



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ENSAYO DE ALTO RENDIMIENTO PARA EL DISEÑO DE FÁRMACOS
BASADO EN FRAGMENTOS DE INHIBIDORES DE LA RNASA P
BACTERIANA**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
Maestro en Ciencias

PRESENTA

Carlos Alejandro Díaz Tufinio

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Alfredo Torres Larios

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Nuria Sánchez Puig

Instituto de Química, UNAM

Dr. Enrique Rudiño Piñera

Instituto de Biotecnología, UNAM

MÉXICO, D. F.

Noviembre 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.



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.

Of. No. PMDCB/501/2013

CARLOS ALEJANDRO DÍAZ TUFINIO
Alumno (a) de la Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

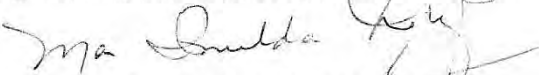
Los miembros del Subcomité Académico, en reunión ordinaria del día 10 de Junio del presente año, conocieron su solicitud de ASIGNACION de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUIMICA), con la tesis titulada "**Ensayo de alto rendimiento para el diseño de fármacos basados en fragmentos de inhibidores de la RNasa P bacteriana**", dirigida por el Dr. Alfredo Torres Larios.

De su análisis se acordó ratificar al jurado asignado:

PRESIDENTE	Dr. Armando Gómez Puyou
VOCAL	Dra. Marcela Lilian Varela Gómez
VOCAL	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
VOCAL	Dr. Alejandro Sosa Peinado
SECRETARIO	Dra. Nora Andrea Gutiérrez Nájera

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de Junio de 2013.
LA COORDINADORA DE ENTIDAD



DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR

C.c.p. Archivo

MILV*lgg



Dedicatoria

A mis padres, por ser ejemplos insuperables a seguir en todos los sentidos. A mi papá, por ser un ser humano admirable y por ponerme esos estándares tan altos en lo personal y profesional. A mi mamá, que simplemente no tengo palabras para expresarle mi admiración y agradecerle por todo lo que ha hecho por la familia.

A Manuel, por siempre recordarme que el cerebro tiene un hemisferio derecho y que conectarlos es complicado, pero posible. La vida es reto tras reto... *go for your dreams!*.

A Pili, por recordarme que la experiencia es más importante que cualquier cosa y que la vida siempre se debe afrontar con entereza.

A Cinthya, por su compañía, apoyo, amor, y por todo lo que hemos compartido durante este tiempo – *somewhat difficult* -, pero de gran crecimiento y desarrollo mutuo. Más aún, gracias de antemano por los años cada vez mejores que están por venir....

A toda mi familia, a los presentes y ausentes (abuelos, tíos, primos, agregados políticos y culturales), por permitir formar una verdadera gran FAMILIA.

A mis amigos, brillantes mentes y excéntricas personalidades, que me permiten explotar todas mis pasiones (ciencia, música, entre otras), y que en medio de desvaríos filosóficos, risas y acaloradas discusiones, se han gestado – y se seguirán gestando – grandes ideas y nuevos proyectos.

A todos los que han confiado en mí - ¡y a los que no también! -, ya que me han permitido aprender y vivir con pasión cada paso que doy. Siempre trabajaré para no defraudarlos y nunca dejaré de aprender de todas las situaciones y las personas que se crucen en mi camino.

A todos ustedes, a los que se me escapan de la memoria, y a los éxitos, pero sobre todo a los intentos fallidos, ya que sin estos este pequeño gran esfuerzo – y todos los que están por venir – no tendrían tantas satisfacciones, y yo no sería quien soy...

Thank you all for the music of my life

Agradecimientos

A la Unidad de Proteómica Médica del Instituto Nacional de Medicina Genómica, especialmente a la Dra. Marcela Varela Gómez, por su apoyo y disponibilidad para el uso del espectrofluorómetro para placas multipozo DTX 880 XS Multimode Detector (Beckman Coulter) para realizar los ensayos de alto rendimiento.

Al Dr. Armando Gómez Puyou, por permitirme el uso del espectrofluorómetro RF5000U (Shimadzu) y por sus valiosos comentarios y discusiones científicas.

Al laboratorio 122-Norte (Dr. Félix Recillas Targa), por la disposición para el uso del equipo de PCR en Tiempo Real Step One (Applied Biosystems).

A mi comité tutorial (Dres. Nuria Sánchez Puig y Enrique Rudiño Piñera), por sus comentarios tan enriquecedores y por aportar su experiencia y conocimiento a mi proyecto y a mi formación a lo largo de la maestría.

A mis sinodales y jurado de examen (Dres. Armando Gómez Puyou, Nora Andrea Gutiérrez Nájera, Marcela Varela Gómez, Rogelio Rodríguez Sotres y Alejandro Sosa Peinado), por su disposición y valiosos comentarios para redondear este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 205-Sur (Sergio, Annia, Igor, Nancy, Aaron, Alex, Armando y Daniel), a la Dra. Adelaida Díaz Vilchis, al Instituto de Fisiología Celular, y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme esta oportunidad de estar en un ambiente tan favorable para la investigación y la ciencia.

Y finalmente al Dr. Alfredo Torres Larios, por su aguda crítica y formativa asesoría durante este importante periodo de mi vida, así como por todas las lecciones científicas y las de vida; sin duda, la ciencia se construye con escepticismo y pruebas irrefutables. Gracias por la confianza, por todas las oportunidades, y por reafirmar en mí la honestidad, el entusiasmo y por hacer de mí mi más acérrimo crítico. *Once you've told me that, and I haven't forget it till now, thank you!....*

Resumen

La RNasa P, ribozima ubicua y esencial por catalizar el extremo 5'-líder del pre-tRNA, es un blanco farmacológico atractivo ante los problemas de resistencia bacteriana a antibióticos. La metodología analítica para medir la actividad de este RNA catalítico es, actualmente, un cuello de botella para el descubrimiento de inhibidores. En este trabajo se plantea el diseño y optimización de un novedoso ensayo, no tóxico, de actividad de RNasa P mediante un sustrato fluorescente. El presente diseño permitió una caracterización preliminar de la ribozima de *Thermotoga maritima*, así como la optimización del ensayo en alto rendimiento en volúmenes de 60µl y concentraciones de ribozima tan bajas como 20nM. Este sustrato mínimo, con menor afinidad a la RNasa P que el sustrato canónico, representa una ventaja por incrementar la sensibilidad del método ante compuestos con una modesta actividad inhibitoria.

En adición, esta misma sonda de RNA puede ser visualizada directamente en gel de poliacrilamida por sus propiedades fluorescentes intrínsecas, lo cual permite validar los resultados obtenidos por el método de alto rendimiento. Además del tamizaje de dos bibliotecas de moléculas para la detección de inhibidores, en este proyecto se sientan las bases de un análisis térmico para monitorear la estabilidad del RNA y su unión a moléculas pequeñas mediante perfiles de fluorescencia.

Con ambos métodos, fue posible la identificación de moléculas con actividad inhibitoria, mismas que, aunque no resultaron específicas para la ribozima, abren el camino para el descubrimiento futuro de fármacos con la RNasa P como blanco terapéutico.

Palabras clave:

RNasa P, actividad enzimática, diseño de fármacos, alto rendimiento, fluorescencia

Abstract

RNase P, a ubiquitous and essential ribozyme that cleaves the 5'-leader sequence of tRNAs, is an attractive pharmacological target in the face of bacterial resistance to antibiotics. The lack of high-throughput analytical methods for measuring the activity of this catalytic RNA is a bottleneck for the discovery of inhibitory compounds. In this work, we describe the design and optimization of a novel, non-toxic activity assay for RNase P based on a small fluorescent substrate. This assay allows a preliminary characterization of the *Thermotoga maritima* ribozyme, as well as the high-throughput optimization in a 60µl volume and an RNase P concentration as low as 20nM. The reduced substrate, with less affinity to the ribozyme than the canonical substrate, means an advantage to increase method sensitivity for detecting potential candidate molecules with low inhibition properties.

Moreover, this substrate allows direct in-gel detection due to its intrinsic fluorescent properties, allowing the validation of results obtained through the high-throughput technique. Besides the screening of two fragment libraries for the detection of RNase P inhibitors, in this project the fundamentals of a thermal analysis for monitoring nucleic acids stability arise, as well as for small molecules binding screening to this macromolecule, assessed by fluorescent profiles.

With both methods, it was possible the identification of RNase P inhibitors, and although they are not specific for the ribozyme, it is a proof of the potential of this work for the future drug discovery targeting RNase P.

Keywords:

RNase P, enzyme activity, drug design, high-throughput, fluorescence

Contenido	Página
Dedicatoria	3
Agradecimientos.....	4
Resumen.....	5
Abstract.....	6
Lista de figuras.....	9
Lista de tablas	11
Abreviaturas	12
1. Introducción.....	13
a. RNasa P	13
i. Estructura y evolución	13
ii. P RNA	15
iii. Proteína P	16
iv. RNasa P holoenzima	18
v. Catálisis de la RNasa P y ensayo de actividad	20
vi. RNasa P como blanco farmacológico	22
b. Diseño de fármacos basado en fragmentos.....	29
i. Estrategia e impacto en la actualidad	29
ii. Características de los fragmentos.....	33
iii. Bibliotecas de fragmentos.....	35
c. Fluorescencia y FRET	35
2. Justificación e hipótesis.....	38
a. Objetivos.....	39
3. Materiales y métodos	40
a. Purificación de las subunidades de RNasa P.....	40
b. Reconstitución de la ribozima RNasa P	42
c. Ensayo enzimático de alto rendimiento para RNasa P.....	43
d. Ensayo térmico para RNA	51
4. Resultados y discusiones particulares.....	54
a. Reconstitución de RNasa P holoenzima y pruebas funcionales.....	54
b. Estandarización del ensayo de alto rendimiento para RNasa P	56
c. Selección de fragmentos potenciales para inhibición de RNasa P	61
d. Ensayo térmico de RNA. Diseño y resultados preliminares	65

e. Ensayo de actividad en gel para fragmentos	71
5. Discusiones generales y perspectivas.....	74
6. Conclusiones.....	81
7. Referencias.....	82
8. Anexos	88
Anexo 1. Ensayos de actividad de RNasa P en alto rendimiento para selección de inhibidores para la biblioteca Zenobia	88
i. Estrategia de selección de fragmentos de la biblioteca Zenobia.....	89
Anexo 2. Correlación de actividad en gel con ensayo HT para RNasa P con cocteles de fragmentos de biblioteca Zenobia	92
Anexo 3. Ensayos de actividad de RNasa P en alto rendimiento para selección de inhibidores para la biblioteca Maybridge	94
i. Estrategia de selección de fragmentos de la biblioteca Maybridge	94
ii. Ensayos con fragmentos potenciales individuales de Maybridge.....	97
iii. Ensayos con 4 concentraciones de fragmentos potenciales de Maybridge.....	99
Anexo 4. Publicaciones y presentaciones derivadas del presente proyecto.....	101
i. Manuscrito en preparación	101
ii. Cartel presentado en la Cuarta Muestra de Carteles del IFC.....	120

