteica de la RNasa P bacteriana y cambiar su amortiguador haciendo pasar la muestra de proteína P disuelta en amortiguador con 3 M de NaCl, 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA y 5 M Urea a través de una columna para desalado equilibrada con amortiguador 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA y 1 M NaCl (Figura 14). De esta manera se le otorga fuerza iónica suficiente para evitar su agregación.

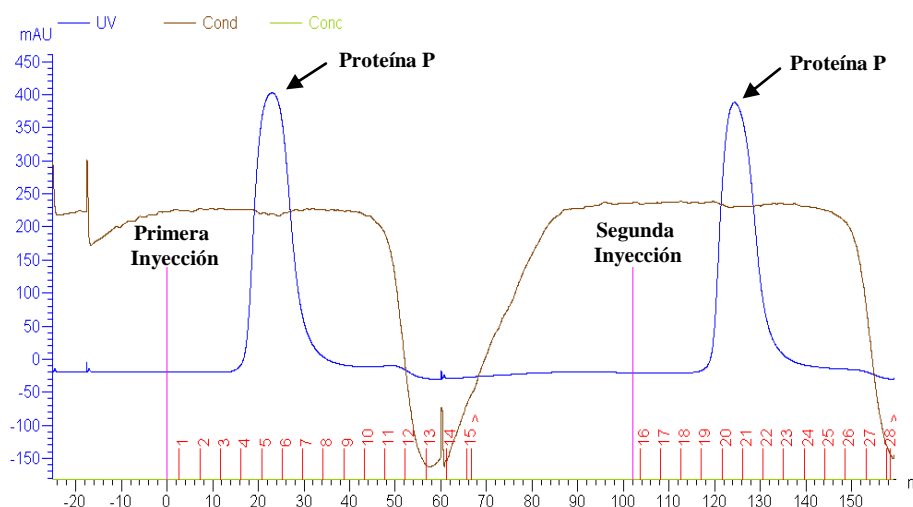


Figura 14. Intercambio de amortiguador por exclusión de tamaño molecular. El buffer con que se equilibró la columna de desalado fue 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2 mM EDTA, 1 M NaCl. Se usó una columna Hiprep Desalting 26/10 de General Electric y el flujo de operación fue de 10 mL/min. Las dimensiones de columna fueron de 10 cm de alto por 2.6 cm de diámetro interno, con un volumen máximo de inyección de 15 mL y un volumen de columna de 53 mL.

Cromatografía por intercambio catiónico fuerte en condiciones no desnaturizantes

Las fracciones obtenidas del paso de purificación anterior se juntaron y se hizo una dilución a una concentración final de 0.2 M NaCl. Esta dilución se destinó a una cromatografía de intercambio catiónico no desnaturizante (Figura 15).

Este segundo paso de purificación fue requerido para remover cualquier polipéptido cargado positivamente que pudo haber co-eluido con la proteína P desnaturizada.

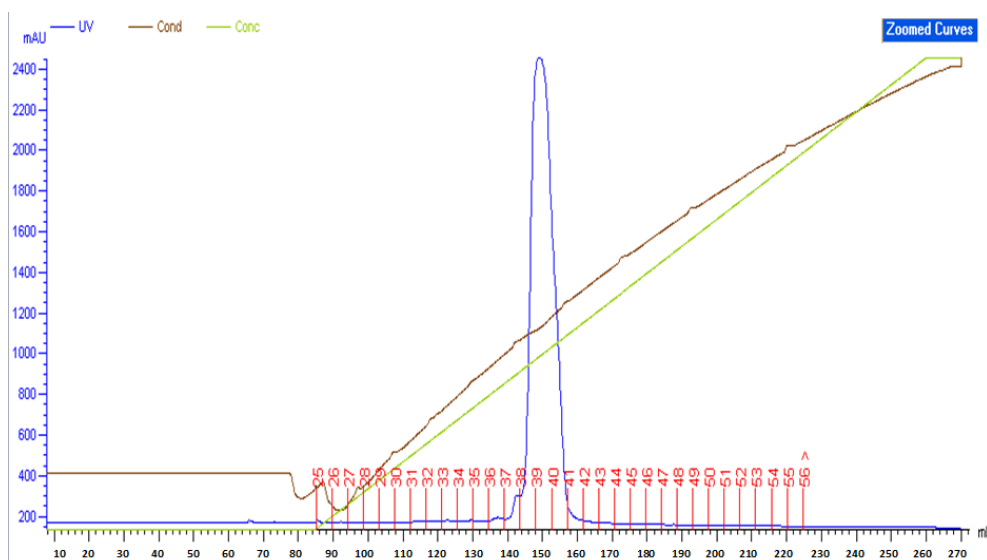


Figura 15. Cromatografía de intercambio catiónico en condiciones no desnaturalizantes (columna de matriz de metilsulfonato, Source™ 15S, GE Healthcare). Se inyectaron 20 mL de muestra y el flujo de trabajo fue de 7 mL/min con el amortiguador de unión 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5 y 0.2 mM EDTA, mientras que la muestra fue eluida en un gradiente lineal de 0.1 a 3 M NaCl con amortiguador 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5 y 0.2 mM EDTA. La longitud del gradiente se llevó a cabo en un volumen de 150 mL y la proteína P eluyó entre 1.0 y 1.2 M de NaCl.

Rendimiento del tren de purificación

Realizando cuantificación de proteína purificada mediante absorbancia a 280 nm en microvolumen en Nanodrop (Figura 16), se obtuvo una concentración final de 13.23 mg/mL en un volumen final de proteína concentrada de 500 μ L.

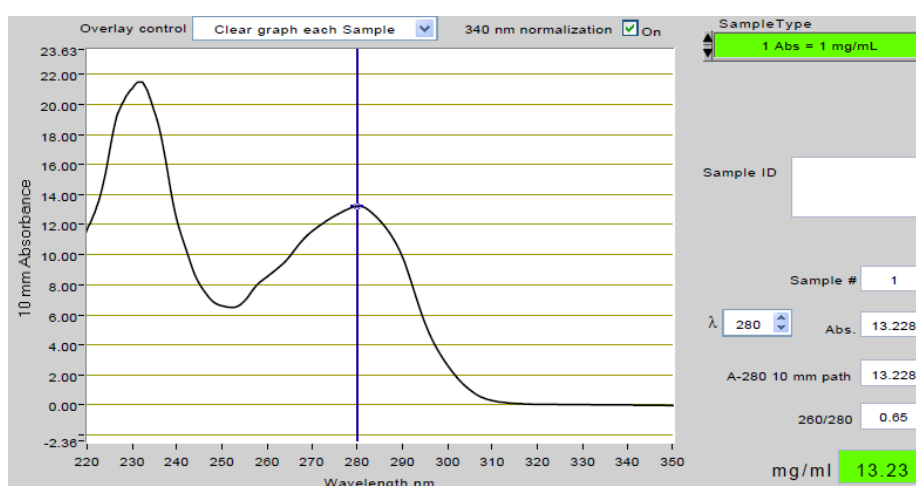


Figura 16. Perfil de absorbancia de la proteína purificada. Gráfico de absorbancia vs longitud de onda de la muestra de proteína purificada, donde se observan dos picos, uno a 230 nm (para enlace peptídico) y a 280 nm (para residuos aromáticos).

La relación 260:280 (0.65) indica que la muestra está libre de ácidos nucleicos, fenómeno que es muy común en este tipo de proteínas. La presencia de ácidos nucleicos va disminuyendo en cada paso de purificación (véase Tabla 1) hasta estar libre de ellos en el último paso donde tiene prácticamente 0% de contaminación por ácidos nucleicos con un valor de 0.65 para la relación 260:280.

Ya que se partió de un lote de 3 L de cultivo y se obtuvo una concentración final de proteína pura de 13.23 mg/mL el rendimiento obtenido fue de 4.41 mg de proteína pura por litro de cultivo (Tabla 1).

Tabla 1. Tren de purificación de la subunidad proteica de la RNasa P bacteriana.

	Extracto crudo^a	Intercambio Catiónico Desnaturalizante	Intercambio Catiónico No Desnaturalizante
Concentración de proteína (mg/mL)^b	73.74	1.3	1.42
Volumen (mL)	35	22	9
Proteína total (mg)	2580.93	28.6	13.23
Relación 260:280	1.97	0.92	0.65

^a A partir de 3 litros de cultivo de bacterias.

^b Concentración de proteína determinado por NanoDrop.

Rendimiento = proteína total/litros de cultivo = 13.23 mg/3 L = **4.41 mg/L**

Pureza de la proteína P

La electroforesis en gel de poliacrilamida al 18% de la muestra procesada mediante el tren de purificación ya descrito, muestra una banda de 14 kDa de peso molecular sin contaminantes aparentes y corresponde con el peso de la proteína deseada (Figura 17).

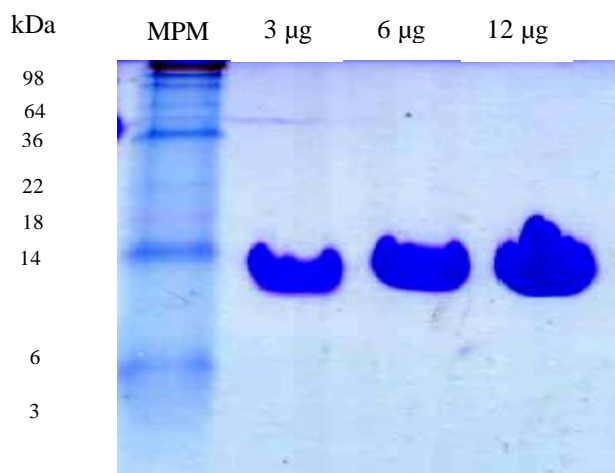


Figura 17. Evaluación de la pureza de proteína mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante al 18%. MPM: marcador de peso molecular. En los pozos se cargaron 3, 6 y 12 µg de proteína respectivamente.

Determinación de la temperatura de desnaturalización de la proteína P mediante microcalorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido se realizó en un calorímetro Microcal VP-DSC. Se observó un pico a 91.22°C a 2.5 unidades de calor específico que indica la temperatura de desnaturalización de la subunidad proteica de la RNasa P (Figura 18). Es interesante subrayar que en la curva de desnaturalización de la proteína de interés se observó un comportamiento muy ruidoso típico de proteínas intrínsecamente no estructuradas al analizar la curva desde los 40°C hasta los 90°C.

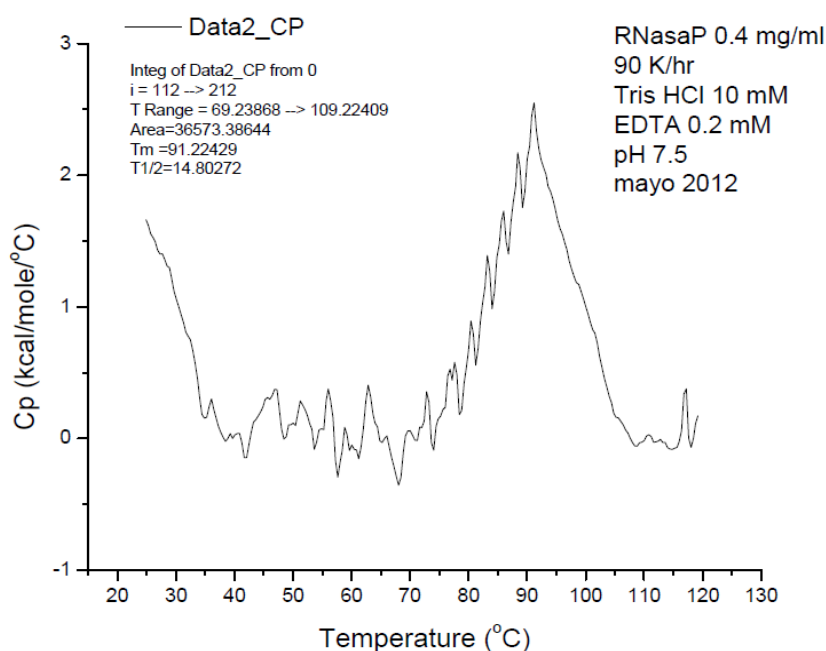


Figura 18. Microcalorimetría diferencial de barrido de la de la proteína P. Este termograma fue obtenido a partir de un análisis de la proteína P mediante calorimetría diferencial de barrido donde se observa un pico correspondiente con la temperatura de desnaturalización (T_m) a 91.2 °C. El rango de temperatura de medición fue aproximadamente de 69 – 110°C. Realizado por Dr. Miguel Costas Basín, FQ-UNAM.

Estabilización de la proteína P mediante ensayos de desplazamiento térmico

De acuerdo a estudios previos (Henkels *et al*, 2001; Guo *et al*, 2006) la proteína P de *Bacillus subtilis* se comporta como intrínsecamente no estructurada durante estudios biofísicos como RMN y dicroísmo circular. Dicho comportamiento lo pudimos confirmar mediante ensayos de desplazamiento térmico al no observar la señal de una curva sigmoidea de transición con una temperatura de desnaturalización (Figura 19) comparando con un ensayo típico de desplazamiento térmico (Figura 20).

Se muestra a continuación (Figura 19), una curva de desplazamiento térmico de la proteína P sin TMAO. No se pudo observar una curva de transición ni una temperatura de fusión debido al comportamiento desordenado de la proteína en solución y en ausencia del osmolito estabilizador TMAO.