Lista de figuras

Fig. 1. Estructura de la RNasa P holoenzima	13
Fig. 2. Cladograma de la evolución de RNasa P en la filogenia.....	13
Fig. 3. Distribución de las subunidades proteicas de la RNasa P.	14
Fig. 4. Estructura secundaria consenso de la subunidad de RNA de la RNasa P.....	15
Fig. 5. Plegamiento y estructura tridimensional de las regiones conservadas de la subunidad de RNA de la RNasa P bacteriana.	16
Fig. 6. Proteína P de <i>T. maritima</i>	16
Fig. 7. Contactos polares de la proteína P con la subunidad P RNA	19
Fig. 8. El 5'-líder es estabilizado por la proteína P.....	19
Fig. 9. Acercamiento de la interacción P RNA, proteína P y 5'-líder	20
Fig. 10. Catálisis de la RNasa P.....	21
Fig. 11. Ensayo de actividad tradicional para RNasa P	22
Fig. 12. Mecanismos potenciales para inhibir la función de la RNasa P	24
Fig. 13. Diagrama mecanístico sobre los posibles pasos de interferencia de la función de RNasa P a través de distintos tipos de inhibidores.....	28
Fig. 14. Cavidades para la proteína P	28
Fig. 15. Estrategia de diseño de fármacos basado en fragmentos.	29
Fig. 16. Tendencia de las referencias científicas sobre el tema de los fármacos basados en fragmentos	33
Fig. 17. Fundamento de FRET propuesto para el ensayo de RNasa P	37
Fig. 18. Sustrato minihélice FRET propuesto en este proyecto	48
Fig. 19. Ensayo de desplazamiento térmico (thermal shift) de proteínas	52
Fig. 20. Comprobación de la actividad de RNasa P.....	54
Fig. 21. Cinética de actividad de RNasa P sobre el sustrato canónico pre-tRNA.....	55
Fig. 22. Actividad de RNasa P sobre el sustrato minihélice	55
Fig. 23. Estandarización del ensayo en placas multipozos	57
Fig. 24. Curva de calibración de concentración de sustrato.....	58
Fig. 25. Caracterización del efecto del DMSO sobre la actividad de RNasa P.....	58
Fig. 26. Caracterización de la actividad de la RNasa P por la estrategia de alto rendimiento. ...	60
Fig. 27. Ensayos individuales con fragmentos de la biblioteca Zenobia.....	62
Fig. 28. Espectros de fluorescencia de ácidos nucleicos asociados con bromuro de etidio	66
Fig. 29. Curvas de fluorescencia normalizada vs. temperatura del ensayo térmico para RNA...	67

Fig. 30. Ensayo de desnaturalización térmica de RNA con fragmentos de prueba..... 69

Fig. 31. Gel de actividad en punto final para RNasa P holoenzima con fragmentos derivados de la selección de la biblioteca Zenobia con el ensayo de alto rendimiento en tiempo real 73

Lista de tablas

Tabla 1. Inhibidores conocidos para actividad de RNasa P en organismos procariontes y eucariontes.....	25
Tabla 2. Comparación y características de los métodos de análisis de fragmentos.....	32
Tabla 3. Experimentos control para la estandarización del ensayo enzimático.....	46
Tabla 4. Resumen de las consideraciones para el diseño de la sonda FRET.....	50
Tabla 5. Parámetros cinéticos preliminares de la RNasa P holoenzima con el sustrato minihélice en diferentes concentraciones de $MgCl_2$	60
Tabla 6. Fragmentos de la biblioteca Maybridge con actividad inhibidora sospechada	63
Tabla 7. Cuadro comparativo de parámetros cinéticos reportados para RNasa P	75

Abreviaturas

AmOAc	Acetato de Amonio
BHQ	<i>Black Hole Quencher</i>
BrEt	Bromuro de etidio
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
CR	Región Conservada
Ctrl	Control
DFBF	Diseño de Fármacos Basado en Fragmentos
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Deoxiribonucleótidos Trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FRET	Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia
GST	Glutación-S-transferasa
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanosulfónico
HT	Alto Rendimiento (<i>High Throughput</i>)
HTS	Selección de Alto Rendimiento (<i>High Throughput Screening</i>)
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IU	Unidad Internacional
LB	Medio de lisogenia (<i>Lysogeny Broth</i>)
Mh	Minihélice
MW	Peso Molecular (<i>Molecular Weight</i>)
NIH	Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos
NP-40	Nonilfenoxi polietoxietanol
P RNA	Subunidad de RNA de la RNasa P
PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PDB	<i>Protein DataBase</i>
PEG	Polietilenglicol
pre-tRNA	Precursor de RNA de transferencia
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RNasa P	Ribonucleasa P
SPR	Resonancia de Plasmones Superficiales
T	Temperatura
TBE	Tris-Borato-EDTA
TH	Tris-HEPES
THAM	Tris-HEPES-Acetato de Amonio
TmP	Proteína P de <i>Thermotoga maritima</i>
TmR	P RNA de <i>Thermotoga maritima</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
tRNA	RNA de transferencia

1. Introducción

a. RNasa P

i. Estructura y evolución

La ribonucleasa P, RNasa P (Fig. 1), es un complejo ribonucleoproteico responsable de la maduración del extremo 5' de los tRNA (Liu, 2010). Esta ribozima cataliza la eliminación hidrolítica de la secuencia 5'-líder de los precursores del tRNA (pre-tRNA). A pesar de ser el pre-tRNA su sustrato natural, se ha asociado a la catálisis de

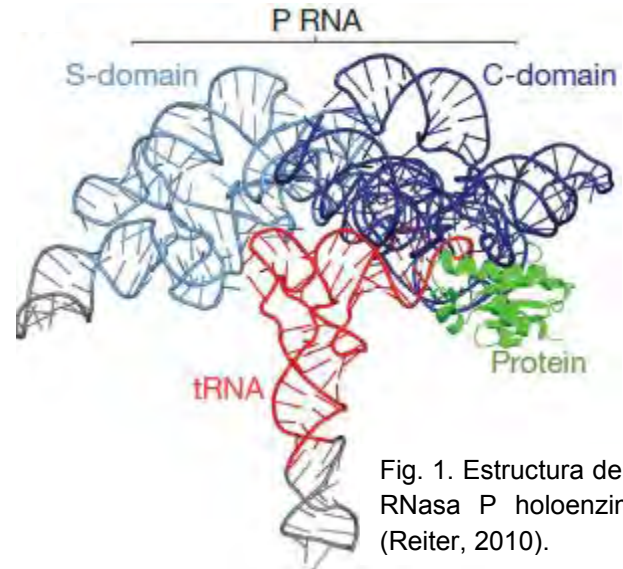


Fig. 1. Estructura de la RNasa P holoenzima (Reiter, 2010).

la RNasa P con algunos otros tipos de RNAs (Ver discusión sobre los diferentes sustratos en la sección *Diseño de sonda sustrato FRET*). En bacterias, la RNasa P consiste en una subunidad catalítica (P RNA) de entre ~300 y 450 nucleótidos (MW = 120,000-125,000 Da), 338 nucleótidos para *Thermotoga maritima*, y una subunidad proteica pequeña, denominada proteína P, de alrededor de 110 aminoácidos (MW = 14,000-17,500 Da) (*Escherichia coli*) (Reiter, 2011).

La ribozima RNasa P, además de ser indispensable para la viabilidad celular, es de interés particular en estudios de filogenia. La subunidad de RNA de esta ribozima se ha conservado en los tres dominios de la vida (Hernández-Cid, 2012), siendo la subunidad

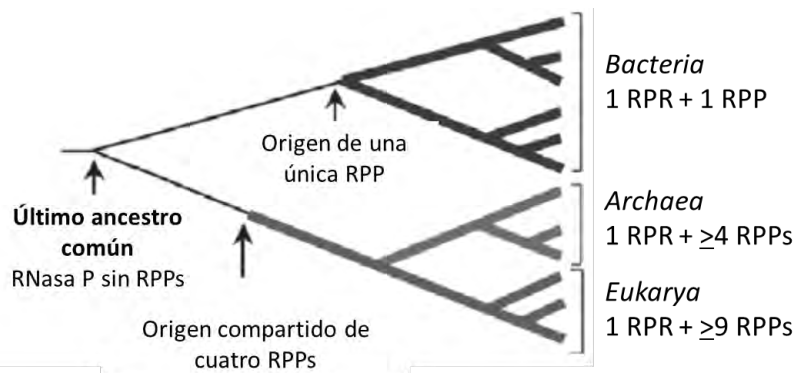


Fig. 2. Cladograma de la evolución de RNasa P en la filogenia (Modificado de Altman, 2011). RPR: Subunidad de RNA de la RNasa P; RPP: Subunidad proteica de la RNasa P.

catalítica principal (M1 RNA en bacterias, H1 RNA en humanos). Sin embargo, el requerimiento de subunidades proteicas llega a ser variable en los diferentes dominios filogenéticos. En eucariontes, la cantidad de estas subunidades llega a ser de 10

diferentes proteínas, con masas moleculares entre 14 y 115 kDa; sin embargo, aún no es comprendido el mecanismo y las propiedades que estas subunidades le otorgan (Altman, 2011).

Basándose en estas observaciones, se ha propuesto una distribución evolutiva de la RNasa P a lo largo de la evolución (Fig. 2), ya que existe homología estructural de algunas subunidades entre *eukarya* y *archaea* (Fig. 3). Además, este análisis evolutivo ha permitido sugerir que el ancestro común poseía una enzima funcional totalmente ribonucleica (Fig. 2), lo cual apoya la hipótesis del *mundo del RNA* (Evans, 2006). En la medida que se avanza en la línea evolutiva, los dominios divergen hacia organismos con RNasas P funcionales con sólo una subunidad de RNA y una o varias subunidades proteicas (Fig. 2, Fig. 3).

Sin embargo, en los últimos años se han encontrado diversas familias de proteínas con actividad de RNasa P en organismos eucariontes, denominadas PRORPs (por las siglas en inglés *Proteinaceous RNase P*), con actividad análoga a la ribozima en mitocondria humana (Walker, 2010), llamadas MRPPs (por *Mitochondrial RNase P Proteins*), y en cloroplastos y mitocondria de plantas (Gutman, 2012; Howard, 2012). Estos hallazgos sustentan actualmente una discusión sobre evolución respecto a la hipótesis del *mundo del RNA* basado en esta ribozima y su ramificación funcional en la línea filogenética. También actualmente se encuentra abierta la discusión acerca de la similitud estructural entre las macromoléculas con actividad de RNasa P, ya sean complejos RNA-proteína o de naturaleza completamente proteica (Gobert, 2013).

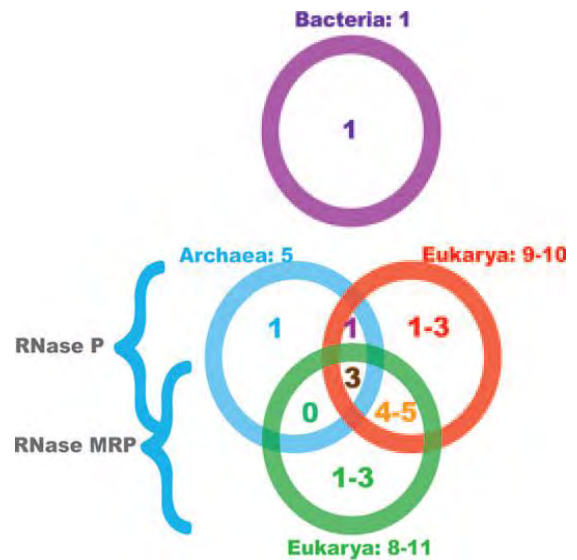


Fig. 3. Distribución de las subunidades proteicas de la RNasa P, según su homología en los distintos reinos de la vida (Hernandez-Cid, 2012). Los números indican la cantidad de subunidades compartidas por cada grupo.

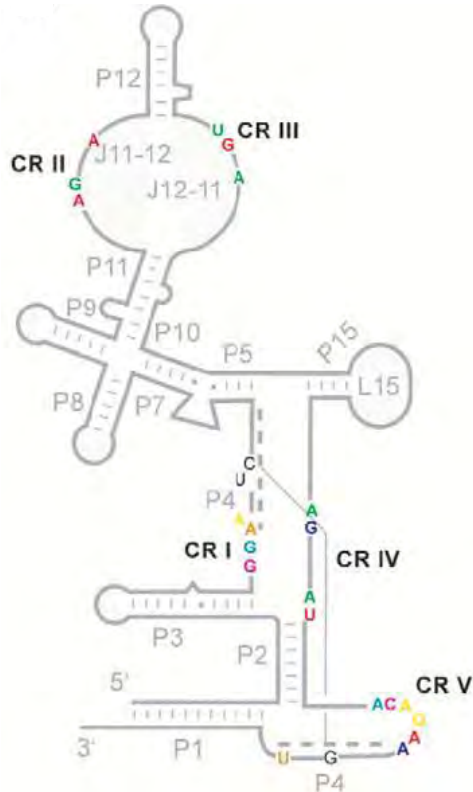


Fig. 4. Estructura secundaria consenso de la subunidad de RNA de la RNasa P (Torres-Larios, 2006). Las regiones conservadas (CR) se numeran y su papel se describe en el texto.

ii. P RNA

Desde el punto de vista estructural, la subunidad de RNA de la RNasa P bacteriana se ha clasificado en dos subtipos, A y B, los cuales tienen una misma estructura central, pero diferentes estructuras periféricas. Más del 90% de los P RNA son de tipo A, o ancestral, mientras que las bacterias Gram-positivas tienen el tipo B, de *Bacillus* (Pan, 2010). Esta diferenciación estructural evidencia la divergencia evolutiva de la RNasa P en los dominios de la vida, a pesar de que los análisis filogenéticos revelan conservación en esta ribozima.

La subunidad de RNA de la RNasa P se integra de dos dominios con plegamiento independiente, los cuales tienen funciones distintas. Por un lado, el dominio catalítico (*C-domain*; Fig. 1, en azul oscuro) contiene el sitio activo de la ribozima, donde también están los

nucleótidos requeridos para la unión del pre-tRNA y de la proteína P. Por otro lado, el dominio de especificidad (*S-domain*, Fig. 1, en azul claro) une a la región T tallo-asa del sustrato pre-tRNA, lo cual confiere a la ribozima una mayor especificidad por su sustrato.

La estructura secundaria de la molécula se conforma de tallos sencillos y coaxiales (P1/P4/P5, P2/P3 y P8/P9), que interactúan entre ellos debido a su plegamiento tridimensional, además de contar con cinco regiones conservadas (Fig. 4, CR-I a CR-V) en todos los organismos. La convergencia de las regiones II y III se han identificado por formar asas T para interacciones específicas con el tRNA (Fig. 5.B), mientras que las regiones I, IV y V forman el andamiaje para la región catalítica (Fig. 5.A) (Reiter, 2010; Mondragón, 2013).

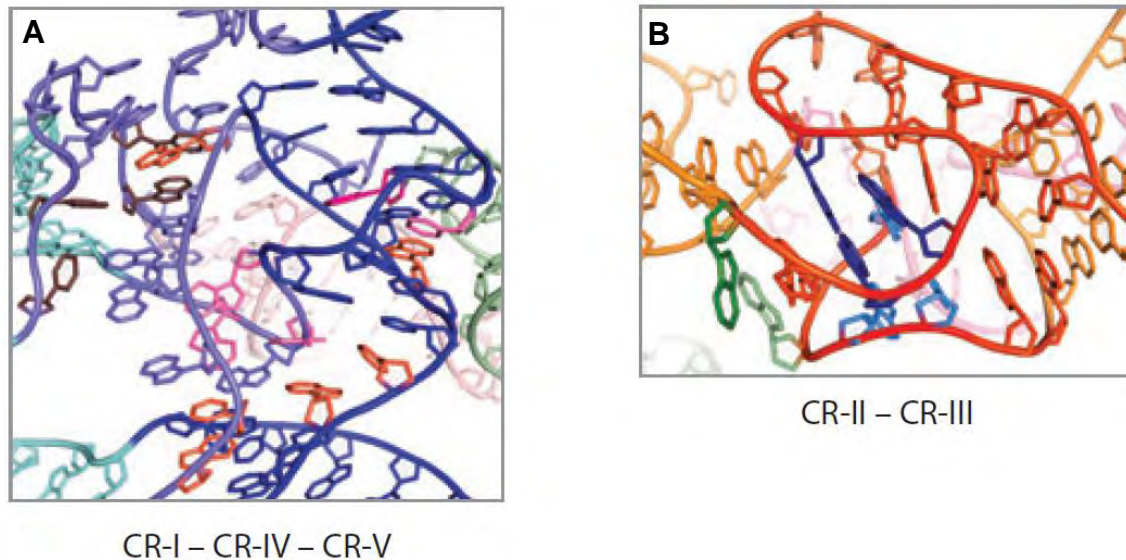


Fig. 5. Acercamiento del plegamiento y estructura tridimensional de las regiones conservadas (CR) de la subunidad de RNA de la RNasa P bacteriana (Mondragón, 2013). El papel específico de la interacción de dichas regiones se describe en el texto.

iii. Proteína P

La proteína P, o C5 en bacterias (Fig. 6), es una subunidad proteica de la RNasa P bacteriana de alrededor de 117-119 aminoácidos, cuyo peso molecular va de 14,000 a 17,500 Da. En bacterias, las cuales comparten la característica de tener sólo una subunidad proteica para esta ribozima (Fig. 2), se ha encontrado una alta homología estructural de sus respectivas proteínas P, a pesar de que la secuencia está conservada entre el 20-30% (Evans, 2006). Específicamente, sólo 14 residuos tienen más del 67% de conservación.

Fig. 6. Proteína P de *T. maritima* (Código 3Q1Q, PDB).



Los residuos R60, N61, R62, K64, R65 y R68 del casi 10% de los residuos conservados entre proteínas P bacterianas se encuentran en una zona bien identificada de la proteína, denominada motivo RNR, debido a que sus primeros residuos son

arginina-asparagina-arginina. La α -hélice de esta región forma parte de uno de los dos sitios de unión a RNA (Fig. 7). De estos, los residuos R60 y R62 se encuentran en todas las RNasas P bacterianas (Koutmou, 2011).

El segundo sitio de unión a RNA es un surco central, el cual se forma debido a la topología característica de la proteína P del tipo $\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$ (Reiter, 2010). Esta región está formada por la conexión cruzada por la izquierda poco común del tipo $\beta\alpha\beta$ entre las hojas β paralelas del surco central y una α -hélice. En este lugar ocurre la interacción y estabilización de la cadena 5'-líder del pre-tRNA (Fig. 8), mejorando el reclutamiento y discriminación de sustratos gracias a la proteína P (Koutmou, 2011).

Es conocido que, *in vitro*, la subunidad P RNA en ausencia de la proteína P es funcional y procesa el sustrato pre-tRNA en concentraciones altas de iones divalentes (alrededor de 100mM Mg^{2+}) (Guerrier-Takada et al. 1983). Sin embargo, la adición de esta subunidad proteica incrementa dramáticamente la eficiencia catalítica de P RNA, así como su especificidad en concentraciones bajas de iones, lo cual da evidencia de su importancia para la catálisis. *In vivo*, esta subunidad es indispensable para la actividad de la RNasa P y para la viabilidad celular (Liu, 2010).

La proteína P en la RNasa P holoenzima tiene un papel funcional importante, mejorando los parámetros cinéticos de la holoenzima. Se ha descrito que al realizar la catálisis la RNasa P de *B. subtilis* en presencia de la proteína P, la constante de afinidad (K_m) disminuye en alrededor 10,000 veces – la afinidad de la ribozima por el sustrato aumenta -, mientras que la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) aumenta 2,000 veces (Koutmou, 2011). Para *E. coli*, la eficiencia catalítica mejora en más de 900 veces al estar presente la proteína P. Por otra parte, la proteína también disminuye la concentración requerida del catión divalente necesaria para la catálisis de la RNasa P procarionte (Koutmou, 2011), debido a que la afinidad de la ribozima a dicho ion aumenta. La razón mecanística de estos efectos se debe a que la proteína estabiliza el cambio conformacional metal-dependiente del RNA-sustrato (Kurz, 1998; Sun, 2007), incrementando la afinidad por el sustrato mediante la estabilización de éste, conclusión que puede ser extraída por la información estructural (Reiter, 2010) (Fig. 8).

iv. RNasa P holoenzima

La formación del complejo activo de la RNasa P holoenzima (RNA + proteína + catión divalente) con su sustrato ha sido tema de investigación exhaustiva, tanto en la perspectiva funcional como estructural, desde el descubrimiento de la ribozima por Sidney Altman en la década de los 80. La interacción RNA-proteína (Fig. 7) se realiza sobre una superficie que se forma en gran parte por el motivo RNR de la proteína P (Ver sección sobre *Proteína P*). Estos contactos de la proteína P en el RNA corresponden a la región conservada IV y V, el tallo P15 y la interfaz de la hélice P2/P3 (Fig. 4; Fig. 7) (Reiter, 2010).

Sobre el acoplamiento del sustrato, se sabe que la secuencia 5'-líder, un oligonucleótido de ~10nt, hace contacto de manera extensa con la proteína, mientras que interactúa poco con el RNA. Específicamente, el líder hace contacto con los residuos Phe17, Phe21, Lys51, Arg52 y Lys90, así como contactos polares predichos computacionalmente por su cercanía con los residuos Ser26, Gln28, Lys56 y Arg89 (Reiter, 2010) (Fig. 8). Esta información permite concluir que el líder es estabilizado por la proteína, mientras que el sitio donde se lleva a cabo la catálisis se encuentra a alrededor de 6Å de distancia de la proteína, bastante alejado como para que la misma proteína pueda realizar el corte del sustrato (Fig. 9).

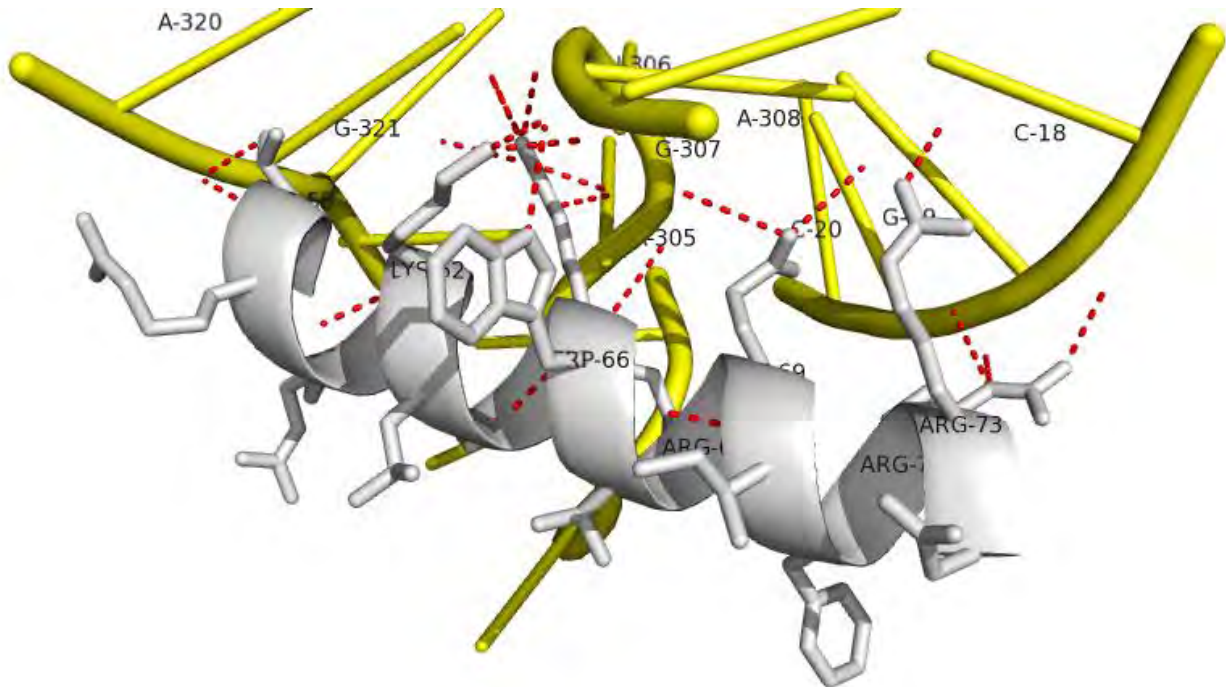


Fig. 7. Contactos polares (en líneas punteadas rojas) de la proteína P (gris) con la subunidad P RNA (amarillo) con los residuos etiquetados. El análisis de dichos contactos, así como de la interacción de la proteína P con el P RNA se describe de manera extensa en el texto.