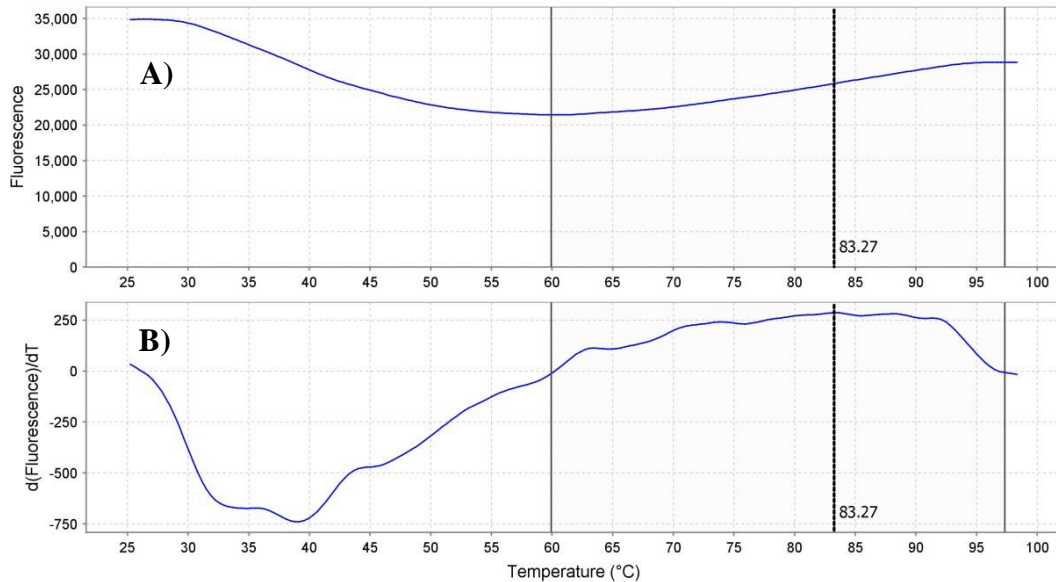


Figura 19. Ensayo de desplazamiento térmico de la proteína P en ausencia del osmolito estabilizador TMAO. Se realizó en amortiguador de purificación (10 mM de Tris-HCl, pH 7.5 y 0.2 mM EDTA) a 4 mg/mL.

Sin embargo, según Henkels *et al* (2001) en presencia de 2 M del osmolito estabilizador N-óxido de trimetilamina (TMAO), la proteína P se comporta como estructurada y en base a estas observaciones nos guiamos para llevar a cabo los experimentos de desplazamiento térmico y también hacer uso del TMAO durante los ensayos.

A partir de los experimentos mediante la metodología de desplazamiento térmico con el fluoróforo SYPRO Orange como reportero se obtuvo una curva de desnaturalización con la proteína P en presencia del osmolito estabilizador TMAO (Figura 21).

En la siguiente imagen (Figura 20) se muestra un ensayo típico de desplazamiento térmico de la proteína TIM usada como control. Se observó la T_m a una temperatura de 58°C. Se observan dos gráficos: el de la parte de arriba corresponde a una curva de desnaturalización de los datos normalizados A), mientras que la gráfica de la parte inferior B) describe la curva de desnaturalización de los valores derivados de fluorescencia.

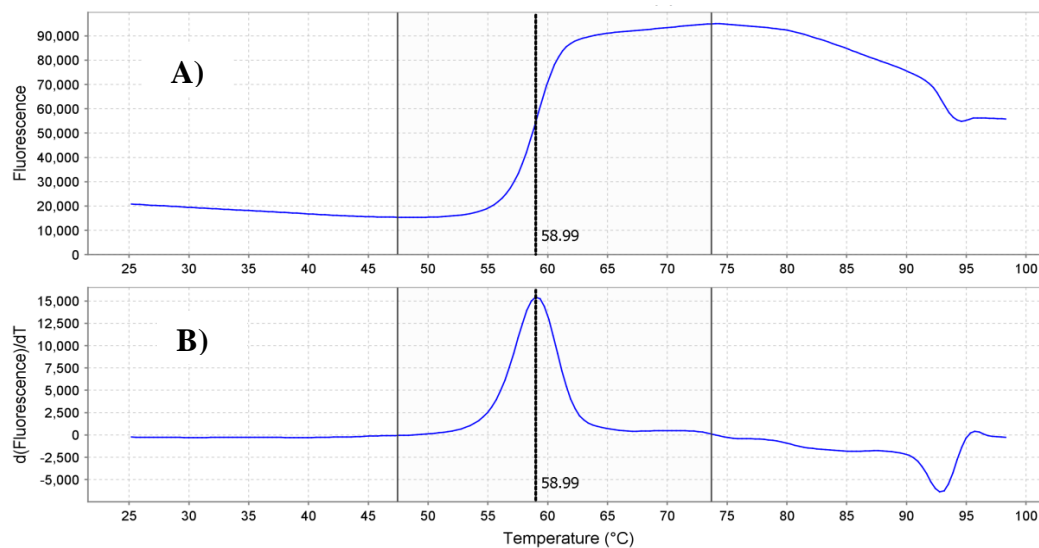


Figura 20. Control positivo para ensayos de desplazamiento térmico. Ensayo de desplazamiento térmico del control triosafosfato isomerasa a 1 mg/mL. Se observa la T_m a 58.99°C, coincidente en la curva de transición de la fluorescencia normalizada A), y el pico de la derivada de la misma B).

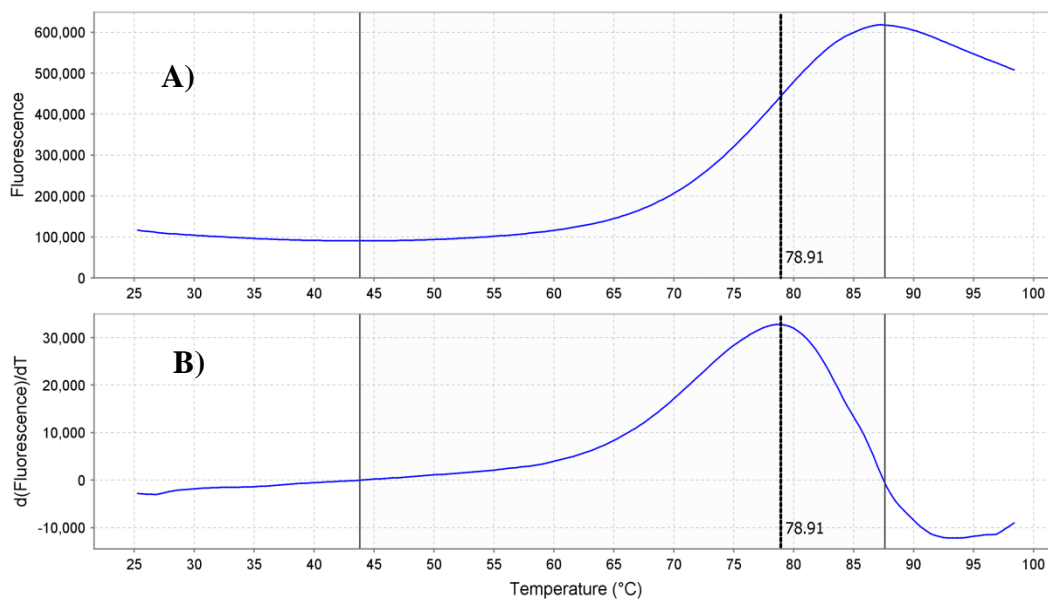


Figura 21. Curva de desnaturalización de la proteína P en presencia de 3.5 M de TMAO. Se observa una temperatura de desnaturalización de 78.9°C con el osmolito estabilizador TMAO.

Cristalización de la subunidad proteica de la RNasa P de *T. maritima*

Los cristales de la proteína P (Figura 22), aparecieron dentro de la primera semana de crecimiento como monocristales obtenidos mediante las condiciones exploradas, los cuales tuvieron dimensiones aproximadas de 300 μm x 200 μm x 90 μm en presencia de PEG-1000 al 12%.

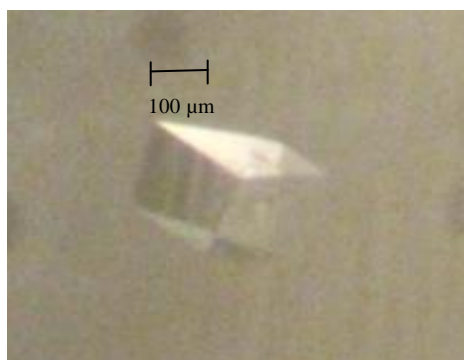


Figura 22. Cristal de la subunidad proteica de la RNasa P de *T. maritima*. Los cristales se obtuvieron en la condición con polietilenglicol (PEG) 1000 al 12%, acetato de Sodio trihidratado (NaOAc), pH 4.8 a 100 mM y sulfato de Potasio (K_2SO_4) a 200 mM. Las dimensiones aproximadas de los cristales fueron 300 μm x 200 μm x 90 μm .

Cocrystalización y remojo de la proteína P con fragmentos

Los experimentos de cocrystalización y remojo tuvieron buenos resultados, siendo el tiempo de remojo de 4 minutos en una solución coctel de 4 fragmentos cada uno a una concentración de 5 mM. Varios cristales se dañaron o se destruyeron durante la etapa del remojo, sin embargo, aquellos cristales que sobrevivieron al proceso difractaron a una resolución de entre 1.5 a 2.8 Å. Los experimentos en los que sólo se llevó a cabo la cocrystalización con fragmentos o el remojo con fragmentos se discuten más adelante (*Apéndice 1. Discusión suplementaria. Experimentos que se realizaron y que no funcionaron*).

Construcción y afinamiento de la estructura cristalográfica

Posterior a la obtención de cristales por cocrystalización y remojo, se procedió a la difracción (Figura 23) y a la colección de datos en el sincrotrón, con los cuales se llevó a cabo la construcción y afinamiento del modelo.

La estructura nativa de la subunidad proteica de la RNasa P de *T. maritima* se determinó en este estudio mediante reemplazo molecular a una resolución de 1.5 Å después de varios ciclos de afinamiento automatizado e inspección manual en REFMAC5 y Coot respectivamente.

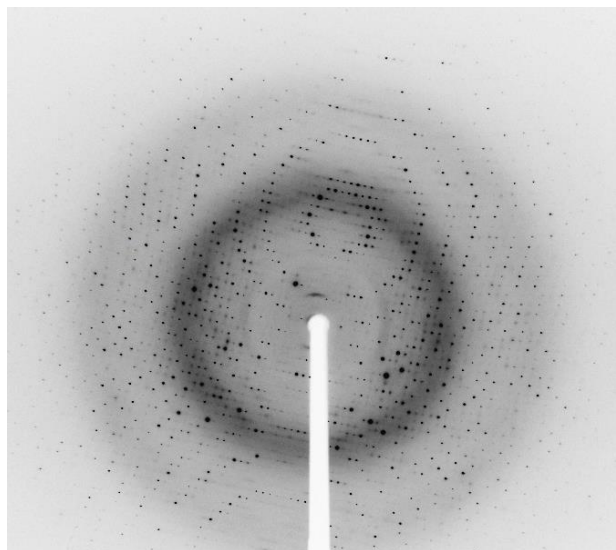


Figura 23. Patrón de difracción de la subunidad proteica de la RNasa P de *T. maritima*. La distancia al detector fue de 180 mm, la longitud de onda de 0.97856 Å, el tiempo de exposición de 2.25 s y la resolución máxima fue de 1.5 Å. La imagen fue obtenida en el sector LS-CAT del *Advanced Photon Source*, línea 21-ID-G.

Los criterios que se consideran en el laboratorio para que se utilizan para definir la calidad de los datos de un cristal son los parámetros estadísticos: R_{symm} , $I/\sigma(I)$ y la redundancia.

El R_{symm} mide la distribución de intensidades individuales de todas las reflexiones equivalentes por simetría y que contribuyen a la misma reflexión única. El $I/\sigma(I)$, es la señal sobre ruido es la proporción promedio de la intensidad de las reflexiones a su error estimado del ruido del fondo tiene que tener un valor mínimo de 2. La redundancia es el número promedio de veces que es medida una misma reflexión. Es de hacer notar que el grupo espacial es de baja simetría (monoclínico primitivo) por lo que se deben coleccionar muchos datos aunque la redundancia no necesariamente será alta.

Entre los datos estadísticos que se obtuvieron a partir de la colecta y del afinamiento de la estructura destacan el valor de la señal sobre ruido $I/\sigma(I) = 12.2$, el error de simetría $R_{\text{symm}} = 6.2\%$, y la redundancia de los datos que fue de 4.2 mediciones por observación (Tabla 2).

Tabla 2. Estadísticas de los datos colectados de la proteína P nativa y su derivado.

	Nativa	Derivado
Longitud de onda (Å)	0.97872	0.97856
Grupo espacial (No. De grupo)	$P 2_1 (4)$	$P 2_1 (4)$
Dimensiones de celda unitaria	a=56.85 Å b=64.85 Å c=69.27 Å $\alpha=90.0^\circ \beta=101.37^\circ \gamma=90.0^\circ$	a=56.34 Å b=64.57 Å c=68.26 Å $\alpha=90.0^\circ \beta=101.87^\circ \gamma=90.0^\circ$
Moléculas en la unidad asimétrica	4	4
Rango de resolución (Å)	39.44 - 1.50 (1.58-1.50)*	55.14 - 1.70 (1.74-1.70)
Reflexiones totales observadas	313,783 (45,817)	189,988 (27,769)
Reflexiones únicas observadas	75,231(10,953)	51,920 (7,581)
Redundancia	4.2 (4.2)	3.7 (3.7)
R_{symm} (%)	6.2 (44.7)	3.6 (10)
I/σ(I)	12.2 (3.2)	17 (7.8)
Compleción (%)	95.5 (95.4)	98.3 (98.3)

*Los números en paréntesis indican los valores para la última capa de resolución.

Respecto a los valores estadísticos obtenidos a partir del afinamiento de la estructura utilizando REFMAC5 (Tabla3), destacan los estadísticos $R_{\text{free}}=21.76\%$ y $R_{\text{factor}}=17.66\%$ para la proteína P nativa mientras que para la proteína P acomplejada los valores obtenidos fueron un $R_{\text{free}}=22.19\%$ y $R_{\text{factor}}=18.73\%$.

Tabla 3. Estadísticas de afinamiento de la estructura nativa y su derivado.