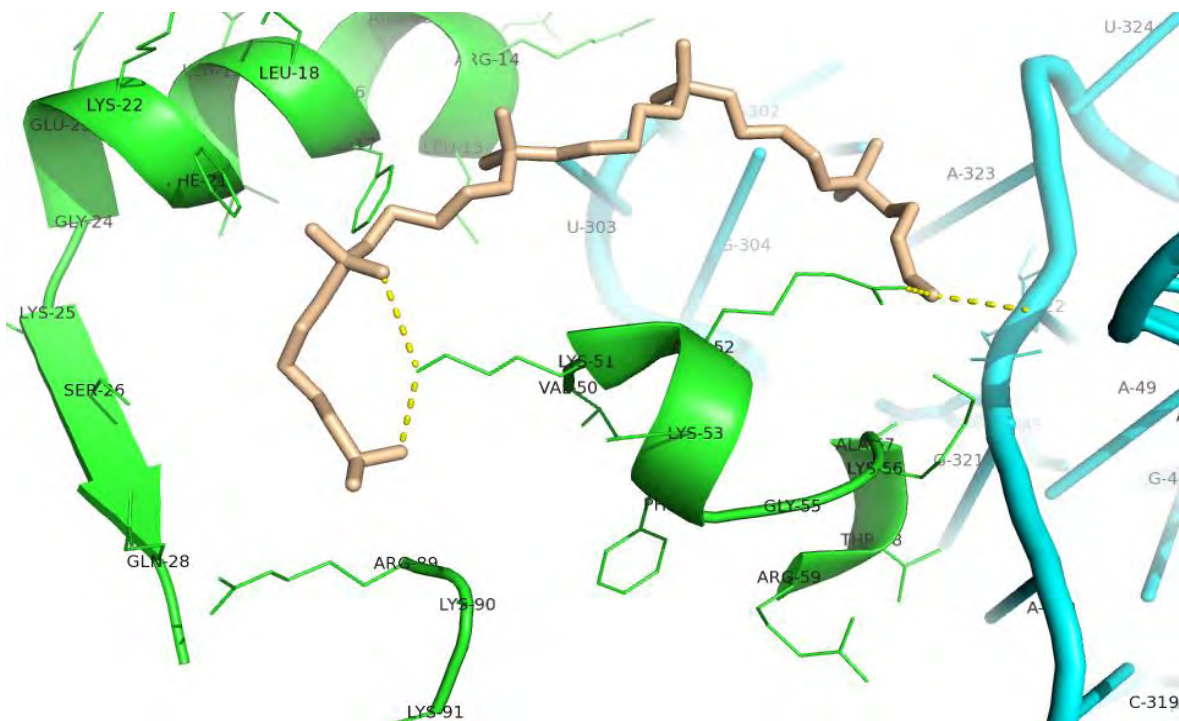


Fig. 8. El 5'-líder (rosa) es estabilizado por la proteína P (verde). Se muestran los residuos importantes de la proteína, cuyo papel en la estabilización del líder se describe en el texto, así como los contactos polares determinados por PyMOL (amarillo) con la Lys51 y Arg 52. El P RNA se muestra en azul claro.

Las asas T ψ C y D del tRNA inmaduro hacen contacto con el dominio S, que es la región que da la especificidad de reconocimiento al sustrato, mientras que el tallo aceptor, hacia el extremo 3', se extienden desde el dominio S hacia el C, cruzando un tallo coaxial formado por P1/P4/P5 (Fig. 4) (Reiter, 2010). La secuencia de reconocimiento CCA, en el final de la secuencia en 3', entra en un túnel formado por las asas de P RNA P6/P15/P16/P17 y se realiza un apareamiento canónico de bases del CCA con la región L15. El 5'-terminal del tRNA indica la localización del sitio activo, cercano a la intersección de las regiones P4, P5 y CR IV del RNA (Fig. 9).

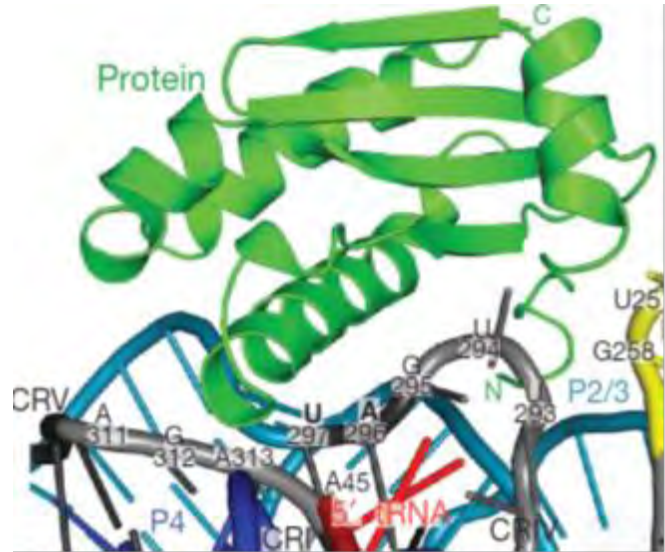


Fig. 9. Acercamiento de la interacción P RNA, proteína P y 5'-líder, destacando el plegamiento de las regiones conservadas del RNA y el sitio catalítico en la zona donde recae el extremo 5' del tRNA (Reiter, 2010).

v. Catálisis de la RNasa P y ensayo de actividad

En el aspecto funcional, la subunidad de RNA (P RNA) funge como el biocatalizador primario de la reacción. Sin embargo, la proteína de la RNasa P (Fig. 1, en verde) tiene una función fundamental en la catálisis, ya que facilita la unión de la región 5'-líder del sustrato pre-tRNA y ayuda a la disociación del producto catalizado (tRNA maduro y secuencia 5'-líder).

La unión del sustrato a la endonucleasa es rápida, prácticamente controlada por difusión (Koutmou, 2011), y su mecanismo catalítico es una sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2). Este mecanismo, propuesto por Reiter y colaboradores (2010), fue sugerido con base en la estructura resuelta de la holoenzima en complejo con el producto y por estudios cinéticos previos. El ion divalente M1 (Fig. 10) en la estructura enzima-producto está a una distancia consistente con el modelo de transición enzima-sustrato. La catálisis de la RNasa P es dependiente de iones divalentes (Mg^{2+}), por lo que el ion M1 (Fig. 10.B) tiene un papel fundamental en la reacción, activando un grupo

hidroxilo para el ataque nucleofílico, creando un desplazamiento en el átomo de oxígeno del 5' fosfato del tRNA y el P RNA, los cuales se unen directamente. La liberación de los productos es facilitada por una molécula de agua coordinada con el metal M2, que cataliza una transferencia de protones para la liberación del complejo transitorio enzima-producto.

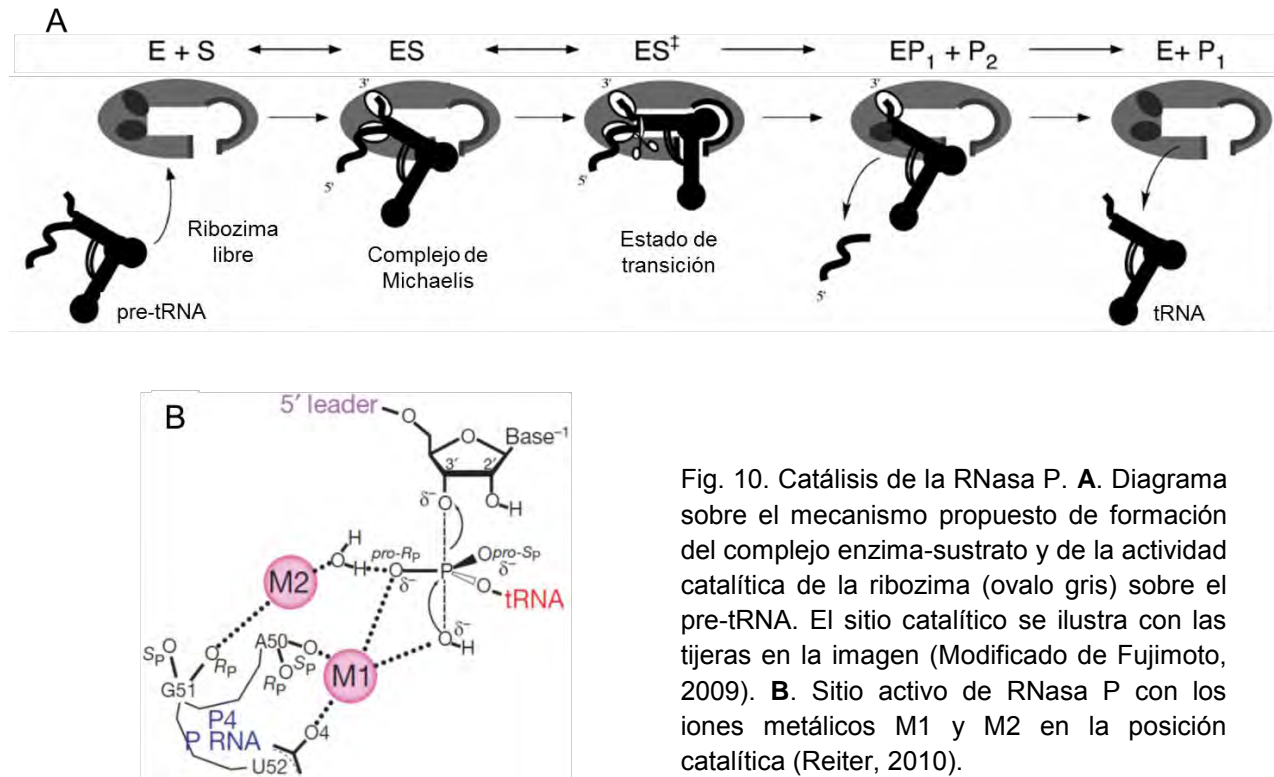


Fig. 10. Catálisis de la RNasa P. **A.** Diagrama sobre el mecanismo propuesto de formación del complejo enzima-sustrato y de la actividad catalítica de la ribozima (ovalo gris) sobre el pre-tRNA. El sitio catalítico se ilustra con las tijeras en la imagen (Modificado de Fujimoto, 2009). **B.** Sitio activo de RNasa P con los iones metálicos M1 y M2 en la posición catalítica (Reiter, 2010).

La metodología analítica para la determinación de la actividad de RNasa P comúnmente se realiza colocando la ribozima con su sustrato pre-tRNA en presencia del cofactor magnesio, así como sales estabilizadoras de la estructura de los ácidos nucleicos, como acetato de amonio, tras un protocolo de plegamiento de dichas secuencias de RNA con calentamiento y enfriamiento del medio de reacción. Para el monitoreo preciso de dicha catálisis, de manera habitual se marca radioactivamente el sustrato con ^{32}P para detectar específicamente esta secuencia con una mínima cantidad de material. La reacción habitualmente se detiene con urea 8M, lo cual asegura que se disocian los complejos macromoleculares que intervienen en la reacción (Gößringer, 2012). Finalmente, las secuencias nucleotídicas se separan en

geles de poliacrilamida de entre 6-18% y se revela la radioactividad de las sondas mencionadas (Fig. 11).

Al día de hoy, no existen reportes de cambios sustanciales en la metodología analítica para la determinación de la actividad de la RNasa P (Gößringer, 2012), lo cual impide la optimización y el escalamiento de dicho procedimiento en alto rendimiento. Por esta razón y dado el interés de la RNasa P como blanco farmacológico, uno de los objetivos de este trabajo es el planteamiento, diseño y optimización de un ensayo de actividad en alto rendimiento para RNasa P.

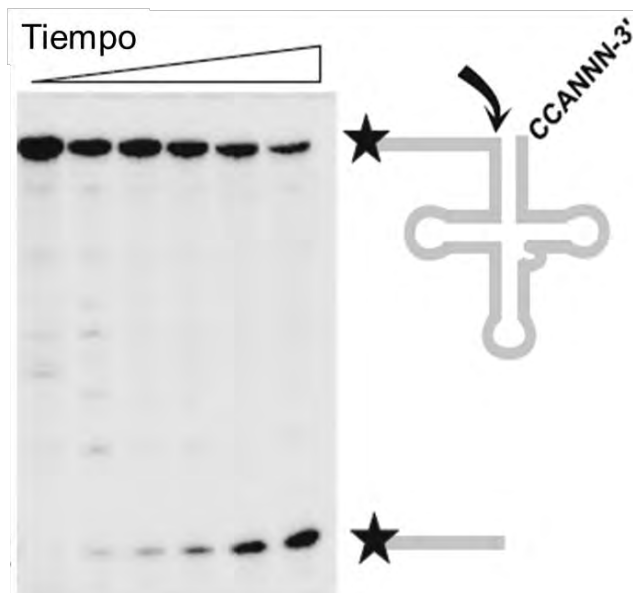


Fig. 11. Ensayo de actividad tradicional para RNasa P mediante separación del sustrato y producto en gel de poliacrilamida. La estrella negra indica el marcaje radioactivo con ^{32}P en el extremo 5' del sustrato pre-tRNA, tanto en el sustrato íntegro como en el producto procesado por la RNasa P. La flecha indica el sitio de corte de la RNasa P (Modificado de Gößringer, 2012).

vi. RNasa P como blanco farmacológico

En la actualidad, en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para reducir o eliminar las infecciones bacterianas o virales, los RNAs y los complejos RNA-proteína se han mostrado como blancos potenciales por tener roles centrales en la fisiología microbiana (Kawamoto, 2008). La RNasa P es uno de los genes del grupo de productos génicos que, debido a su importancia en la fisiología de los organismos vivos, son indispensables para la viabilidad celular (Kazantsev, 2006).

En este caso, la RNasa P es indispensable para la síntesis de proteínas por catalizar el metabolismo de intermediarios de éstas (tRNA), por lo que la inhibición o un mal funcionamiento de la ribozima tienen efectos letales. Además, de manera

ventajosa, se pueden establecer claras diferencias, principalmente estructurales, entre los sistemas bacterianos y eucariontes al hablar de esta ribozima.

Sin embargo, hablar de fármacos de unión a ácidos nucleicos es un aspecto muy distinto al diseño de fármacos para proteínas, ya que estamos ante moléculas más flexibles y cuyo plegamiento depende fuertemente de factores externos, como la concentración iónica del medio (Rawat, 2011). Además se cree, aunque aún está en discusión, que el empaquetamiento y plegamiento de estructuras de ácidos nucleicos es más complejo de lograr que en moléculas proteicas (Hyeon, 2006). Es por esta razón que las características estructurales del plegamiento tridimensional del RNA resulta aún complejo predecir con las herramientas computacionales disponibles actualmente.

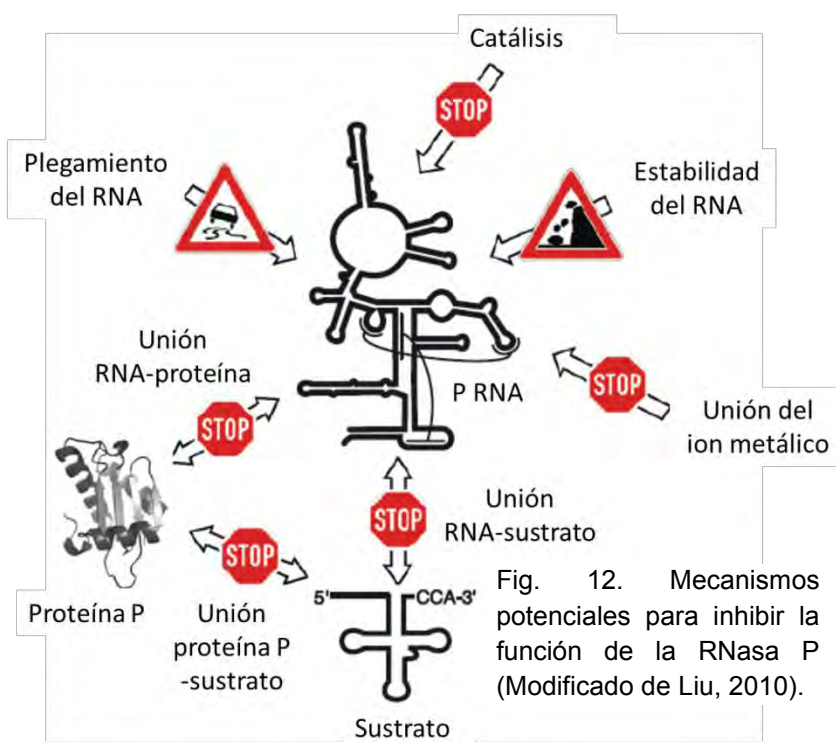
A raíz de la gran diversidad de funciones encontradas para distintos tipos de RNA, la investigación en moléculas pequeñas de unión a esta biomolécula se ha intensificado y la comprensión estructural de estos fármacos es una oportunidad latente (Gallego, 2001), incluso en años recientes (Moumné, 2012). Particularmente, las ribozimas son uno de los blancos de mayor interés en este ámbito, siendo el ribosoma el ejemplo con mayor éxito en el desarrollo de fármacos contra un objetivo terapéutico durante las últimas décadas, con los antibióticos de la clase de las tetraciclinas y los aminoglucósidos.

Por otro lado, se deben considerar también los riboswitches en este aspecto como un caso destacable, ya que por definición, estas secuencias permiten la unión a metabolitos para modular su actividad. Aunque no se conoce mucho sobre algunos de ellos, la unión a RNA y algunos mecanismos de actividad se han descrito para riboswitches de vitaminas y coenzimas, como tiamina, flavin mononucleótido (FMN) y cobalamina; nucleótidos, como la adenina, guanina y 2-deoxiguanosina; y aminoácidos, como la glutamina, glicina y lisina, los cuales tienen una actividad metabólica reguladora importante en muchos sistemas vivos.

Como es discutido en el artículo de Borman (2009), de manera general, la afinidad a ácidos nucleicos no es un problema, ya que es esperable que moléculas con cadenas largas, flexibles y cargadas positivamente se unan por la química de la biomolécula. Sin embargo, la unión a secuencias específicas, estructuras secundarias o terciarias de

RNA es un reto aún en el diseño de fármacos contra esta molécula. Algunas estrategias recientes (Trylska, 2013) justifican que sólo el uso de oligonucleótidos antisentido con las secuencias específicas, modificados químicamente, serán las estrategias de mayor éxito y predictibilidad para este fin. Lo anterior es sugerido principalmente porque la naturaleza química y la estructura de los ácidos nucleicos hacen que la investigación en ligandos se torne compleja, por lo que las herramientas computacionales ofrecen predicciones de unión y afinidad con un nivel de confiabilidad por debajo del logrado para blancos proteicos en la actualidad.

Se han definido al día de hoy varias hipótesis sobre las posibles formas mediante las cuales se puede afectar la función de la holoenzima RNasa P bacteriana (Fig. 12), principalmente debido a que se compone de dos diferentes tipos de moléculas (Wilcomm, 2010), ácido nucleico y proteína.



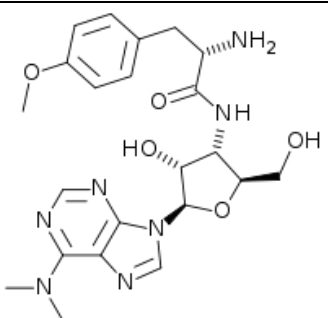
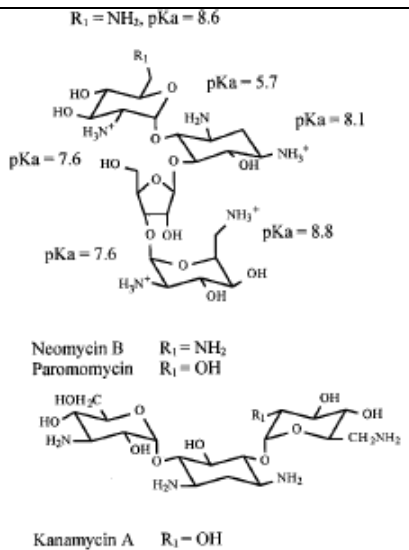
Sobre los inhibidores conocidos para la subunidad de RNA de la RNasa P, se realizó una búsqueda exhaustiva de compuestos publicados en la literatura internacional, así como los referidos en la *Therapeutic Targets Database* de la Universidad Nacional de Singapur (<http://bidd.nus.edu.sg/group/ttd>) sobre RNasa P como un blanco terapéutico.

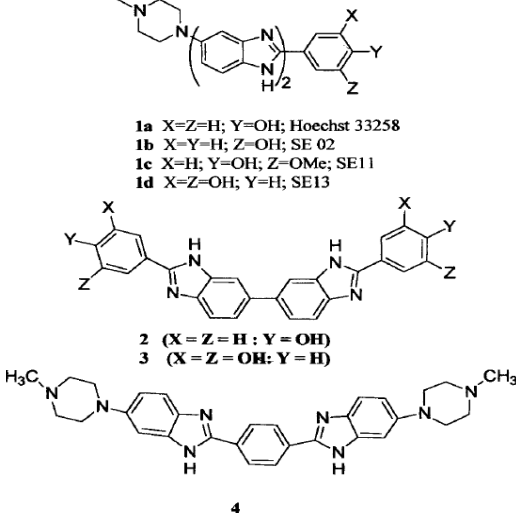
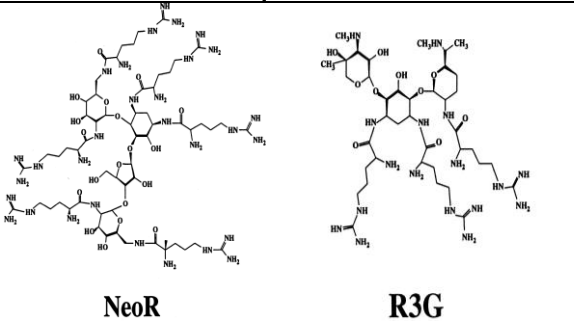
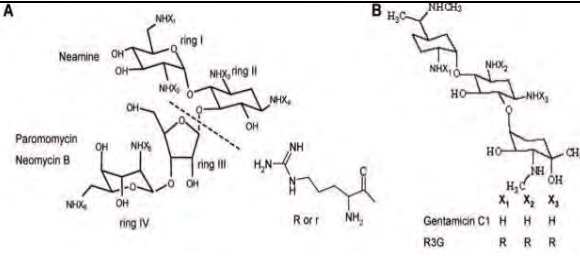
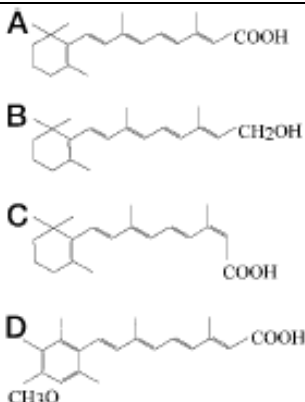
En la tabla 1 se enlistan inhibidores tanto para RNasas P procariontes, de interés en este trabajo, así como para la RNasa P del mohó *Dictyostelium discoideum*, el cual es estudiado asiduamente por un grupo griego con fines de desarrollo de fármacos para enfermedades dermatológicas por hongos. A raíz de dichos estudios se han encontrado

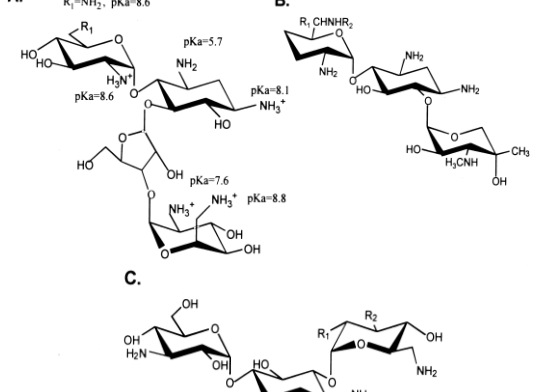
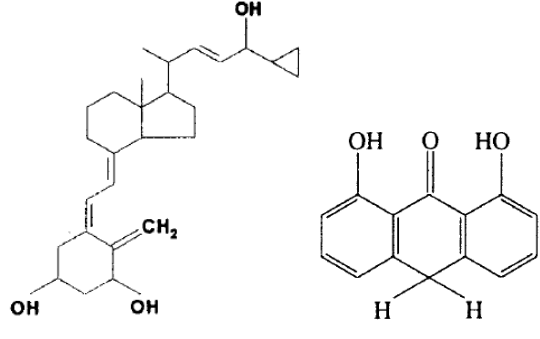
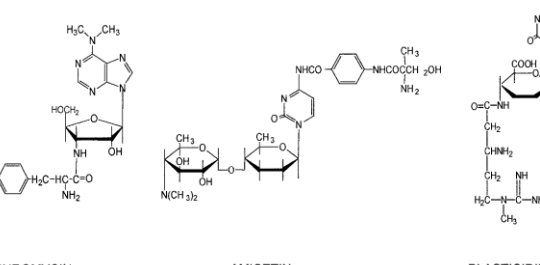
coincidencias entre las moléculas inhibitoras para procariontes respecto a las inhibitoras para el modelo de estudio eucarionte.