	Nativa	Derivado
Reflexiones usadas	75, 231	51,920
Reflexiones usadas en R_{free}	3,581	3,002
R_{factor}	17.66	18.73
R_{free}	21.76	22.19
R longitud de enlace (Å)	0.0266	0.0328
R ángulo de enlace (grados)	2.359°	2.730°
Valor B promedio (Å²)	21.9	25.1
Wilson Plot B factor (Å²)	19.1	22.6

De acuerdo a Wlodawer *et al*, (2008) se considera un valor aceptable de I/σ(I) de 2 como mínimo, por lo que el valor obtenido de señal sobre ruido para nuestros datos de difracción es aceptable puesto que es de 3.2.

Los valores R son una medida de la discrepancia entre las amplitudes de los factores de estructura obtenidos experimentalmente y los calculados. Para el valor del error estadístico R_{symm} se considera como un juego de datos con calidad sub-óptima aquellos que este valor rebasa el 10%, por lo que el valor de R_{symm} para la estructura es de 6.2, lo cual indica buena calidad de los datos y que existe una buena concordancia entre múltiples medidas de las mismas reflexiones con las diferentes medidas situándose en diferentes imágenes de datos.

En la estructura cristalográfica no se pudo observar densidad electrónica para los primeros 8 a 10 residuos a partir del extremo amino terminal (Tabla 4).

Tabla 4. Aminoácidos observados por cristalografía en el tetrámero de la unidad asimétrica.

Cadena	Numero de aminoácidos	Secuencia
A	108	10-117
B	110	8-117
C	108	10-117
D	108	10-117

El modelo final del complejo proteína-fragmento se inspeccionó a través del cálculo de un mapa de omisión por recocido simulado (Figura 24).

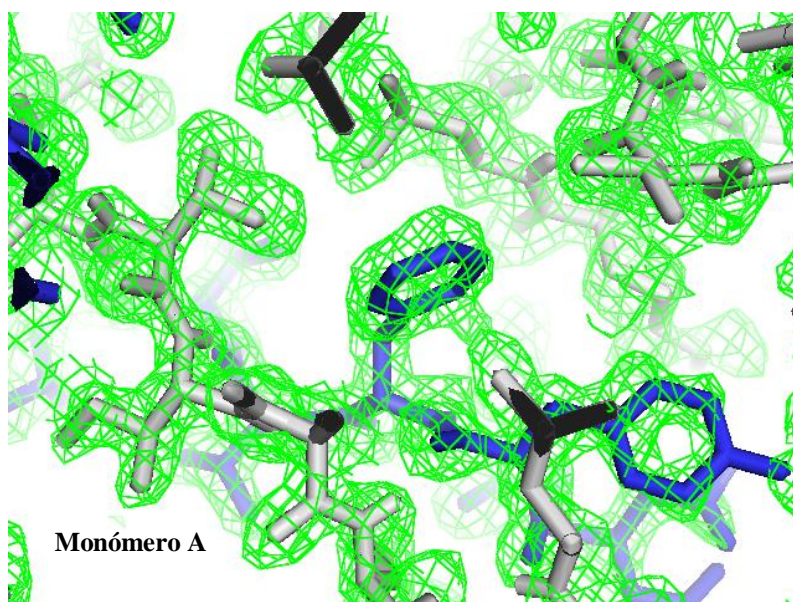


Figura 24. Mapa de densidad electrónica de omisión de la proteína P. En malla verde, se muestra la densidad electrónica contorneado a 1σ y en color blanco y azul, el modelo de la subunidad proteica nativa de la RNasa P de *T. maritima*.

Una vez obtenida la estructura cristalográfica de la proteína P nativa, se procedió a evaluar las estructuras de los cristales que se sometieron a un proceso de remojado con coctel de fragmentos para buscar algún posible fragmento que se hubiera unido.

Búsqueda de fragmentos en la estructura cristalográfica

Para el escrutinio y búsqueda de fragmentos mediante cristalografía, se dividió la biblioteca Zenobia™ en cocteles de 4 fragmentos, resultando en 88 cocteles que pudieron servir para experimentos de cocrystalización monitoreados en una placa de cristalización de 96 pocillos (Figura 25, 1).

De esta placa se obtuvieron 50 cristales que no sufrieron daño (Figura 25, 2) y de calidad aceptable de los cuales 21 de ellos lograron difractar a una alta resolución de entre 1.5 a 2.8 Å (Figura 25, 3).

Por último, se determinó la estructura cristalográfica de estos 21 cristales remojados en fragmentos y se analizaron mediante la metodología de búsqueda de fragmentos descrita antes (véase *Métodos. Búsqueda de fragmentos por cristalografía*), encontrándose un hit positivo con un coeficiente de correlación de 79.9% (Figura 25, 4).

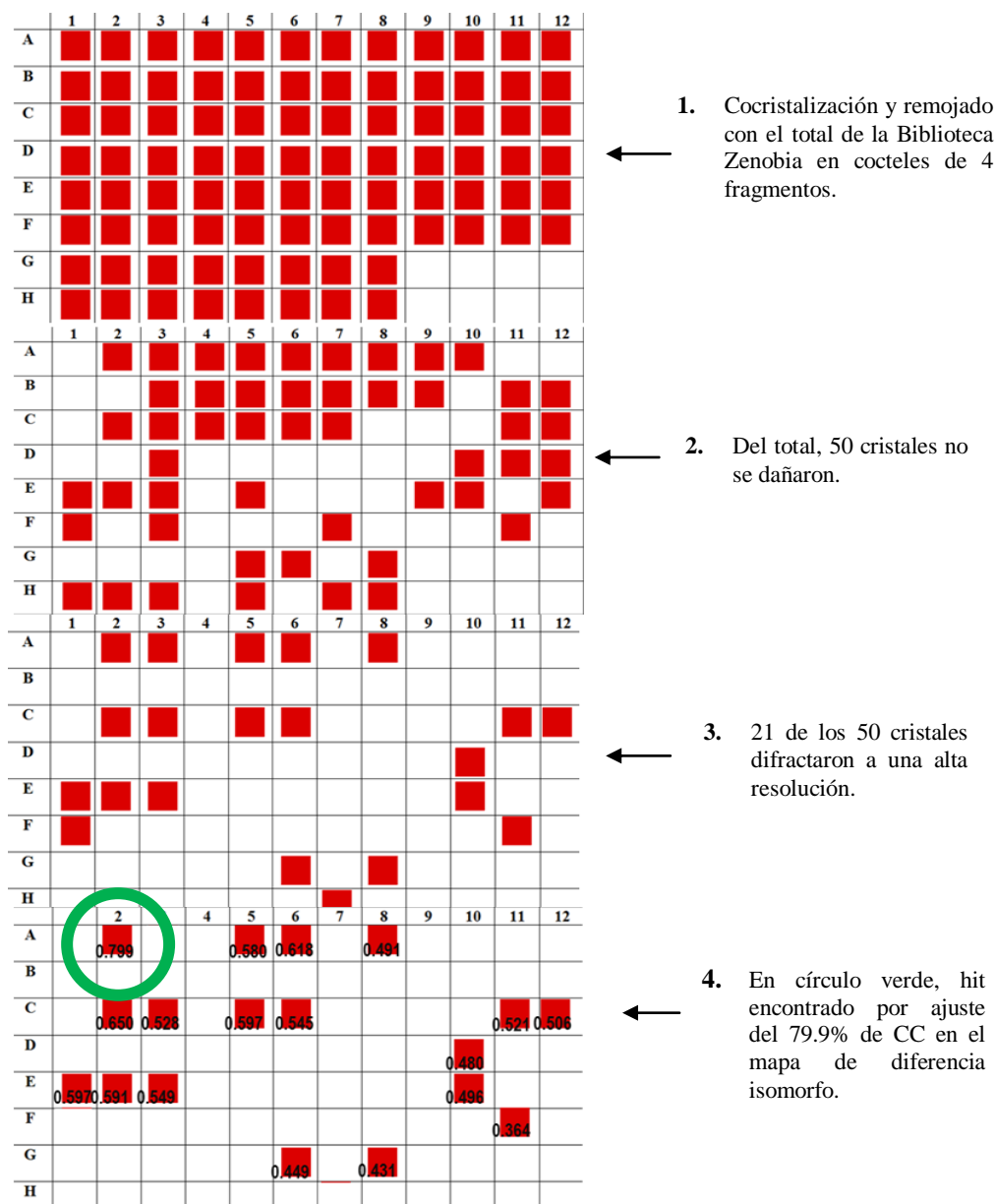


Figura 25. Etapas del escrutinio para la búsqueda de fragmentos con la biblioteca ZenobiaTM.

Con el fin de localizar densidades electrónicas que correspondieran a alguno de los fragmentos con que se cocrystalizaron y remojaron los cristales, se calcularon mapas de diferencia isomorfos utilizando la suite PHENIX.

En el laboratorio se establecieron los siguientes criterios de isomorfismo previo a la búsqueda de fragmentos en los cristales remojados en coctel de fragmentos:

- Que los cristales derivados con respecto a los cristales nativos fueran isomorfos variando menos de 1 Å en las dimensiones de la celda unitaria.

Una vez cumplidos dichos criterios de isomorfismo se llevó a cabo la búsqueda de fragmentos con ayuda del programa LigandFit que comprendió los siguientes pasos:

- 1) Se calcularon mapas de diferencia isomorfos de los cristales remojados en coctel de fragmentos.
- 2) Se analizaron estos mapas en búsqueda de picos de densidad electrónica que sobresalieran.
- 3) Se llevó a cabo un ajuste de la densidad electrónica a los modelos tridimensionales de los fragmentos.
- 4) Dicho ajuste es un cálculo del coeficiente de correlación igual o mayor a un 75%.
- 5) De cumplirse todos estos parámetros, entonces se considera que se ha encontrado un hit positivo.

Bajo estos criterios de búsqueda se pudo localizar con éxito el siguiente fragmento que fue el único que cumplió con los valores establecidos del coeficiente de correlación con un 79.9%.

El hit positivo (Figura 26), corresponde al fragmento 5-Cloro-2-Mercaptobenzoxazol (Figura 27.), el cual se observó a un contorno de 0.4 sigma en el mapa de densidad de doble diferencia ($2F_o - F_c$) y a 3.5σ en el mapa de diferencia ($F_o - F_c$).

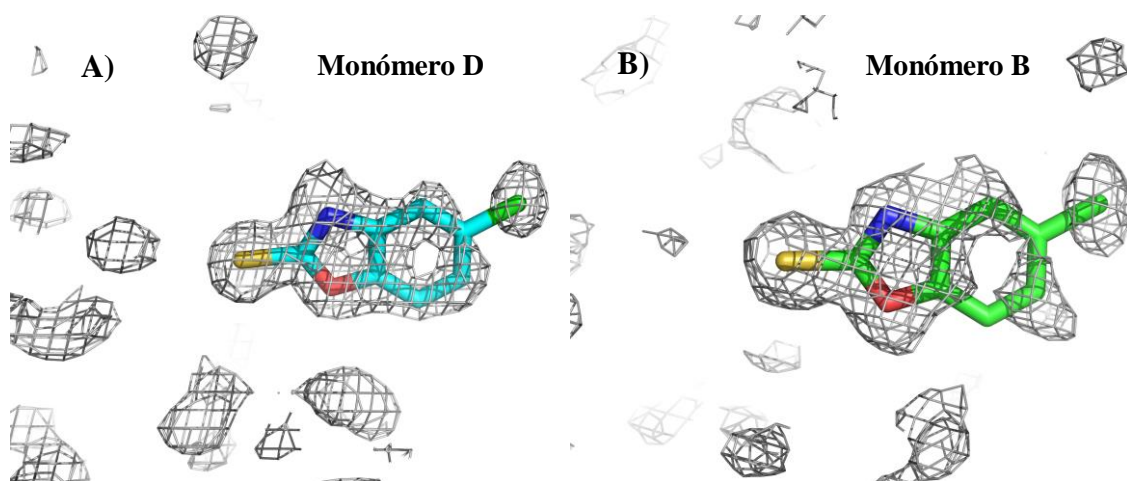


Figura 26. Hit encontrado mediante análisis del mapa de diferencia isomorfo. **A)** Mapa de diferencia isomorfo en malla gris contorneado a 1.5σ y en color azul el modelo del fragmento CMBX (5-Cloro-2-Mercaptobenzoxazole) con 0.799 de CC. **B)** Mismo mapa en otro monómero y en color verde el fragmento CMBX con 0.765 de CC.

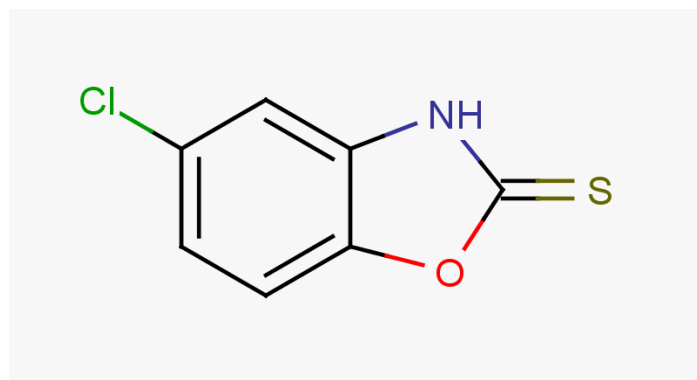


Figura 27. Estructura química del fragmento 5-Cloro-2-Mercaptobenzoxazol (CMBX). Contiene 11 átomos diferentes al Hidrógeno y un peso molecular de 185.63 Da.

Confirmación y validación de la presencia del CMBX

Como método adicional a la obtención del hit localizado mediante el análisis del mapa de diferencia isomorfo y al ajuste del modelo del fragmento al pico de densidad electrónica con un coeficiente de correlación del 79.9%, se validó la presencia del fragmento. Para este fin se llevaron a cabo los siguientes procesos:

- 1) Se hizo un afinamiento de la estructura nativa en presencia de fragmento CMBX para verificar que no se encontrara una densidad electrónica análoga. En la figura 28 se presenta un pico de densidad negativa muy grande.
- 2) Ausencia de densidad electrónica negativa (Figura 30).
- 3) Dado que nuestro el fragmento contiene un átomo de azufre, se calculó un mapa de diferencia anómalo (Figura 31).

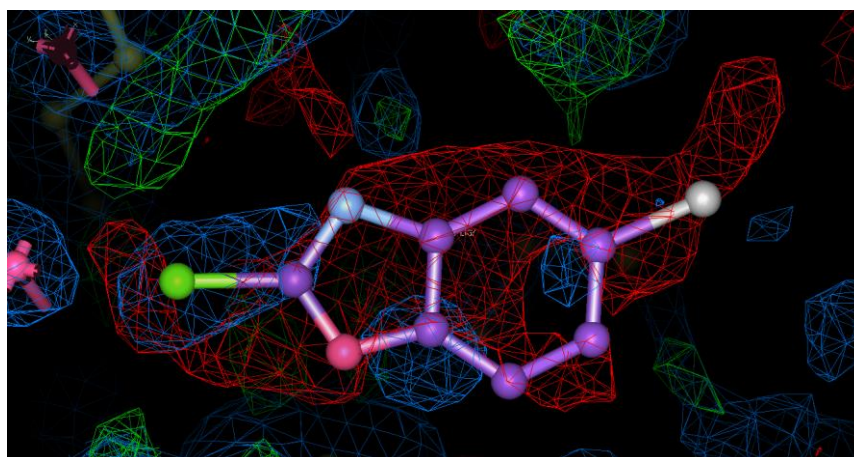


Figura 28. Estructura nativa afinada con el fragmento CMBX. Se presenta una densidad electrónica negativa en la misma región en donde podría presentarse el ligando que en la estructura remojada. En rojo y verde el mapa de diferencia a 3.5σ y en azul el mapa de doble diferencia a 0.4σ .

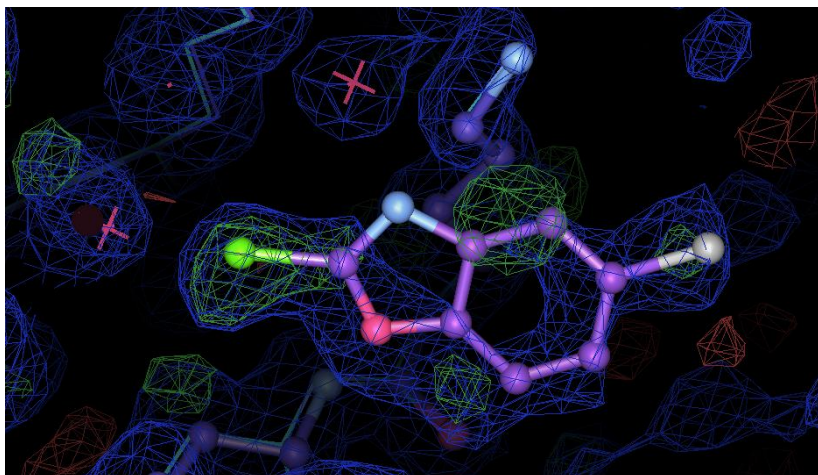


Figura 29. Sobreposición del fragmento CMBX en la estructura derivada afinada sin fragmento. En color azul se muestra el mapa de doble diferencia contorneado a 0.4σ , en color verde el mapa de diferencia contorneado a 2.5σ y en color morado el modelo de la proteína P y el fragmento CMBX.

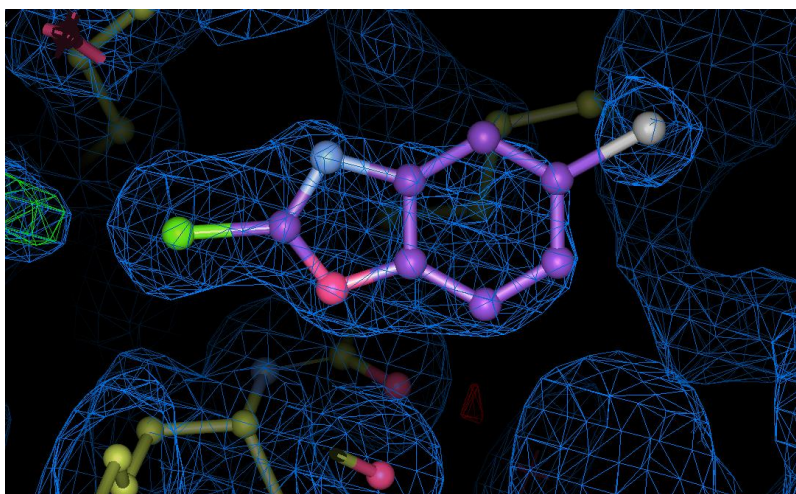


Figura 30. Estructura cristalográfica de la proteína P con fragmento. En azul mapa de doble diferencia ($2Fo-Fc$) a 0.4σ y en rojo el mapa de diferencia ($Fo-Fc$) a 3.5σ . El fragmento afinó a una ocupación de 0.4.

Con miras a métodos que confirmara la presencia del fragmento CMBX en la estructura cristalográfica de la proteína P, se aprovechó el hecho de que el fragmento contiene un átomo de Azufre con el cuál fue posible el cálculo de un mapa de diferencia anómalo.

El mapa se calculó utilizando el programa PHASER de la suite CCP4 en su modalidad SAD-MR (*Single-wavelength anomalous dispersion with molecular replacement partial structure*) utilizando mapas de tipo LLG (*log likelihood gradient*). Este tipo de mapa de diferencia anómalo fue calculado a partir de un modelo probabilístico el cual es más exacto en comparación con los mapas de diferencia anómalos sencillos.

El mapa de diferencia anómalo se calculó a partir de los datos escalados de las reflexiones colectadas del cocrystal remojado en coctel de fragmentos por 4 minutos y del modelo donde se fusionaron dos ligandos CMBX en los monómeros B y D, afinado en PHENIX.

Al analizar el mapa de diferencia anómalo en la cavidad donde se localizó el fragmento, se observó un pico de densidad que corresponde a la posición del átomo de Azufre del fragmento CMBX ubicado en el monómero D; asimismo, se observó en el mismo sitio pero en el monómero B otro pico similar de densidad electrónica para la posición del Azufre. Dadas estas observaciones, se modeló un ligando CMBX en la cavidad de unión para los monómeros B y D (Figura 31).

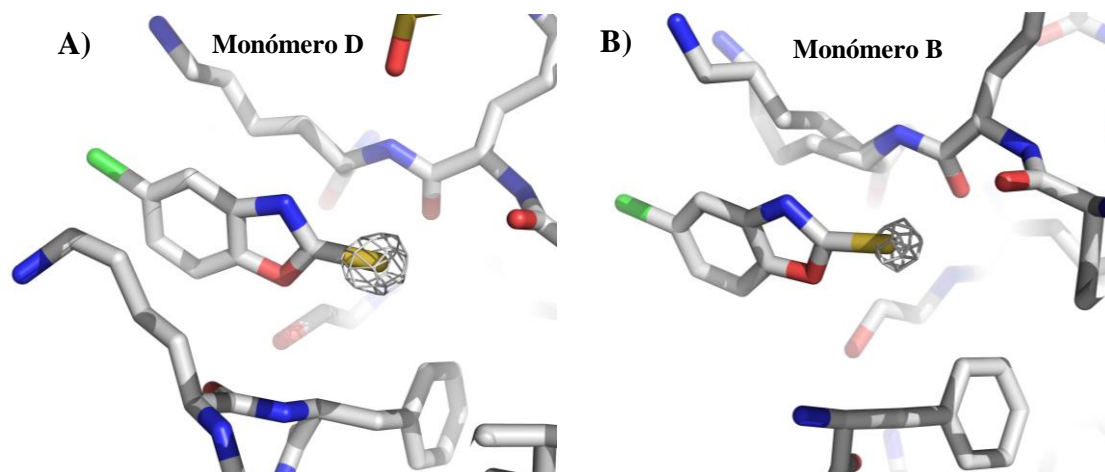


Figura 31. Mapa de densidad electrónica de diferencia anómalo del fragmento CMBX. A) Mapa en malla gris contorneado a 5σ donde se aprecia la señal anómala del Azufre del CMBX. B) Mismo mapa contorneado a 5σ .

Se observaron sólo dos picos de densidad electrónica en el mapa de diferencia anómalo: el del Azufre del CMBX y el de la metionina de la proteína (Figura 32).

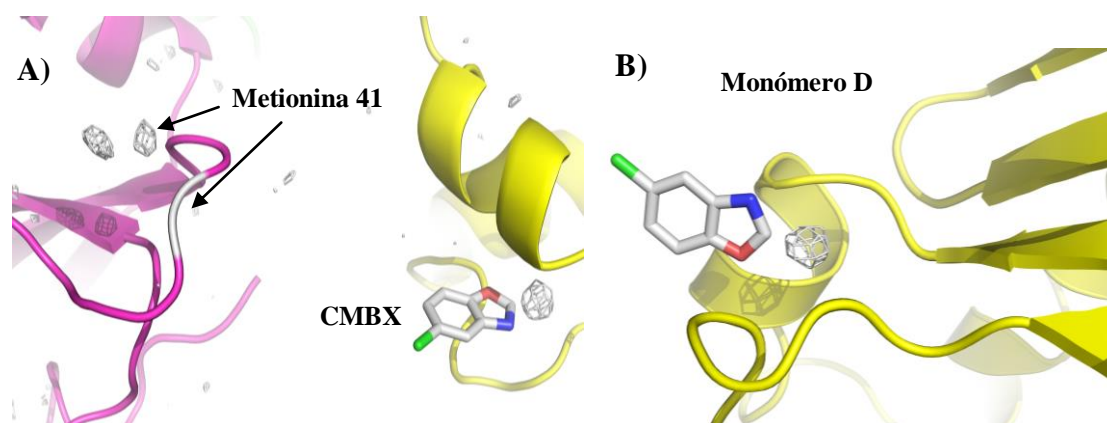


Figura 32. Mapa de densidad electrónica de diferencia del complejo proteína P y fragmento CMBX. A) Se aprecia la densidad electrónica del átomo de Azufre del CMBX y del azufre de la metionina de la cadena vecina. B) Contorneado a 3.5σ . Modelo en el cual se eliminó el Azufre del CMBX para corroborar su presencia. Se sometió a una ronda de afinamiento una vez que se eliminó el átomo de azufre del modelo.

Interacción del fragmento CMBX en el sitio de unión

Utilizando el programa Coot, se analizó el sitio de unión en busca de interacciones que pudieran explicar el modo de unión del CMBX con la proteína P. Las distancias tomadas en cuenta para el análisis del microambiente del fragmento se fijaron desde 2.2 hasta 3.8 Å como rango de distancias aceptables correspondientes a diversos tipos de interacciones intermoleculares. El resultado del análisis visual fue de al menos 2 interacciones putativas que involucran a los residuos Lys90, Lys53 y Ser93.

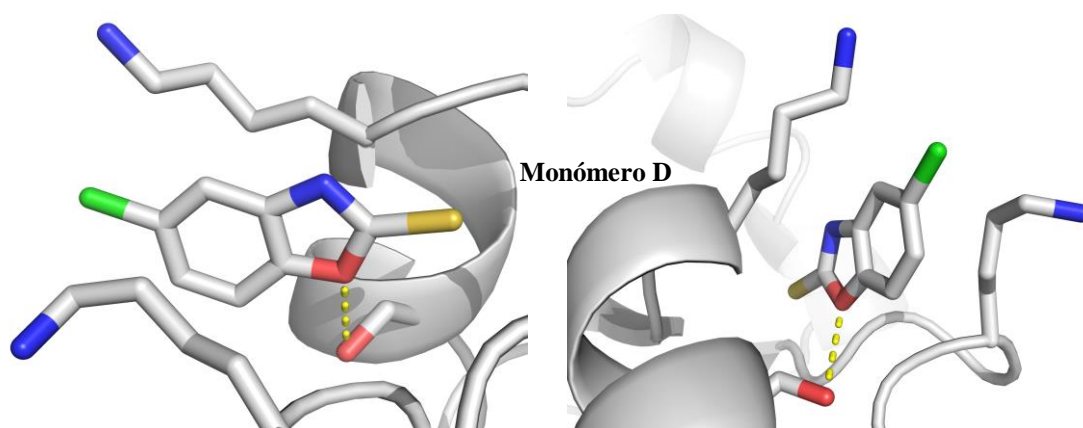


Figura 33. Dos vistas de la interacción del fragmento CMBX con la proteína P. El átomo de Oxígeno del CMBX está formando un puente de hidrógeno con el residuo Ser93 ya que la distancia de 3.2 Å satisface el rango para una interacción de este tipo.

La serina 93 está interaccionando mediante un enlace puente de hidrógeno con el Oxígeno 8 del fragmento CMBX (Figura 33), ya que la distancia interatómica O-O corresponde a 3.2 Å.

La lisina 53 y la lisina 90 están involucradas en una interacción tipo apilamiento con el anillo bencénico del CMBX (Figura 34).

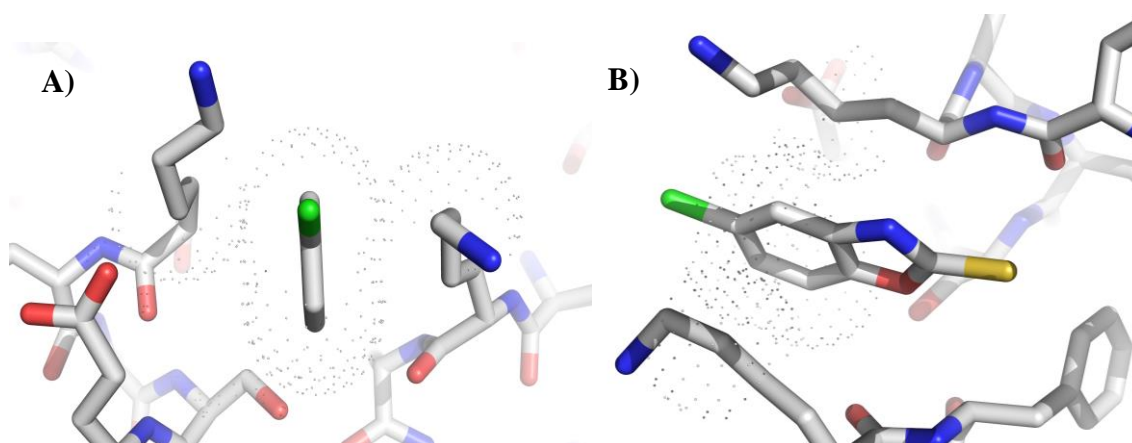


Figura 34. Interacción putativa de apilamiento entre el anillo bencénico y residuos K90 y K53. A) Vista frontal del sitio de unión. B) Vista superior del fragmento en el sitio de unión. Monómero D.