La afinidad de las moléculas inhibitoras encontradas es variable, sin embargo, de manera general, se conoce que los aminoglucósidos y aminoderivados inhiben a la RNasa P en concentraciones del orden micromolar, mientras que específicamente la puromicina se une al RNA incluso mayor afinidad que con la que dicho fármaco se une al ribosoma ($IC_{50} < 50\mu M$) (Starck, 2002).

Tabla 1. Inhibidores conocidos para actividad de RNasa P en organismos procariontes y eucariontes.

Inhibidor	Organismo	Molécula	Referencia
Puromicina (Primer aminoglucósido descrito con actividad inhibitora de RNasa P)	<i>E. coli</i>		Vioque, 1989
Neomicina B Paramomicina Kanamicina A/B (Aminoglucósidos)	<i>E. coli</i> y <i>Mycoplasma hypopneumoniae</i>	<p>$R_1 = NH_2$, pKa = 8.6</p>  <p>Neomycin B $R_1 = NH_2$ Paramomycin $R_1 = OH$</p> <p>Kanamycin A $R_1 = OH$ Kanamycin B $R_1 = NH_2$</p>	Mikkelsen, 1999

<p>6 derivados sintéticos de benzimidazol</p>	<p><i>E. coli</i></p>	 <p>1a X=Z=H; Y=OH; Hoechst 33258 1b X=Y=H; Z=OH; SE 02 1c X=H; Y=OH; Z=OMe; SE11 1d X=Z=OH; Y=H; SE13</p> <p>2 (X=Z=H; Y=OH) 3 (X=Z=OH; Y=H)</p> <p>4</p>	<p>Hori, 2001</p>
<p>Derivado hexa-arginina de neomicina (NeoR) Derivado tri-arginina de gentamicina (R3G) (Conjugados aminoglucósido-arginina)</p>	<p><i>E. coli</i>, <i>N. gonorrhoeae</i>, <i>P. gingivalis</i>, <i>S. pneumoniae</i> y humano</p>	 <p>NeoR R3G</p>	<p>Eubank, 2002</p>
<p>10 aminoglucósidos, conjugados aminoglucósido-arginina y aminoglucósido-poliarginina</p>	<p><i>B. subtilis</i> (Acoplamiento molecular <i>in silico</i>)</p>	 <p>A B</p> <p>Neomycin B Paromomycin Gentamicin C1 ring I ring II ring III ring IV R or r X₁ X₂ X₃ R3G R R R</p>	<p>Berchanski, 2008</p>
<p>Retinoides naturales: Ácido trans-retinoico (A) y Retinol (B) Análogos sintéticos de la vitamina A: Isotretinoína (C) y acitretina (D)</p>	<p><i>Dictyostelium discoideum</i> (Eucarionte)</p>	 <p>A B C D</p> <p>COOH CH₂OH COOH CH₃O</p>	<p>Papadimou, 1998</p>

<p>(A) Neomicina B Paromomicina</p> <p>(B) Gentamicina</p> <p>(C) Tobramicina Kanamicina</p> <p>(Aminoglucósidos)</p>	<p><i>Dictyostelium discoideum</i></p> <p>(Eucarionte)</p>	<p>A. $R_1 = \text{NH}_2$, $\text{pKa} = 8.6$</p> <p>B. $R_1 = \text{CHNHR}_2$</p> <p>C.</p> 	<p>Tekos, 2000</p>
<p>Calcipotriol</p> <p>Antralina</p>	<p><i>Dictyostelium discoideum</i></p> <p>(Eucarionte)</p>		<p>Papadimou, 2000a; Papadimou, 2000b</p>
<p>Puromicina, amicitina y blasticidina S</p> <p>(Inhibidores de peptidil-transferasa)</p>	<p><i>Dictyostelium discoideum</i></p> <p>(Eucarionte)</p>	 <p>PUROMYCIN AMICETIN BLASTICIDIN S</p>	<p>Stathopolus , 2000; Kalavrizioti, 2003</p>

Por otro lado, al publicarse la primera estructura cristalográfica de la proteína P en 1998, dos empresas farmacéuticas iniciaron estudios en busca de inhibidores de la RNasa P, GlaxoSmithKline y Message Pharmaceuticals (cerrada en 2004), encontrándose que los compuestos guanilhidrazonas tenían actividad inhibitoria, mostrando resultados claros *in vitro* (Willkomm, 2010). La técnica antisentido, con el uso de sondas químicamente modificadas complementarias a secuencias del P RNA, también ha sido explorada para poder inhibir la actividad de la RNasa P, mediante el bloqueo de sitios importantes de la subunidad catalítica de RNA.

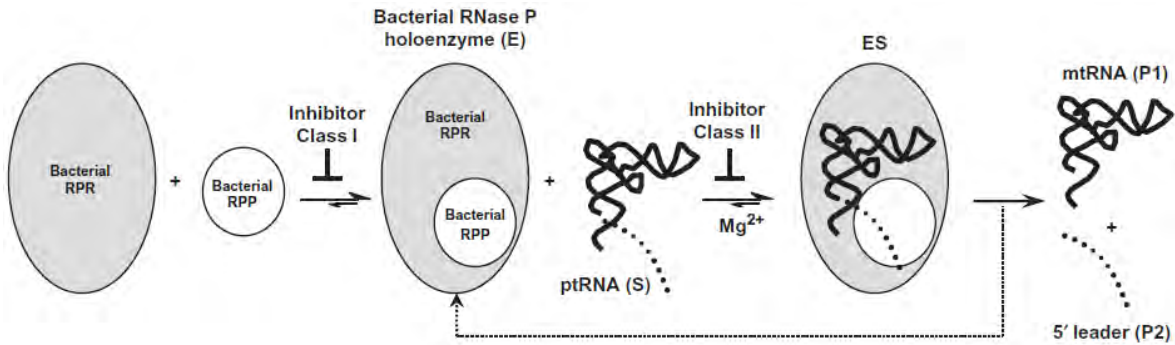


Fig. 13. Diagrama mecanístico sobre los posibles pasos de interferencia de la función de RNasa P a través de distintos tipos de inhibidores (Kawamoto, 2008). RPR: Subunidad de RNA de la RNasa P; RPP: Subunidad proteica de la RNasa P.

Sobre la asociación de la RNasa P holoenzima (Fig. 7) se han definido dos tipos de inhibidores distintos desde el punto de vista mecanístico, los cuales afectan su integración (Fig. 13) y, por ende, la inhibición de su función. Los inhibidores de clase I son aquellos que impiden la formación de complejo PRNA – Proteína P, los cuales son peptidomiméticos dirigidos a P RNA o nucleótidomiméticos dirigidos a la proteína P (Fig. 13, RPP). Por otro lado, los inhibidores clase II son aquellos que impiden la unión del sustrato pre-tRNA a la holoenzima, lo cual también impedirá el procesamiento del sustrato (Kawamoto, 2008).

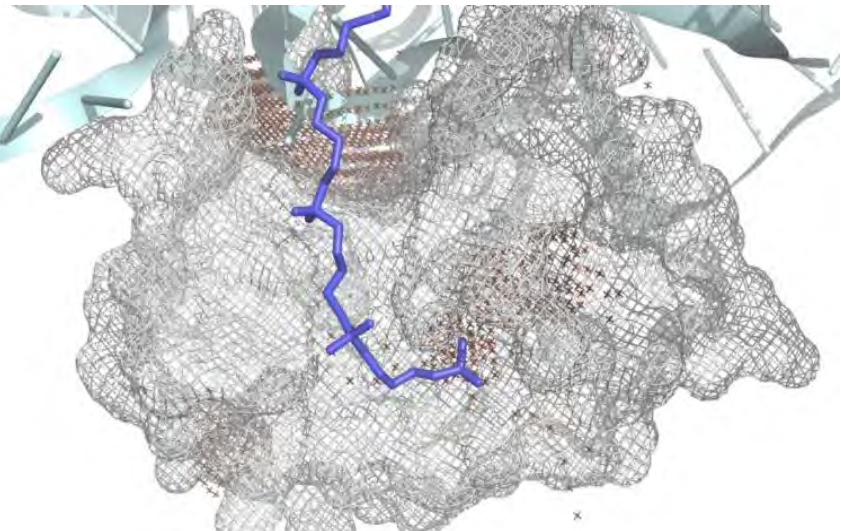


Fig. 14. Cavidades (en puntos color café oscuro) para la proteína P (malla gris), ubicados en el contexto espacial de la secuencia del 5'-líder (azul marino) y del P RNA (azul claro). Se puede destacar la principal cavidad de la proteína P en el sitio donde ésta interactúa con el P RNA (arriba al centro), además de existir otra cavidad importante en donde se coloca el extremo 5' distal del pre-tRNA (al centro).

Se propone que tanto la subunidad de RNA, como la superficie de la proteína P bacteriana (Fig. 14), ofrecen múltiples cavidades de interés desde el punto de vista de búsqueda de cavidades o bolsillos (*pockets*) para la unión de ligandos. Como blancos farmacológicos se deberán aprovechar las áreas de interacción que tienen entre ambas

subunidades, o de las subunidades con el sustrato, siendo posible la identificación de inhibidores tipo I y II.

Se han realizado ya algunos esfuerzos en este sentido, identificando algunos compuestos líderes con núcleos de piperazina (Willkomm, 2010), cuya unión es a la zona adyacente al motivo conservado RNR. Sin embargo, como se explicó anteriormente, es de particular interés seguir explorando éste y otros motivos altamente conservados de la RNasa P holoenzima. La finalidad sería lograr desarrollar fármacos con afinidad mejorada sobre la ribozima de organismos bacterianos una vez que se haya logrado identificar algún compuesto con afinidad inicial a la superficie de la proteína, a algún sitio de ésta o a cavidades del RNA.

b. Diseño de fármacos basado en fragmentos

i. Estrategia e impacto en la actualidad

El diseño de fármacos basado en fragmentos (DFBF) tiene como principio básico la identificación experimental de moléculas de bajo peso molecular con la capacidad de formar interacciones de alta calidad con una molécula blanco. El objetivo de esta estrategia de diseño racional de fármacos es unir cooperativamente fragmentos que pueden ser químicamente ligados para formar moléculas líderes potenciales, con alta especificidad y afinidad (Fig. 15). En la actualidad, esta estrategia se emplea ampliamente en investigación farmacéutica, dado su potencial de explorar espacios químicos muy extensos, ya que se han identificado inhibidores potentes y altamente selectivos para varios blancos terapéuticos.

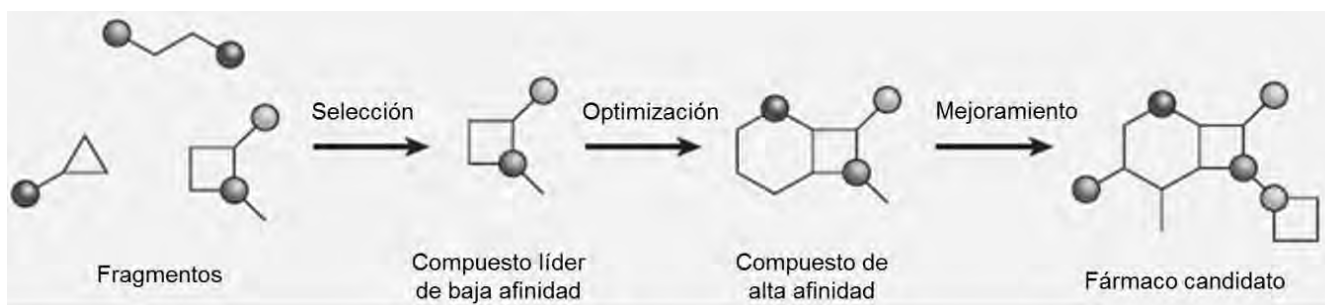


Fig. 15. Estrategia de diseño de fármacos basado en fragmentos (Modificado de Galloway, 2011).