DISCUSIÓN

1) El fragmento CMBX se une en una zona de interacción con el extremo 5' líder del pre-tRNA

De acuerdo a la estructura cristalográfica de la holoenzima de la RNasa P bacteriana de Reiter *et al* (2010), se observa la subunidad proteica en complejo con un segmento de 5 fosfatos del extremo cortado 5' líder del pre-tRNA en la zona del surco identificado por Stams *et al* (1998).

El extremo 5' líder no se modeló con los nucleótidos correspondientes ya que no fue posible observar su densidad electrónica por la baja resolución a la que fue resuelta la parte de proteína a 4.2 Å, por lo que sólo se determinó la posición relativa de los 5 fosfatos que comprenden la longitud de 5 bases del líder (Figura 35).

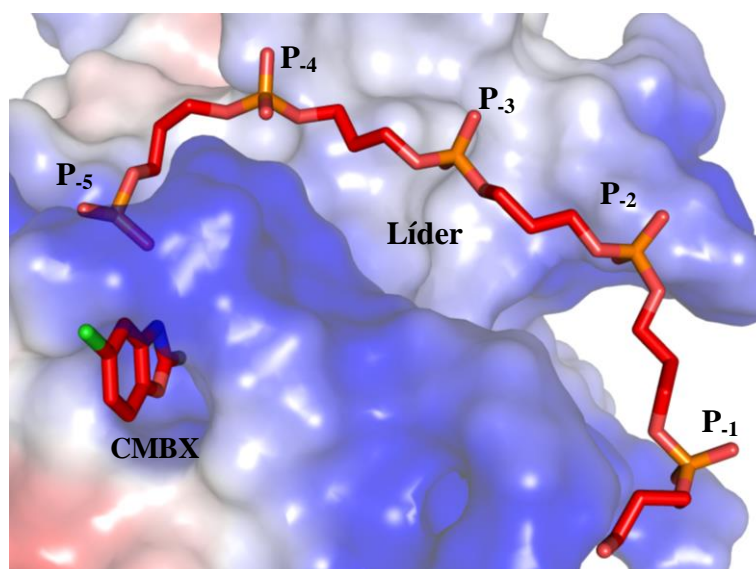


Figura 35. Modelo de potencial electrostático de la proteína P con el extremo 5' líder y el fragmento CMBX. P.₁ a P.₅ indican la posición de los fosfatos del extremo 5' líder.

Al analizar visualmente con el programa de modelado molecular COOT las interacciones del fragmento con su ambiente molecular, se observa que este compuesto está interactuando mediante 2 mecanismos diferentes, uno con las lisinas 53 y 90 y otro con la serina 93 de la cavidad donde se unió (Figura 33 y 34).

Una de estas interacciones es la de apilamiento de las dos lisinas con el anillo aromático del compuesto (Figura 34). Es muy interesante el hecho de que el compuesto observado por cristalografía es muy parecido estructuralmente a una purina, en específico es análogo a la guanina a juzgar por el anillo aromático unido a un ciclopentadieno. Esta observación concuerda con predicciones anteriores (Koutmou *et al*, 2010).

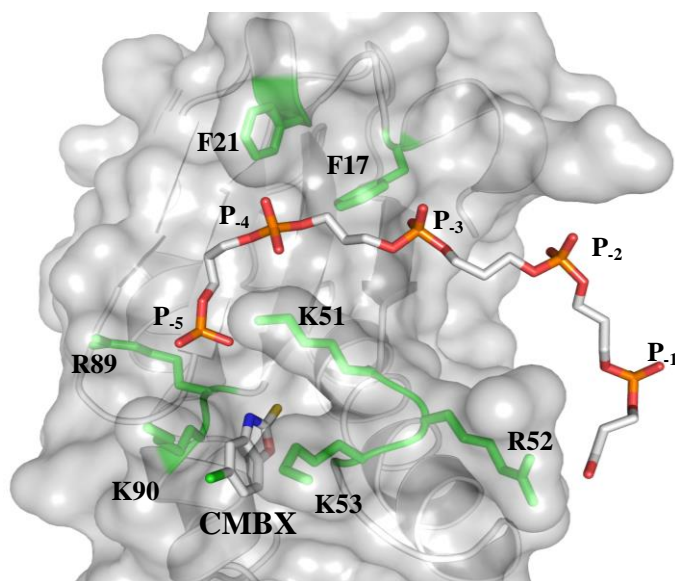


Figura 36. Residuos clave para la estabilización del extremo 5' líder y fragmento CMBX en complejo con la proteína P. En color verde, se muestran los residuos clave que se encargan de estabilizar el extremo 5' líder (fosfatos P.₁ a P.₅) y cuyas mutaciones afectan la actividad de RNasa P. Se observan los residuos K53 y K90 entre los cuales se observó el fragmento CMBX.

En un muy reciente estudio en paralelo en el que se combina mutagénesis dirigida con cinéticas de una sola reacción, demuestran que ciertas mutaciones puntuales tienen efectos perjudiciales en la eficiencia catalítica de la RNasa P bacteriana de *T. maritima* (Reiter *et al.*, 2012).

En particular, demuestran que los residuos K53 Y K90 son importantes en la actividad de la RNasa P bacteriana (Reiter *et al.*, 2012), y dichos residuos coinciden con los que nosotros observamos mediante cristalografía de rayos X que se encuentran flanqueando al fragmento CMBX formando una interacción de apilamiento.

Por comparación con la holoenzima silvestre de la RNasa P, las mutaciones puntuales F21A, K53A y K90A redujeron sustancialmente la eficiencia catalítica de la holoenzima de la RNasa P (Figura 36). Estos residuos están posicionados dentro de la región de unión del pre-tRNA de la proteína y lejos del sitio activo (de 17 a 28 Å lejos del fosfato reactivo).

En base a la estructura del complejo ternario (Figura x), es probable que estos residuos hagan contactos o estén cerca de los nucleótidos N.₄ y N.₅ del líder del pre-tRNA, donde K53 y K90 están posicionados en el extremo del esqueleto de fosfatos del pre-tRNA.

Análisis de cinética una sola reacción de las mutantes puntuales K53A y K90A demuestra la importancia de las interacciones de unión de la proteína-N.₄ y N.₅ ya que revelan que una red de contactos proteína-pre-tRNA lejos del sitio activo juega un papel integral en el reconocimiento del sustrato y la eficiencia catalítica.

Por otra parte, las mutaciones puntuales F17A, R89A causaron severos defectos catalíticos, reduciendo la actividad de 13-20 veces. R89 el cual se piensa que hace contactos con N.₅, se encuentra adyacente a los residuos K53 y K90. Los efectos perjudiciales de la mutación de F17A y R89A sugieren que interacciones en las

posiciones N₄ y N₅ son esenciales para el posicionamiento preciso y unión del sustrato.

Las interacciones colectivas de los residuos R89, F17, F21, K90 y K53 participan en apilamiento hidrofóbico específico de bases y en la formación de una intrincada red de puentes de hidrógeno que conectan la unión del sustrato a la catálisis en el sitio activo localizado aproximadamente 20 Å.

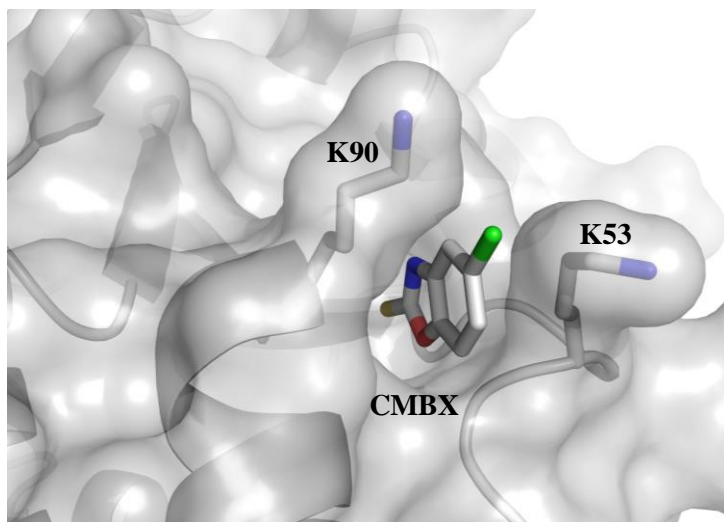


Figura 37. Fragmento CMBX flanqueado por las lisinas 53 y 90 que forman la cavidad donde se unió.

2) Comparación estructural de la proteína P nativa con la estructura de la proteína P en complejo con el fragmento CMBX

Al analizar y estudiar con detenimiento el sitio de unión del compuesto, se observó que interactúa en una zona previamente identificada como cavidad hidrofóbica mediante el mapeo de cavidades *drogables* (Figura 38) con el software MAESTRO (Schrödinger Inc.) y fue observado en una región en la que se encuentra flanqueado por dos lisinas (K53 y K90) que forman parte de los residuos conservados en el dominio bacteria y que interactúan con fosfatos 5 y 4 del extremo 5' líder del pre-tRNA según Reiter *et al* (2012).

Tabla 5. Valores B de la proteína nativa, su derivado y fragmento CMBX.

Valor B de la proteína nativa (Å²)	21.9
Wilson plot estimated B factor (Å²)	19.1
Valor B de la proteína con fragmento (Å²)	25.1
Wilson plot estimated B factor (Å²)	22.6
Valor B promedio del fragmento CMBX (Å²)	45.7

Tabla 6. Valores B del fragmento CMBX.

Átomo	Valor B (\AA^2)	Ocupación
Cloro-1	71.28	1.00
Carbono-2	56.36	1.00
Carbono-3	49.99	1.00
Carbono-4	48.54	1.00
Nitrógeno-5	47.41	1.00
Carbono-6	37.80	1.00
Azufre-7	30.87	1.00
Oxígeno-8	40.43	1.00
Carbono-9	27.67	1.00
Carbono-10	48.65	1.00
Carbono-11	43.72	1.00

Ya que el valor B para todo el fragmento es casi el doble que el valor B para la proteína nativa indica que el fragmento CMBX está interactuando con la proteína P con una afinidad baja, sin embargo, esta es una observación que se esperaba ya que es la naturaleza de la metodología del diseño de fármacos basado en fragmentos que en la primera etapa del escrutinio de bibliotecas de fragmentos se encuentren hits con baja afinidad y que no es sino hasta etapas subsecuentes de optimización del fragmento mediante enfoques estructurales cuando se obtiene una afinidad mucho más alta que la observada en un inicio (Tabla 6).

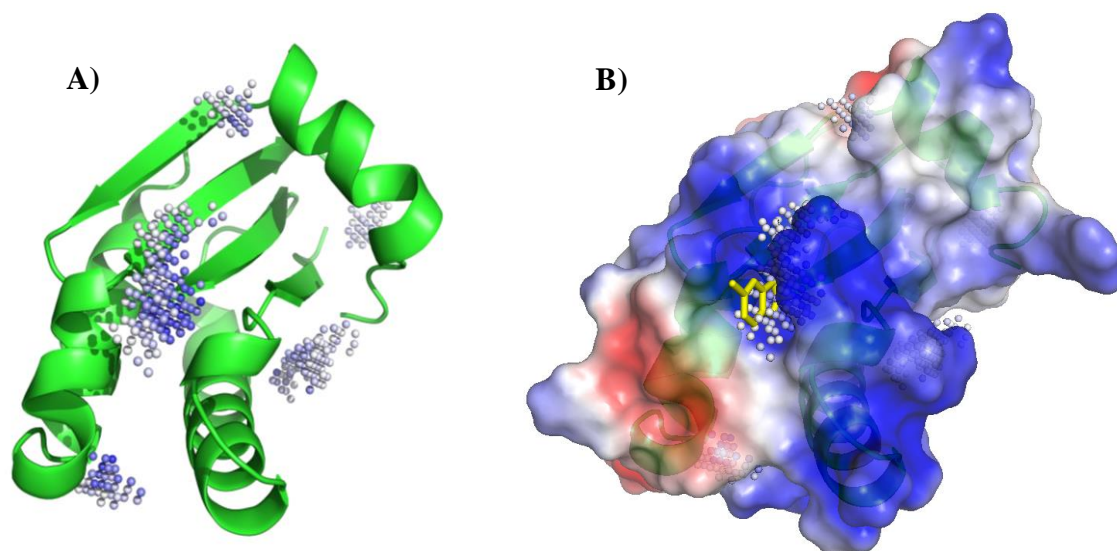


Figura 38. Mapeo de cavidades hidrofóbicas *drugables*. **A)** Se muestran 5 cavidades hidrofóbicas capaces de albergar un compuesto de bajo peso molecular (o cavidades *drugables*) mediante análisis de MAESTRO. **B)** Modelo de superficie con potencial electrostático donde se muestra la cavidad previa detectada donde se unió el fragmento CMBX en amarillo.

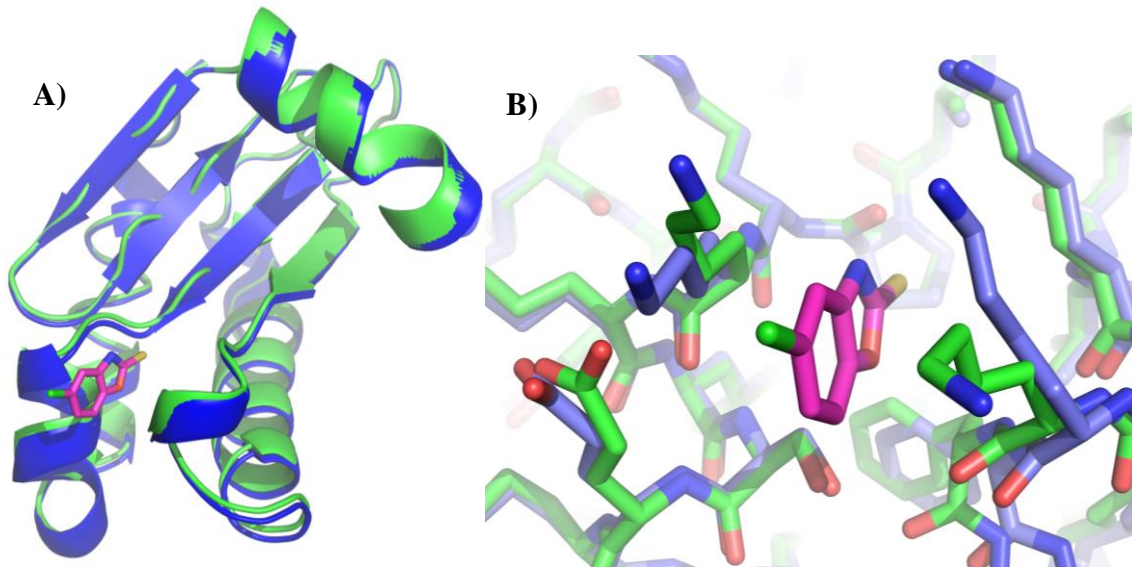


Figura 39. Sobreposición de proteína P nativa y remojada en fragmento. A) En verde proteína remojada y en color azul la proteína nativa; en rosa, se observa el fragmento CMBX en el sitio de unión. B) sobre posición del sitio de unión donde se aprecian las diferencias de las cadenas laterales de la estructura nativa (azul) y la estructura remojada con fragmento (verde).

Con el objeto de conocer los puntos en los que ambas estructuras están variando o son diferentes, se llevó a cabo un análisis de la variación de cada residuo de la proteína acomplejada con fragmento con respecto a la proteína nativa comparando por sobreposición tridimensional de las estructuras con ayuda del servidor 3dSS (<http://cluster.physics.iisc.ernet.in/3dss/>) (Sumathi *et al*, 2006, Figura 41).

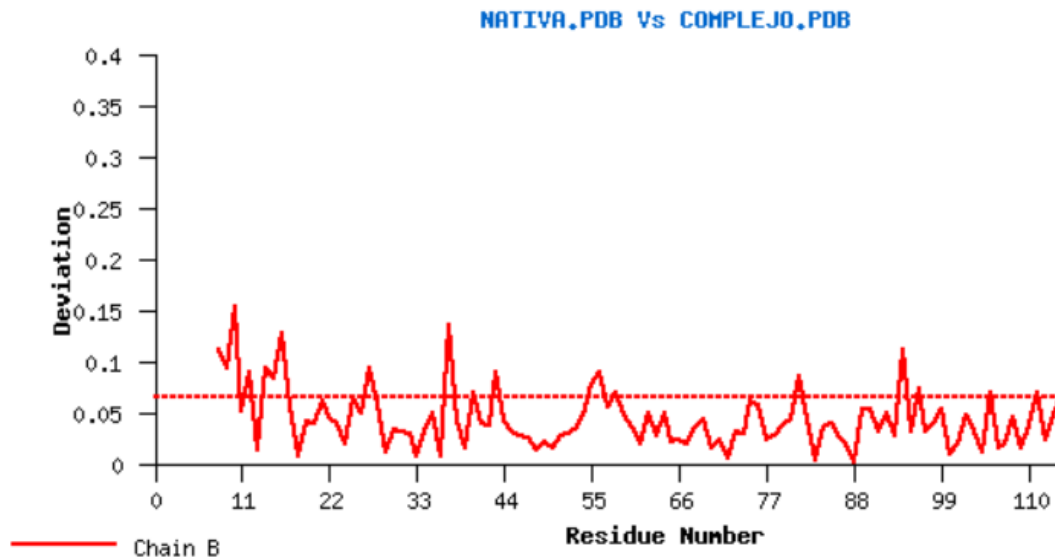


Figura 40. Desviación de residuos del complejo con respecto a la proteína P nativa. Eje Y: desviación en Å. Eje X: posición de los residuos de la proteína P. La línea punteada corresponde a la desviación global de 0.068 Å. La longitud del alineamiento fue de 110 residuos. Prácticamente no hay variación en las estructuras.

3) Presencia de otros fragmentos candidatos dentro de la biblioteca ZenobiaTM

Existen varios otros fragmentos dentro de la biblioteca ZenobiaTM que se parecen al fragmento CMBX. Varios de ellos cristalizaron con la proteína P pero no difractaron, algunos otros no cristalizaron, y algunos otros cristalizaron y difractaron pero a una baja resolución. Algunos otros cristales se dañaron o destruyeron durante el remojo.

Estos otros fragmentos que no se conocieron en esta etapa son interesantes y prometedores para evaluar la unión de éstos a la proteína P y ampliar el abanico de fragmentos candidatos susceptibles de ser optimizados a molécula tipo fármaco.

Es muy importante hacer hincapié de que el hecho de que en la presente tesis de investigación solo se encontrara el fragmento 5-Cloro-2-Mercaptobenzoxazol, no excluye a los demás fragmentos que no se observaron unidos pues es lo que se obtuvo de acuerdo a la historia del proyecto y es necesario buscar las condiciones en que éstos se pueden unir, además el hecho de encontrar el CMBX sirvió como un punto de partida en la metodología experimental que demuestra que sí se pueden unir fragmentos a la proteína P.

En cuanto a los cristales que no se dañaron, se difractaron, se determinó su estructura y no se encontró ningún fragmento unido es muy posible que estos fragmentos monitoreados no tengan la suficiente afinidad por la proteína P, o bien, que no se haya llevado a cabo la cocrystalización y remojo a una mayor concentración de estos fragmentos. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que las condiciones no hayan sido las adecuadas

Por otro lado, en la compañía Sigma-Aldrich se cuenta con varios compuestos tipo fármaco cuya característica es que contienen al menos un núcleo estructural idéntico al fragmento CMBX. Dichos compuestos tipo fármaco pueden ser útiles en futuros escrutinios de cristalización para obtener complejos de proteína unida a fragmentos evolucionados para continuar con la optimización del compuesto candidato.

Conclusión

A la luz de los experimentos realizados, y los resultados obtenidos hasta esta etapa del proyecto de investigación, es posible concluir que:

- Fue detectado mediante cristalografía la unión del fragmento 5-Cloro-2-Mercaptobenzoxazol, en la subunidad proteica de la RNasa P bacteriana de *Thermotoga maritima* y se encuentra en una cavidad donde es flanqueado por los residuos altamente conservados lisina 53 y lisina 90.

Perspectivas

En base a las conclusiones obtenidas, se han planteado las siguientes perspectivas:

1. Encontrar las condiciones en las que el CMBX mejora su unión y tiene una ocupación mayor que las encontradas.
2. Obtener cristales de proteína P mediante el escrutinio con compuestos parecidos al fragmento CMBX dentro de la biblioteca Zenobia.
3. Obtener cristales de proteína P mediante el escrutinio con aquellos cocteles de fragmentos en los que no se observaron cristales en las condiciones estudiadas y en aquellos cocteles de fragmentos en los que el cristal se dañó y no fue posible determinar su estructura.
4. Determinar la estructura de los complejos proteína-fragmento derivados de los escrutinios de los dos puntos anteriores.
5. Optimizar el ligando mediante evolución del fragmento.
6. Realizar ensayos de actividad de la RNasa P en presencia de fragmentos. En el laboratorio ya se montaron por el Ing. Carlos Díaz Tufinio.

Referencias

- Adams, P. D., *et al* (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst.*, **D66**: 213-221.
- Baker, Monya (2013). Fragment-based lead discovery grows up. *Nature Reviews, Drug Discovery, News & Analysis*, **12**: 5-7.
- Bamborough, P. *et al* (2011) Selectivity of Kinase Inhibitor Fragments. *J. Med. Chem.*, **54(14)**: 5131–5143.
- Bollag, G. *et al.* (2010) Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*, **467**: 596–599.
- Burley, S. K. (2004) Structure-Guided Drug Discovery Using Fragment Based Lead Identification/Lead Optimization. *Kesytone Symposium on Structural Genomics, Snowbird, UT, USA*.
- DeLano, W. L. The PyMOL molecular graphics system. (<http://pymol.org>) (2002).
- Emsley, P., Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crysta.* **D60**: 2126-2132.
- Evans, P. R. (2005) Scaling and assessment of data quality. *Acta Cryst.*, **D62**: 72-82
- Frank, D.N., Pace, N.R. (1998) RIBONUCLEASE P: Unity and Diversity in a tRNA Processing Ribozyme. *Annual Review of Biochemistry*. **67**: 153-180.
- Guerrier-Takeda, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. & Altman, S. (1983) The RNA moiety of Ribonuclease P Is the Catalytic Subunit of the Enzyme. *Cell*, **35**: 849-857.
- Guo, X., *et al* (2006) RNA-dependent Folding and Stabilization of C5 Protein During Assembly of the *E. coli* RNase P Holoenzyme. *J. Mol. Biol.*, **360**: 190-203.
- Hajduk, P. J. and Greer, J. (2007) A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nature Reviews, Drug Discovery*, **6**: 211-219.
- Hassel, A. M., *et al* (2007) Crystallization of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographic Section D Biological Crystallography*, **63**: 72-79.
- Henkels, C. H., *et al* (2001) Linked Folding and Anion Binding of the *Bacillus subtilis* Ribonuclease P Protein. *Biochemistry*, **40**: 2777-2789.
- Hernández-Cid, A., *et al.* (2012) Ribonucleases P/MRP and the expanding ribonucleoprotein world. *IUBMB LIFE*, **64 (4)**: 521-528.
- Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Cryst.*, **D66**: 125-132.
- Kazantsev, A. V., *et al* (2003) High-resolution structure of RNase P protein from *Thermotoga maritima*. *PNAS*. **100(13)**: 7497-7502.
- Koutmou, K. S., *et al* (2010) Protein-Precursor tRNA Contact Leads to Sequence-Specific Recognition of 5' Leaders by Bacterial Ribonuclease P. *J Mol Biol.*, **396(1)**: 195–208.

- Krivenko, A., *et al* (2002) Expression, purification, crystallization and preliminary diffraction analysis of RNase P protein from *Thermotoga maritima*. *Acta Cryst.*, **D58**: 1234-1236.
- Kranz, J. K. and Schalk-Hihi, C. (2011) Protein thermal shifts to identify low molecular weight fragments. *Methods in Enzymology*, **493**: 277-298.
- Kurz, J. C. and Fierke, C. A. (2000) Ribonuclease P: a ribonucleoprotein enzyme. *Curr. Op. Chem Biol.*, **4(5)**: 553-558.
- Leslie, A. G. W. and Powell, H. R. (2007) Evolving Methods for Macromolecular Crystallography. *NATO Science Series*. **245**: 41-51.
- Liu, F., Altman, S. (2010) Ribonuclease P. Protein Reviews. *Springer Science Business Media, LLC*. **10**: 235-256.
- McCoy, A. J. *et al* (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.*, **40**: 658-674.
- Murray, C. W. and Blundell, T. L. (2010) Structural biology in fragment-based drug design. *Curr. Op. in Struc. Biol.*, **20**: 497-507.
- Nienaber *et al* (2000) Discovering novel ligands for macromolecules using X-ray crystallographic screening. *Nature Biotechnology*, **18**: 1105-1108.
- Niesen, F. H., *et al*. (2007) The use of differential scanning fluorometry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*, **2 (9)**: 2212-2221.
- Pantoliano, M. W., *et al*. (2001) High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *Journal of Biomolecular Screening*, **6 (6)**: 429-430.
- Reiter, N., *et al* (2010) Structure of bacterial Ribonuclease P Holoenzyme in complex with tRNA. *Nature*, **468**: 784-791.
- Reiter, N., *et al* (2012) The bacterial ribonuclease P holoenzyme requires specific, conserved residues for efficient catalysis and substrate positioning. *Nucl. Ac. Res.*, 1-10.
- Sebahia, M., *et al*. (2006) The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nature Genetics*, **38**: 779 – 786.
- Skubak, P., *et al* (2004) Direct incorporation of experimental phase information in model refinement. *Acta Cryst.*, **D60**: 2196-2201.
- Smith, J.K., Hsieh, J., Fierke, C.A. (2007) Importance of RNA-protein Interactions in Bacterial Ribonuclease P Structure and Catalysis. *Biopolymers*. **87(5-6)**: 321-338.
- Sumathi, K. *et al* (2006) 3dSS: 3-Dimensional Structural Superposition. *Nucl. Ac. Res.*, **34**: 128-134.
- Torres-Larios, A., *et al* (2006) Structure of ribonuclease P – a universal ribozyme. *Current opinion in Structural Biology*, **16**: 327-335.
- Tsai, J., *et al* (2008) Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *PNAS*, **105(8)**: 3041-3046.
- Wlodawer, A., *et al*. (2007) Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures. *FEBS*, **275**: 1-21.

Apéndice 1.

Discusión suplementaria. Experimentos que se realizaron y que no funcionaron.

1. Experimentos individuales de cocrystalización y remojo en cocteles de fragmentos.

Dentro de los métodos más usados para obtener cristales acomplejados con algún ligando ya sea natural o sintético se encuentra la cocrystalización y el remojo de cristal. Ambos métodos se llevaron a cabo y se compararon los resultados. La cocrystalización depende en gran medida de la temperatura, de la concentración de proteína, la concentración del ligando, el uso de aditivos para mejorar la unión del ligando entre otros, siendo el de la cocrystalización el método más empleado cuando los compuestos son bastante insolubles o la proteína se agrega muy fácil (Hassell *et al*, 2006).