A partir de la década del 2000, la cantidad de empresas farmacéuticas, institutos y universidades dedicadas al diseño racional de fármacos fue en aumento, ya que esta metodología surge como una gran opción para reducir los costos y los tiempos de la investigación para el desarrollo de fármacos. El proceso tradicional de descubrimiento de fármacos es un gran embudo, en el que de aproximadamente 10,000 compuestos candidatos, sólo ~10% parecen tener la función deseada *in vitro* y en especies animales modelo, e ingresan a fases clínicas; de éstos, sólo 1 o 2 llegan a ser comercializados tras estudiar su toxicidad y comprobarse que presentan una baja tasa de eventos adversos en pacientes. Esta estrategia, además de tomar entre 10 y 15 años de investigación y desarrollo, incrementa los precios del producto final, impactando directamente en el consumidor.

Entre las empresas farmacéuticas dedicadas principalmente al diseño de fármacos basado en estructura del blanco y en fragmentos se encuentran Astex Therapeutics, Plexikon, SGX Pharmaceuticals (adquirido por Eli Lilly), Sareum, Vernalis, Sunesis y Vertex; centros académicos e institutos de investigación, como la Universidad de Uppsala, empleando la metodología de Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR), la Universidad de Arizona, el Instituto Burnham y la Universidad de Leiden; y grandes trasnacionales ya consolidadas en el ámbito farmacéutico que han incursionado también en el diseño novedoso de fármacos, como Abbott Laboratories, Astra Zeneca, Hoffmann-La Roche, Ibis Therapeutics (parte de Isis Pharmaceuticals), Schering Plough y Wyeth Pharmaceuticals (de Kloe, 2009). Las moléculas desarrolladas, tanto por la iniciativa privada como por la academia, se dirigen al tratamiento de problemas de salud cuya incidencia es creciente actualmente. Entre las condiciones patológicas a combatir con los nuevos fármacos se pueden encontrar el cáncer, con diferentes estrategias anti-neoplásicas; esclerosis múltiple; mal de Parkinson y Alzheimer; enfermedades metabólicas, como diabetes y obesidad; e infecciones bacterianas (*Bacillus anthracis*) y virales (Hepatitis, VIH).

La investigación en DFBF se puede desarrollar a partir de metodologías biofísicas o bioquímicas. En sus inicios, se asociaba el DFBF con los métodos biofísicos, como la cristalografía de rayos X, la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la SPR. Sin embargo, en años recientes las metodologías bioquímicas mediante ensayos

funcionales de alto rendimiento (HTS, por las siglas en inglés *High Throughput Screening*) han permitido analizar un mayor número de compuestos contra el blanco deseado en menor tiempo y con menores inversiones iniciales (Whittaker, 2010). La tabla 2 resume las principales diferencias, ventajas y limitantes de la información obtenida de los métodos de análisis de fragmentos más utilizados para el diseño de fármacos. Cabe destacar que la hidrofobicidad de los fragmentos es una restricción inherente a todos los métodos, ya que la mayoría de los fragmentos son poco solubles en agua, siendo solubles sólo en disolventes como DMSO o PEG-400 (*Ver sección b.ii*).

Tabla 2. Comparación y características de los métodos de análisis de fragmentos (Modificado de Whittaker, 2010).

Método de análisis	Tamaño típico de librería	Información obtenida	Intervalo de actividad (promedio) [μ M]	Eficiencia de ligando* (promedio)	Ventajas	Limitaciones	Frecuencia de uso**
Cristalografía de rayos X (RX)	\leq 1,000 compuestos (Mezclas: 4-10 fragmentos)	Estructura	10-2500 (450)	0.26-0.62 (0.41)	Detalle de posición y sitio de unión	Tamizaje de librerías pequeñas	18%
Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	1,000-10,000 (Mezcla)	Afinidad y sitio de unión	2-17,000 (1,850)	0.20-0.48 (0.32)	Correlación del sitio de unión y confirmación de la unión	Tamizaje de librerías pequeñas a medianas	25%
Ensayo de alto rendimiento (HTS)	20,000	Afinidad / Actividad	0.1-41,000 (2,220)	0.21-0.86 (0.50)	Información funcional – Tamizaje a gran escala de fragmentos	Necesidad de información estructural para diseño racional	38%

*Energía de unión por átomos diferentes a hidrógeno (Ver sección 1.b.ii. i. *Características de los fragmentos*, para mayor detalle).

** El porcentaje restante se compone de otras técnicas de análisis y optimización de fragmentos, como análisis *in silico*, con 11%, y Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR) y Espectrometría de masas (MS), ambas con un 8% (Ferenczy, 2012).

De una búsqueda realizada en el servidor *Scopus* (Elsevier; Febrero, 2012), la primera referencia que habla sobre la estrategia de diseño de fármacos basado en fragmentos apareció en 2002, desencadenando una tendencia exponencial sobre la cantidad de citas bibliográficas al respecto (Fig. 16). Para esa fecha, existían 237 artículos que hablan sobre dicha estrategia, con un índice *h* de 27, es decir, 27 de ellos al menos se encuentran citados 27 veces en la literatura científica.

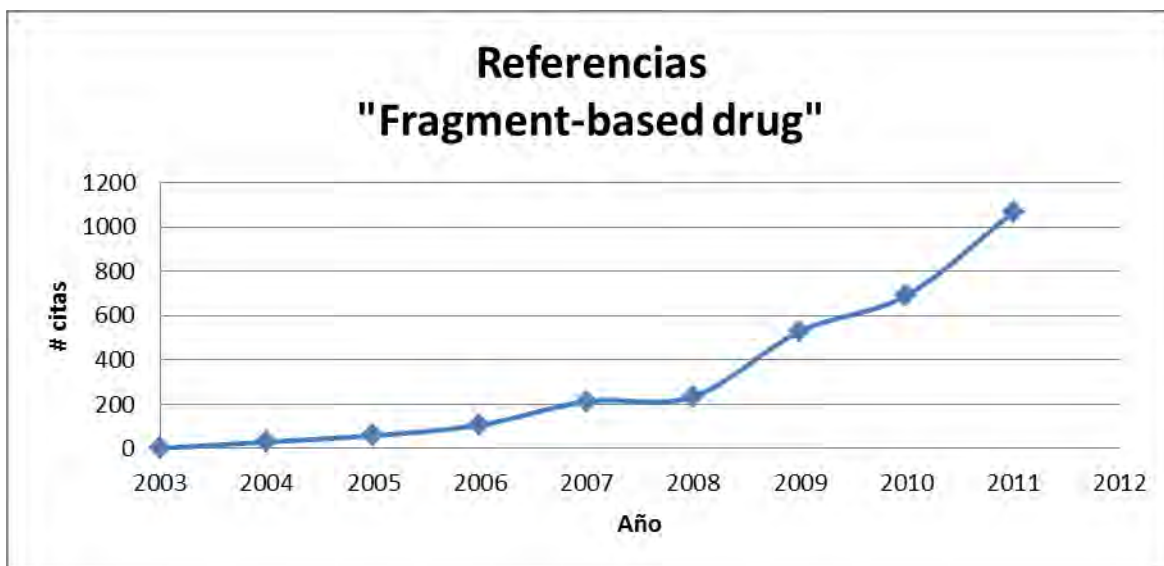


Fig. 16. Tendencia de las referencias científicas sobre el tema de los fármacos basados en fragmentos. Se empleó el término "fragment-based drug" como motor de búsqueda en la base de datos Scopus (Elsevier, febrero 2012).

Mediante una estrategia racional de diseño de fármacos, como lo es el diseño de fármacos basado en estructura y en fragmentos, aunado al conocimiento sobre las estructuras tridimensionales de las proteínas y complejos propuestos, el diseño y resolución de estructuras con afinidad a la proteína de interés tiene altas probabilidades de tener buenos resultados. Sin embargo, para ello es necesario contar con moléculas de bajo peso molecular, de alta pureza y de identidad confirmada, para poder realizar los acoplamientos moleculares funcionales y estructurales con éxito.

ii. Características de los fragmentos

Tras los primeros estudios en el uso de fragmentos para desarrollar fármacos, se derivaron las primeras características mínimas de estos compuestos, así como un concepto sobre la eficiencia del ligando. En 2003, investigadores de la empresa Astex

Pharmaceuticals (Congreve, 2003), la cual trabaja muy activamente en este ámbito, desarrollaron la “regla de tres” para fragmentos, la cual se deriva de la “regla de cinco” de Lipinski para moléculas con potencial actividad farmacológica, la cual determina las características fisicoquímicas ideales para estos compuestos. El cumplimiento de la “regla de tres” asegura teóricamente que los compuestos líderes, para posterior optimización, tendrán mejores propiedades farmacológicas de Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción (ADME) (Myszka, 2011).

La “regla de tres” indica que la masa molecular de los fragmentos debe ser menor a 300 Da (idealmente entre 50-250 Da); el número de grupos donadores de puentes de hidrógeno debe ser menor o igual a 3; el número de grupos aceptores de puentes de hidrógeno menor o igual a 3; el coeficiente de partición (*clogP*) calculado debe ser menor o igual a 3 (Whittaker, 2010); el número de enlaces móviles, o índice de flexibilidad, menor o igual a 3; y que la superficie polar del fragmento consista de un área menor o igual a 60Å² (Myszka, 2011).

El cálculo de eficiencia del ligando (LE, por sus siglas en inglés), o energía de unión por átomos diferentes a hidrógeno, fue desarrollado para cuantificar la unión de ligandos potenciales y para monitorear la afinidad del ligando durante el proceso de optimización. Una fórmula para poder calcular este parámetro (Whittaker, 2010) es la siguiente:

$$LE = - \frac{RT \ln K_d}{NH}$$

donde *NH* es el número de átomos diferentes a hidrógeno que tiene el ligando.

Sin embargo, por la complejidad del cálculo de la constante de disociación (*K_d*), este término a menudo es sustituido por la concentración inhibitoria al 50% (*IC₅₀*) en las mismas condiciones de ensayo. Otra propuesta para evaluar esta característica del fragmento es la propuesta del índice de eficiencia de unión (*BEI*, por *Binding Efficiency Index*), calculado por la fórmula (de Kloe, 2009):

$$BEI = \frac{pK_i \text{ o } pK_d \text{ o } pIC_{50}}{MW} * 1000$$

donde *MW* es el peso molecular por sus siglas en inglés.

iii. Bibliotecas de fragmentos



- Zenobia

La biblioteca 1 de fragmentos Zenobia es una colección de 352 compuestos para realizar tamizaje por métodos biofísicos para el diseño de fármacos, incluyendo RMN, SPR y cristalografía de rayos X. Estos compuestos altamente solubles (200mM) en DMSO están pre-agrupados en mezclas de diversas formas para los estudios cristalográficos. Aproximadamente se proveen 1.5mg de cada compuesto en el kit comercial (0.05ml de solución 200mM). Los intervalos en los cuales se encuentra la afinidad de estos compuestos están en el rango de 1 – 10,000 μM (Zenobia, 2012).



- Maybridge

La colección de fragmentos de Maybridge es una librería de compuestos filtrada en términos de pureza, peso molecular ($\leq 350\text{Da}$) y remoción de funcionalidad inapropiada para permitir la completa libertad para diseñar una librería según las necesidades específicas (Maybridge, 2012). Específicamente, la biblioteca que será usada para este proyecto es la Ro3-1000, que cuenta con 1,000 fragmentos a una concentración de 40mM en DMSO, susceptibles a ser derivatizados para diseñar fármacos de alta afinidad para el blanco deseado, los cuales cumplen con la “regla de 3”.

c. Fluorescencia y FRET

La fluorescencia es un tipo de luminiscencia de las sustancias, comúnmente compuestos aromáticos, que se deriva de la relajación de los electrones excitados de las moléculas. Este efecto se da por la relajación rápida de los electrones en estado singulete, cada uno apareado con un electrón en un momento angular opuesto del orbital del siguiente nivel energético. Al regresar el electrón a su estado energético

basal, se genera energía en forma de fotones (Lakowicz, 2006), que se hace evidente con la emisión de luz, o fluorescencia, de la sustancia.