El remojo de cristales con ligandos es por lo general el método de elección para obtener cristales de complejos proteína-ligando debido a la facilidad inherente del método. Sin embargo, existen muchos factores a considerar. Los cristales pueden ser frágiles y destruirse así que se puede emplear un buffer estabilizante. El tiempo de remojo y la concentración de inhibidor necesitan ser optimizados.

En cuanto a la técnica de remojo de cristales, Nienaber *et al* (2000) pusieron de manifiesto la metodología del remojo para encontrar ligandos novedosos que sirvieran como punto de partida para el diseño de fármacos para diversos blancos proteicos. De igual manera en 2004, la compañía *Structural Genomix Pharmaceuticals* desarrolló un sistema de alto rendimiento tipo remojo que ha sido muy exitoso (Burley *et al*, 2004). Es importante tomar en cuenta que a pesar de que la metodología del remojo de cristal en ligando sea la más preferible, no es recomendable intentar un sólo método sino validar también mediante cocrystalización ya que el rango completo de conformaciones que puede adoptar una proteína al remojarse en ligandos puede no ser detectado (Hassell *et al*, 2006).

Los experimentos de sólo remojo con cocteles de fragmentos de los cristales nativos, resultaron en el daño y destrucción de los cristales nativos.

En cuanto a los experimentos de cocrystalización, se obtuvieron demasiados cristales falsos positivos y se propiciaba la formación de cristales de sal, en particular cristales de sulfato debido al aditivo par cristalización sulfato de Potasio, lo cual no permitió detectar cristales de proteína y diferenciarlos de los cristales de sal.

Debido a estas observaciones experimentales, se intentó combinar ambas técnicas aplicando primero cocrystalización seguido de un remojo en coctel de fragmentos (véase *Métodos. Cocrystalización y remojo de la proteína P en coctel de fragmentos*).

2. Experimentos de cocrystalización a diferentes concentraciones de DMSO.

Para llevar a cabo la búsqueda de fragmentos de una manera sistemática, se usó la biblioteca ZenobiaTM (Nienaber *et al*, 2000), que se compone de 352 compuestos (también denominados fragmentos) de bajo peso molecular (<300 Da), agrupados y clasificados en columnas con 8 moléculas de acuerdo a forma y tamaño molecular.

Para realizar esta búsqueda, los fabricantes de la biblioteca recomiendan disolver el stock de fragmento en 50 µL de DMSO al 100% con el fin de obtener una concentración final de 200 mM por cada fragmento, por lo que en un inicio se procedió a realizar experimentos de cocrystalización de la proteína P en presencia de diferentes concentraciones de DMSO (5 – 20%) y evaluar su comportamiento en este solvente y determinar la viabilidad de futuros experimentos de cocrystalización en presencia de fragmentos disueltos en DMSO.

Sin embargo, al probar la cristalogénesis de la proteína P, no se observaron cristales aún después de un mes a concentraciones tan bajas de DMSO como lo son 5%. Debido a estas observaciones, se procedió a liofilizar los fragmentos para remover el solvente DMSO y probar disolverlos en PEG-400 100%, solvente que es muy afín a las condiciones nativas de cristalización como lo es el PEG-1000 y el cual logró disolver todos los fragmentos de la biblioteca ZenobiaTM.

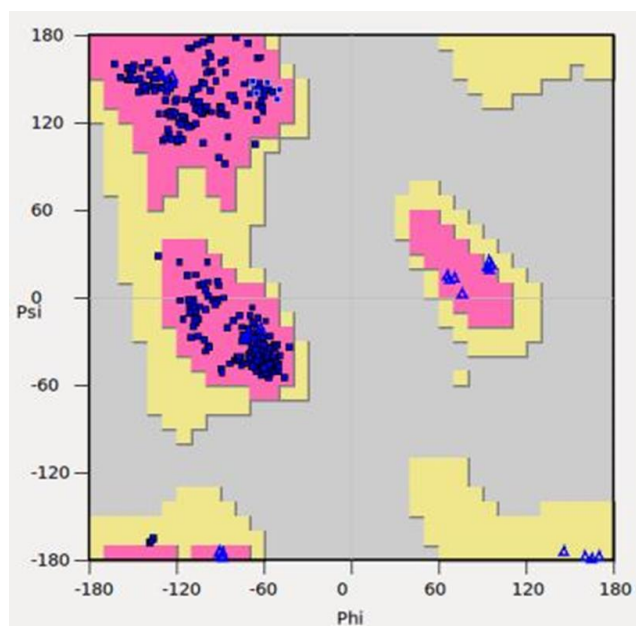
3. Experimentos de microsiembra (*microseeding*)

Con el fin de obtener cristales de calidad mejorada y de acuerdo a anteriores experimentos de cristalización exitosos (Krivenko *et al*, 2002) se llevaron a cabo experimentos de microsiembra.

Sin embargo, se encontraron dificultades técnicas ya que durante la microsiembra se observó la formación de muchos cristales pequeños de sal debido a que se incrementó la concentración de sulfato de potasio en la solución madre para proteger los cristales durante el rompimiento, lo que impidió el monitoreo sistemático del crecimiento de nuevos cristales de proteína P nativa al formar muchos cristales de sulfato con el mismo hábito cristalino que los cristales observados para la proteína P nativa.

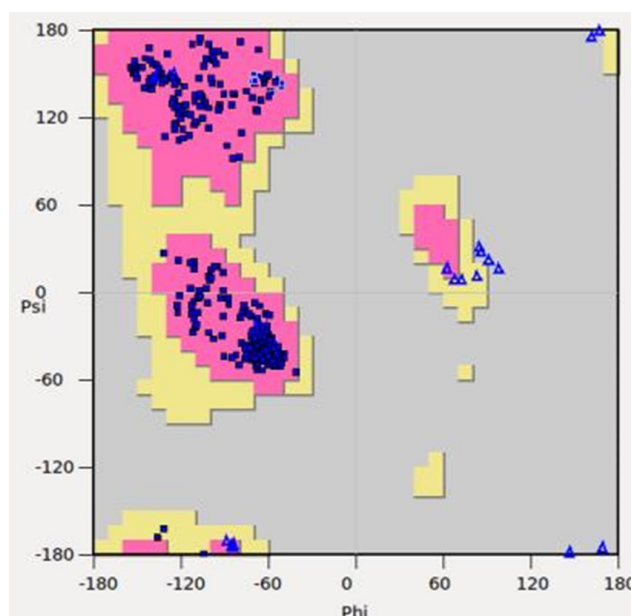
Apéndice 2.

Mapa de Ramachandran de la proteína P nativa y en complejo.



	Aminoácidos	Porcentaje
Regiones preferentes	392	98.74 %
Regiones permitidas	5	1.26 %
Regiones prohibidas	0	0.00 %

Figura 41. Gráfico de Ramachandran de la proteína P nativa.



	Aminoácidos	Porcentaje
Regiones preferentes	354	99.16 %
Regiones permitidas	3	0.84 %
Regiones prohibidas	0	0.00 %

Figura 42. Gráfico de Ramachandran de la proteína P en complejo con el fragmento CMBX.

Apéndice 3.

Conservación de la secuencia de la proteína P bacteriana.

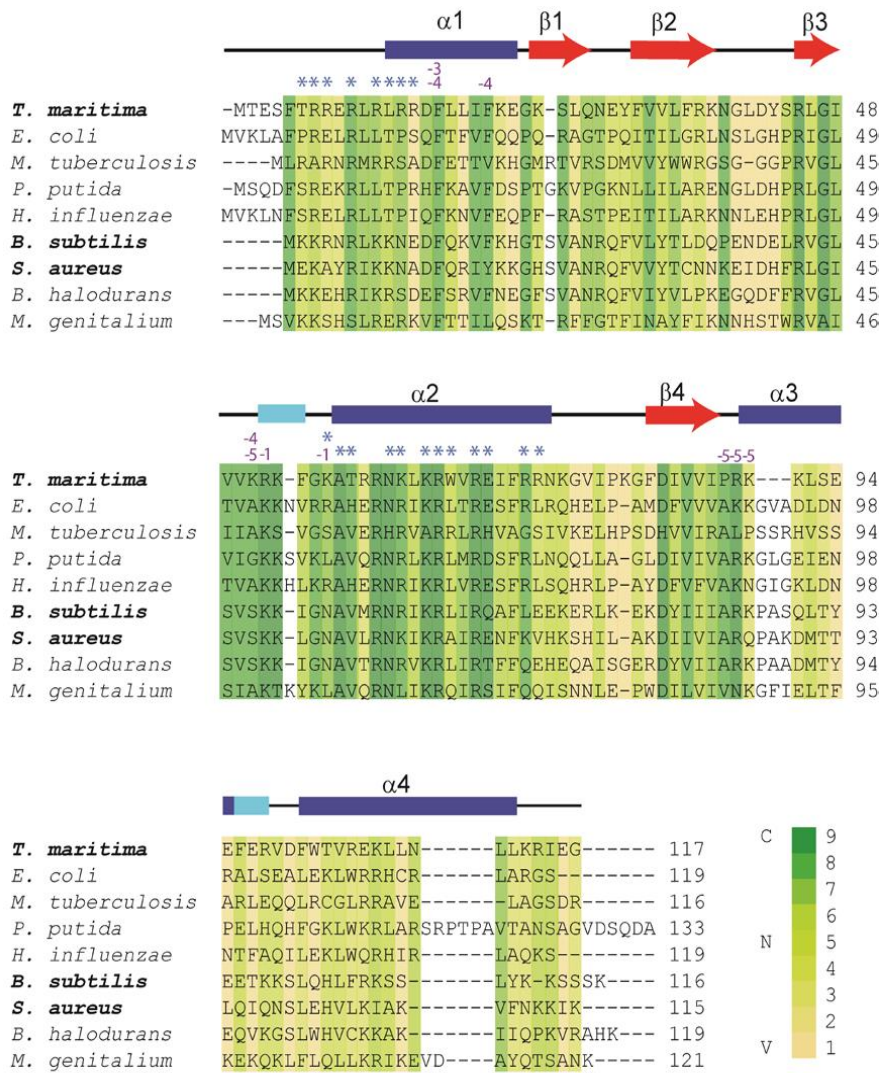


Figura 43. Alineamiento de secuencia de la subunidad proteica de la RNasa P de varias bacterias. Tomado de Reiter *et al* (2010).

Apéndice 4.

Biblioteca de fragmentos Zenobia™

Se muestra de las cuatro placas de 96 pocillos que corresponden a la biblioteca Zenobia. Los números indican las claves con las que se identifica a cada fragmento y los cuales se listan después del esquema de la placa 4.

Por ejemplo, el primer coctel de 4 fragmentos fue constituido mezclando los compuestos en los pocillos A1, B1, C1 y D1 de la placa #1; para el segundo coctel de 4 fragmentos se usaron los compuestos en los pocillos E1, F1, G1 y H1 y así sucesivamente.

En color rojo se muestra el hit obtenido en este trabajo identificado como el número 10, de la placa 1 y la posición del pocillo es el A1. Asimismo, se muestra en color rojo en la lista de los compuestos.

Placa 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4	10	23	25	26	73	28	17	75	27	32	37
B	6	13	24	68	69	99	74	29	102	78	79	80
C	7	19	71	90	97	218	100	101	270	103	106	109
D	8	20	72	96	204	274	259	269	279	271	281	296
E	12	91	89	119	220	287	275	278	292	280	282	320
F	22	143	93	219	249	391	289	290	399	400	335	402
G	77	191	209	250	393	394	395	398	424	427	401	429
H	411	412	413	414	417	418	419	422	426	602	428	446

Placa 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	38	39	40	31	42	44	45	48	49	50	30	56
B	110	84	87	41	196	201	82	83	184	244	131	247
C	214	9	125	126	200	862	206	217	252	256	246	261
D	326	215	328	199	329	408	387	313	389	396	260	421
E	336	327	405	406	407	445	409	410	425	430	415	431
F	403	404	449	450	451	452	464	465	468	470	591	864
G	447	448	535	543	545	547	550	604	581	583	615	676
H	529	530	537	557	580	587	588	629	605	614	702	717

Placa 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6	57	173	267	212	272	273	357	358	356	370	371
B	262	265	266	312	268	305	316	441	442	443	652	582
C	303	308	435	437	438	439	440	462	463	627	628	669
D	432	434	584	585	622	623	635	625	626	680	699	686
E	546	589	600	601	633	634	693	642	696	725	701	716
F	563	609	621	630	691	692	749	695	748	740	763	764
G	687	688	689	690	757	758	759	760	761	762	785	786
H	782	784	726	791	804	805	807	808	817	818	819	820

Placa 4

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	372	373	478	698	723	724	739	746				
B	861	647	694	705	733	738	745	747				
C	703	675	708	709	742	744	765	771				
D	707	718	731	732	766	769	772	773				
E	729	730	754	750	796	801	802	803				
F	787	788	789	790	809	863	813	814				
G	792	793	794	795	826	860	834	835				
H	821	823	828	827	848	850	851	852				

**Lista de todos los fragmentos que componen la biblioteca
Zenobia**

ID	Fragment
4	2-amino-6-bromopurine
6	isonipecotamide
7	4-bromobenzamide
8	5-bromouracil
9	5,5-dibromobarbituric acid
10	5-Chloro-2-Mercaptobenzoxazole
12	4-aminopyrimidine
13	2,4-diaminopyrimidine
17	4-amino-6-mercaptopyrazolo[3,4-d]pyrimidine
19	5-bromoindole
20	5-methylbenzimidazole
22	1-aminoisoquinoline
23	4-azabenzimidazole
24	1,3-phenylenediamine
25	1,2-phenylenediamine
26	1,4-phenylenediamine
27	3-aminophenol
28	4-aminophenol
29	2-aminophenol

30	Resorcinol
31	Hydroquinone
32	catechol
37	4-Aminopyridine
38	3-Aminopyridine
39	2-Aminopyridine
40	4-Hydroxypyridine
41	2-Hydroxypyridine
42	3-Hydroxypyridine
44	6-amino-3-picoline
45	2-amino-6-methylpyridine
48	2-amino-4-picoline
49	3-hydroxy-2-methylpyridine
50	2-hydroxy-3-methylpyridine
54	2,6-diaminopyridine
56	2,3-dihydroxypyridine
57	2,4-dihydroxypyridine
68	indole-2-carboxylic acid
69	indole-6-carboxylic acid
71	5-hydroxyindole-2-carboxylic acid
72	5-hydroxyindole-2-carboxylic acid
73	5-fluoroindole-2-carboxylic acid
74	indazole
75	5-aminoindazole
77	benzimidazole
78	2-methylbenzimidazole
79	2-aminobenzimidazole
80	2-amino-1-methylbenzimidazole
82	5-chlorobenzimidazole
83	5-benzimidazolecarboxylic acid
84	5-amino-2-(trifluoromethyl)benzimidazole
87	diaminopurine
89	6-chloropurine
90	2-amino-6-chloropurine
91	1,8-diaminonaphthalene
93	3-amino-2-naphthol
96	1,5-dihydroxynaphthalene
97	1,6-dihydroxynaphthalene
99	2,6-dihydroxynaphthalene
100	2,7-dihydroxynaphthalene
101	1,7-dihydroxynaphthalene
102	6-aminoquinoline
103	8-aminoquinoline
106	6-hydroxyquinoline
109	5-quinolinol

110	4-quinolinol
119	4-quinolinecarboxylic acid
125	quinazoline
126	2-benzoxazoline
131	2-amino-4-methylthiazole
143	2-amino-4-chlorobenzothiazole
173	3-furoic acid
184	4-bromo-1h-imidazole
191	1-pipidinecarboxamide
196	2-(trifluoromethyl)benzimidazole
199	7-chloroquinaldine
200	2-chloro-4-methylquinoline
201	6-chloro-2-methylquinoline
204	4-bromoisquinoline
206	lumazine
209	benzhydroxamic acid
212	4(3H)pyrimidone
214	1,3-diiminoisoindole
215	3-iminoisoindolinone
217	2-methyl-4(3H)-quinazoline
218	tolazoline
219	3-aminobenzamidine dihydrochloride
220	benzamidine hydrochloride hydrate
244	isatin
246	5-methylisatin
247	1-methylisatin
249	6-chlorooxindole
250	5-chloroisatin
252	chromone
256	4-oxo-4H-1-benzopyran-2-carboxylic acid
259	6-bromo-2-methylchromone
260	6-methylcoumarin
261	7-methylcoumarin
262	4-hydroxycoumarin
265	4-hydroxy-6-methylcoumarin
266	6-hydroxy-4-methylcoumarin
267	4-methylumbelliferone
268	6,7-dihydroxycoumarin
269	3-chlorocoumarin
270	coumarin-3-carboxylic acid
271	7-hydroxycoumarinyl-4-acetic acid
272	7-amino-4-(trifluoromethyl)coumarin
273	7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)coumarin
274	benzenesulfonamide
275	o-toluenesulfonamide

278	4-fluorobenzenesulfonamide
279	2-chlorobenzenesulfonamide
280	4-chlorobenzenesulfonamide
281	4-sulfamoylbenzoic acid
282	naphthalene-2-sulfonamide
287	4'-aminoacetophenone
289	3'-aminoacetophenone
290	3'-hydroxyacetophenone
292	4'-hydroxyacetophenone
296	2-chloroacetophenone
303	3-acetylindole
305	2-acetylpyrrole
308	4-methoxyindole
312	1-acetylimidazole
313	p-anisidine
316	4-methoxyphenol
320	2-methoxy-5-methylaniline
326	5-amino-2-methoxyphenol
327	2-methoxyhydroquinone
328	5-methoxyresorcinol
329	3-fluoro-p-anisidine
335	2-amino-4-methoxy-6-methylpyrimidine
336	2-chloro-4-methoxypyrimidine
356	1,4-cyclohexanedione
357	1,3-cyclohexanedione
358	1,2-cyclohexanedione
370	1,4-cyclohexanediol
371	5-methyl-1,3-cyclohexanedione
372	2-methyl-1,3-cyclohexanedione
373	glutarimidine
387	4-aminobenzonitrile
389	3-aminobenzonitrile
391	formanilide
393	3,4-diaminotoluene
394	2,6-diaminotoluene
395	4-methyl-1,3-phenylenediamine
396	3-aminobenzyl alcohol
398	2-amino-4-methylphenol
399	3-amino-2-methylphenol
400	4-amino-3-methylphenol
401	4-amino-2-methylphenol
402	5-amino-2-methylphenol
403	3-methylcatechol
404	orcinol
405	methylhydroquinone

406	4-methylcatechol
407	2-methylresorcinol
408	1,2,4-benzenetriol
409	phloroglucinol
410	pyrogallol
411	6-hydroxypicolinic acid
412	2-hydroxynicotinic acid
413	6-hydroxynicotinic acid
414	2-hydroxy-3-nitropyridine
415	5-acetyl-2-methoxypyridine
417	2-hydroxy-4-methyl-3-nitropyridine
418	2-methoxy-5-nitropyridine
419	citrazinic acid
421	2,6-lutidine-alpha2,3-diol
422	3-hydroxy-2-nitropyridine
424	2-bromo-3-pyridinol
425	2-amino-4,6-dimethylpyridine
426	2-amino-5-nitropyridine
427	2-amino-3-nitropyridine
428	2-amino-4-methyl-5-nitropyridine
429	2-amino-4-methyl-3-nitropyridine
430	2-amino-3-bromo-5-methylpyridine
431	2-amino-5-bromo-3-methylpyridine
432	2,3-diamino-5-bromopyridine
434	2-amino-4,6-dimethylpyrimidine
435	2,4-dimethyl-6-hydroxypyrimidine
437	2,4,6-triaminopyrimidine
438	6-methyluracil
439	2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine
440	4-hydroxy-2-mercapto-6-methylpyrimidine
441	2-amino-4-chloro-6-methylpyrimidine
442	2-thiobarbituric acid
443	2,6-diamino-4-chloropyrimidine
445	5-nitroindole
446	2-methyl-5-nitroindole
447	6-nitroindazole
448	5-nitroindazole
449	5-nitrobenzimidazole nitrate salt
450	5-nitroquinoline
451	8-nitroquinoline
452	5-nitroisoquinoline
462	1,4-benzodioxan-6-carboxaldehyde
463	2-hydroxymethyl-1,4-benzodioxan
464	1,4-benzodioxan-6-yl methyl ketone
465	1,4-benzodioxan-5-carboxylic acid

468	1,2,3,4-tetrahydro-3-isoquinolinecarboxylic acid
470	4-chloro-7-nitrobenzofurazan
478	DL- α -Hydroxy- β,β -dimethyl- γ -butyrolactone
529	3-hydroxybenzoic acid
530	4-hydroxybenzoic acid
535	phenylpyruvic acid
537	4-nitrocatechol
543	sodium p-toluenesulfinate hydrate
545	3-Hydroxyphenylacetic acid
546	3-methoxybenzamide
547	4-Hydroxyphenylacetic acid
550	3-(4-Aminophenyl)propionic acid
557	3-Aminobenzoic acid
563	4-bromobenzyl alcohol
580	3,4-Dihydroxybenzoic acid
581	3,4-Dihydroxyphenylacetic acid
582	3,4-(Methylenedioxy)phenylacetic acid
583	Homovanillic acid
584	5,6-Dimethylbenzimidazole
585	2-Amino-5,6-dimethylbenzimidazole
587	2,4-Dihydroxybenzoic acid
588	2-Hydroxy-4-methoxybenzoic acid
589	Methyl 2,4-dihydroxybenzoate
591	α -Methylhydrocinnamic acid
600	4-Fluorobenzamidoxime
601	2,4-Difluorobenzamide
602	3,4-Difluorobenzamide
604	3-Fluoro-4-hydroxybenzoic acid
605	3-Fluoro-4-methoxybenzoic acid
609	1-Cyanoacetylpiperidine
614	3-Amino-2-methylbenzoic acid
615	3-Amino-4-methylbenzoic acid
621	3,4-Dimethoxyphenylacetic acid
622	4-Hydroxybenzaldehyde
623	4-Hydroxy-3-methylbenzaldehyde
625	2,4-Dihydroxybenzaldehyde
626	3,4-Dihydroxybenzaldehyde
627	4-Hydroxybenzamide
628	4-Methoxybenzamide
629	<i>p</i> -Coumaric acid
630	Hydrocinnamic acid
633	3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid
634	Methyl 3-(4-hydroxyphenyl)propionate
635	3-(4-Methoxyphenyl)propionic acid
642	3-Iodobenzoic acid

647	Dopamine hydrochloride
652	(+/-)- α -Lipoic acid
669	6-Methylnicotinamide
675	2,3-Pyridinedicarboxylic acid
676	6-Methyl-2,3-pyridinedicarboxylic acid
680	1,4-Bis(acryloyl)piperazine
686	Methyl 4-aminobenzoate
687	4-Amino-3-methylbenzoic acid
688	4-(Methylamino)benzoic acid
689	3,4-Diaminobenzoic acid
690	4-Hydrazinobenzoic acid
691	4-Amino-3-hydroxybenzoic acid
692	4-Aminosalicylic acid
693	4-(Dimethylamino)benzoic acid
694	4-Nitrobenzoic acid
695	4-Amino-3-methoxybenzoic acid
696	4-Amino-2-chlorobenzoic acid
698	4-Acetamidobenzoic acid
699	Methyl 4-nitrobenzoate
701	4'-Bromoacetophenone
702	5-Bromo-1-indanone
703	4'-Bromopropiophenone
705	2,6-Pyridinedicarboxylic acid
707	2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl alcohol
708	2,3,4,5,6-Pentafluorobenzoic acid
709	(\pm)- α -Methyl-2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl alcohol
716	Phthalic acid
717	4-Phenylimidazole
718	3-(<i>p</i> -Tolyl)propionic acid
723	2-Mercaptonicotinic acid
724	2-(Methylthio)nicotinic acid
725	2-Quinolinecarboxaldehyde
726	8-Hydroxy-2-quinolinecarboxaldehyde
729	Salicylic acid
730	5-Methylsalicylic acid
731	2-Methoxybenzoic acid
732	4-Methylsalicylic acid
733	3-Methylsalicylic acid
738	2-Fluoro-6-hydroxybenzoic acid
739	5-Fluorosalicylic acid
740	4-Nitrobenzenesulfonamide
742	Salicylhydroxamic acid
744	2-Aminobenzyl alcohol
745	2-Amino-3-methylbenzyl alcohol
746	2-Amino-5-methylbenzyl alcohol

747	2-Nitrobenzyl alcohol
748	2-Amino-5-chlorobenzyl alcohol
749	2-Thiopheneacetic acid
750	2-Thiopheneglyoxylic acid
754	<i>trans</i> -Cinnamic acid
757	6-Aminobenzothiazole
758	2-Aminobenzothiazole
759	2-Hydroxybenzothiazole
760	2-Amino-4-methylbenzothiazole
761	2-Amino-6-methylbenzothiazole
762	2-Methyl-5-benzothiazolol
763	2-Hydrazinobenzothiazole
764	2-Amino-6-fluorobenzothiazole
765	6-Nitrobenzothiazole
766	2-Amino-6-chlorobenzothiazole
769	Acetaminophen
771	5-Fluorouracil
772	<i>N</i> -Phenylthiourea
773	(4-Fluorophenyl)thiourea
782	Benz[<i>cd</i>]indol-2(1 <i>H</i>)-one
784	5-Acenaphthenecarboxylic acid
785	6-Amino-3,4-dihydro-1(2 <i>H</i>)-naphthalenone
786	5-Hydroxy-1-tetralone
787	6-Hydroxy-3,4-dihydro-1(2 <i>H</i>)-naphthalenone
788	1,5-Dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalene
789	5,6,7,8-Tetrahydro-2-naphthoic acid
790	1,2,3,4-Tetrahydro-2-naphthoic acid
791	2-Acetyl-1-tetralone
792	1,3-Indandione
793	7-Hydroxy-1-indanone
794	6-Hydroxy-1-indanone
795	4-Hydroxy-1-indanone
796	5-Hydroxy-1-indanone
801	1,2-Indandione-2-oxime
802	Indan-2-carboxylic acid
803	7-Hydroxy-4-methyl-1-indanone
804	1-Indanone-6-carboxylic acid
805	3-Oxo-1-indancarboxylic acid
807	2-Acetyl-1,3-indanedione
808	Ninhydrin
809	5-Amino-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline
813	7-Hydroxy-3,4-dihydro-2(1 <i>H</i>)-quinolinone
814	6-Methoxy-1,2,3,4-tetrahydroquinoline
817	4,4'-Dihydroxybiphenyl
818	2-Phenylhydroquinone

819	2,2'-Biphenol
820	Biphenyl-2-carboxylic acid
821	Biphenyl-4-carboxylic acid
823	4-(4-Chlorophenyl)-4-hydroxypiperidine
826	1-(4-Hydroxyphenyl)piperazine
827	1-(2-Hydroxyphenyl)piperazine
828	1-(3-Hydroxyphenyl)piperazine
834	1-(4-Nitrophenyl)piperazine
835	1-Acetyl-4-(4-hydroxyphenyl)piperazine
848	3-Acetylthiophene
850	2-Thiophenecarboxamide
851	2-Thiophenecarboxylic acid
852	3-Thiophenecarboxylic acid
860	3',4'-Dichloroacetophenone
861	4-Amino-1-Boc-piperidine
862	5-Chloro-1-indanone
863	1H-Indole-2-methanol
864	1,2,3,4-Tetrahydro-9H-pyrido[3,4-b]indole