Una variante aplicada de la fluorescencia es la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés), metodología de uso bastante extendido en Biología Molecular y Bioquímica. Sus aplicaciones van desde experimentos para amplificación de secuencias mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hasta ensayos *in vivo* para visualizar la interacción de componentes celulares a través de microscopía de fluorescencia, tanto para ensayos de tiempo real como de punto final.

El FRET es un mecanismo fisicoquímico y espectrofotométrico que se basa en la presencia de una molécula donadora de energía y una molécula aceptora de ésta. Dicho fenómeno ocurrirá cuando, tras absorber energía, la molécula donadora emita energía en una longitud de onda que se superponga en el rango de longitud de onda de excitación de la molécula aceptora. Una interacción dipolo-dipolo causará el apagamiento de la emisión de la molécula donadora por la absorción de energía por parte de la molécula aceptora, encontrándose una extinción – o apagamiento – de la fluorescencia o una emisión de energía en una longitud de onda generalmente de menor frecuencia, es decir, una mayor longitud de onda (Lakowicz, 2006).

Las variables para la ocurrencia del FRET son el grado de traslape de las longitudes de onda de emisión y absorción del par de moléculas FRET, el rendimiento cuántico de la molécula donadora (Marras, 2002), la orientación relativa de la transición de dipolos de ambas moléculas, y la distancia física entre las moléculas.

Para algunas aplicaciones en Biología Molecular, esta estrategia está basada en sondas de oligonucleótidos sintéticas con una molécula fluorescente y una molécula extintora no fluorescente (NFQ, por las siglas en inglés de *Non-Fluorescent Quencher*) en extremos opuestos de la sonda o, dependiendo del diseño experimental, incluso en alguna parte del interior de la sonda (Johansson, 2006). Cuando la sonda FRET está intacta, el par fluoróforo-extintor se encuentran a una distancia física relativamente corta, por lo que al exponerse a la longitud de onda de excitación, la transferencia de energía ocurre entre ambas moléculas debido a su proximidad física, en una distancia entre 10 y 100Å (Klostermeier, 2002), o por contacto (Fig. 17). Sin embargo, cuando

ocurre una separación en la sonda por un rompimiento, corte catalítico o separación física de los extremos de la sonda a más de 100\AA , la falta de interacción por FRET entre el extintor y el marcado permitirá la emisión de luz o el cambio en las propiedades de emisión, la cual es registrada por el detector de un espectrofluorómetro (Thakur, 2005).

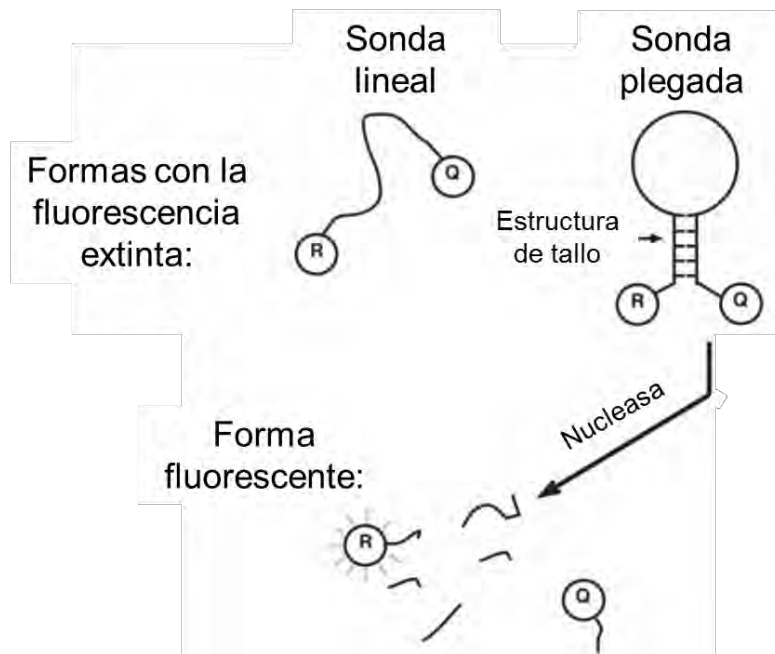


Fig. 17. Fundamento de FRET propuesto para el ensayo de RNasa P (Modificado de Johansson, 2006), donde se detalla el mecanismo ideado para el apagamiento o extinción de la fluorescencia de la sonda.

2. Justificación e hipótesis

La terapéutica contra infecciones bacterianas es un área de la farmacología que enfrenta un problema que empeora día con día, debido a la resistencia bacteriana a antibióticos (Waldrop, 2009). Por causa de lo anterior, es necesario dedicar esfuerzos a la investigación sobre mejores blancos terapéuticos en los organismos patógenos y al desarrollo de fármacos novedosos, más potentes, específicos y eficaces. Mediante el conocimiento de la estructura y función de las enzimas, específicamente de ribozimas bacterianas, se plantea la posibilidad de identificar moléculas líderes, susceptibles de optimizarse, para el desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos.

Posterior a la revisión bibliográfica y el estudio de la estructura de la RNasa P y sus subunidades, nuestra hipótesis general del presente trabajo es que si se diseña un método analítico suficientemente sensible y específico para la determinación de la actividad de RNasa P, se podrán detectar alteraciones en la función de la ribozima bacteriana *in vitro* con el fin de identificar moléculas de bajo peso molecular que tengan un efecto modulador negativo en la catálisis de esta ribozima.

Tras el trabajo anterior, de lograrse identificar algunas moléculas con esta actividad, se podrá afectar el procesamiento de tRNAs en especies bacterianas, ya sea mediante la inhibición de la formación de la holoenzima o por una interferencia en su mecanismo catalítico. Por ende, el efecto farmacológico de esto resultará atenuante, o incluso letal, para los microorganismos. Además, debido a que evolutivamente la RNasa P eucarionte ha divergido de las bacterianas, se espera no tener afinidad con los compuestos identificados sobre los complejos eucariontes, sino un efecto específico sobre la holoenzima procarionte.

Finalmente, estas moléculas de bajo peso molecular que actúan como ligandos sobre la RNasa P serán susceptibles de optimizarse, tanto en su función como en afinidad, con el fin de diseñar nuevas moléculas antibacterianas cuyo blanco racional sea la holoenzima RNasa P bacteriana. Este proyecto se hace posible ya que actualmente se tiene suficiente información estructural y funcional disponible sobre la RNasa P, además de que en nuestro grupo de investigación se cuenta con experiencia en el trabajo experimental con RNA y con esta ribozima, específicamente.

Por otra parte, la identificación de moléculas pequeñas inhibitoras para RNasa P será posible para más de 1,000 fragmentos por el uso de un ensayo funcional de alto rendimiento en microvolúmenes. Con esto, el tamizaje de las bibliotecas de compuestos disponibles será factible en cuestión económica, temporal, de recursos físicos, técnicos y humanos en el laboratorio.

a. Objetivos

Derivado de la hipótesis anterior, el objetivo general de este proyecto es diseñar un ensayo de alto rendimiento para posibilitar la identificación de moléculas de bajo peso molecular para su uso como potenciales fármacos antibacteriales para la inhibición de la función de la RNasa P.

Los objetivos específicos del proyecto son:

1. Diseñar y optimizar un ensayo de actividad enzimática de RNasa P mediante una estrategia de alto rendimiento para monitorear su función bajo distintas condiciones de actividad
2. Proponer metodologías alternas basadas en fluorescencia, capaces de escalar a alto rendimiento, para el análisis de plegamiento y unión de ligandos al RNA
3. Identificar moléculas de bajo peso molecular que se unan a la RNasa P holoenzima bacteriana con el fin de afectar la función de la holoenzima (impedir la formación de la holoenzima, disminuir la afinidad al sustrato o la eficiencia catalítica) utilizando la tecnología de diseño de fármacos basados en fragmentos

3. Materiales y métodos

a. Purificación de las subunidades de RNasa P

La subunidad P RNA de *Thermotoga maritima* (TmR), de 338 nucleótidos (110 kDa), se prepara con transcripción *in vitro* con el método reportado por Reiter (2010) usando protocolos estándar de T7 RNA polimerasa. La secuencia del gen P RNA se clona en el vector pUC19 entre los sitios de restricción de *FoKI*, proporcionado amablemente por el Dr Alfonso Mondragón, del departamento de Biociencias Moleculares de la *Northwestern University*. Se realiza una *maxiprep* para obtener alrededor de 1-3 mg del DNA plasmídico con el gen P RNA. Se purifica el plásmido por ultracentrifugación a 90,000 RPM por gradiente de CsCl con bromuro de etidio para identificar las bandas y extraerlas.

Se digiere el plásmido con *FoKI* a 37°C por 1hr (1U/μg DNA en buffer 4, NEB) y se realiza la transcripción *in vitro* del gen con la cantidad de DNA total obtenido, habitualmente entre 1.5 y 3mg, (dNTP 42mM, RNAsin 2000U, RNA polimerasa T7 2.5mg en 10ml totales) durante toda la noche, o al menos 6 horas. Se obtienen el P RNA, el cual se purifica por electroforesis desnaturizante por urea en gel de poliacrilamida (PAGE) al 6% de 30x30 cm (Adjustable Nucleid Acid Sequencing Kit, 33cm width, model SG-400-33, CBS Scientific Co.). Se localiza por su sombra en el UV, se recupera del gel por difusión con 50mM acetato de potasio pH 7, cloruro de potasio 0.2M, y se precipita en frío con etanol. Los rendimientos obtenidos fueron de 1 a 3 mg de RNA con buena calidad y pureza, monitoreada por los cocientes 260/280 y 260/230. Se monitorea la pureza del producto en geles de poliacrilamida (PAGE) desnaturizantes (urea 7M, amortiguador TBE 1x) al 6% de 15x15 cm (Vertical Slab Gel Unit, The Sturdier, Model SE400, Hoefer Scientific Instruments). Dicho método de visualización, en PAGE al 18%, se emplea también para monitorear actividad posteriormente, ya sea sin o con bromuro de etidio dependiendo de la cantidad inicial de RNA.

La producción y purificación de la proteína P de *Thermotoga maritima* (TmP) para la reconstitución de la RNasa P holoenzima se realiza con el protocolo reportado por

Krivenko y colaboradores (2002). La cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS se crece en medio LB con antibiótico a 37°C, en agitación vigorosa, transformada con el vector pGEX4Ta con el gen *rnpA* que codifica para la proteína P. Dicho vector tiene promotor T7 *tac* y la etiqueta de fusión GST en el N-terminal de la proteína con un corte proteolítico de trombina. A una densidad óptica de 0.4, se induce la expresión del plásmido con la adición de 1mM IPTG, continuando el cultivo por 6-7 hrs en las mismas condiciones.

Se centrifuga el cultivo a 5,000xg, se resuspende en un volumen apropiado de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 4 mM EDTA, 10%(v/v) glicerina, 0.1%(v/v) NP-40 e inhibidores de proteasas). La suspensión celular se lisa por congelación-descongelación, seguido por un paso de sonicación. Posteriormente, para asegurar la solubilidad de la proteína, se agregan 600 unidades NIH de trombina por cada 40ml de lisado celular obtenido de 1L de cultivo de expresión. 1 unidad NIH de trombina es igual a 1.1 - 1.3 IU de trombina, dependiendo de la influencia del PEG en el ensayo (Gaffney, 1995). Para minimizar la pérdida de proteína P por agregación con los ácidos nucleicos, se adiciona urea en polvo a una concentración final de 5M a la digestión con trombina antes de proceder con la purificación.

La purificación de la proteína P digerida del lisado celular se realiza por cromatografía de intercambio iónico (IEC) de baja resolución (Resina Trisacryl M SP, LKB) en condiciones desnaturizantes (5M Urea), seguido de una IEC de alta resolución (Resina Mono S, Amersham) en condiciones no desnaturizantes. En ambos casos, la columna se eluye con un gradiente lineal de 0.1 - 2.0M NaCl en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2 mM EDTA. La proteína P eluye entre 0.75 - 1.20M NaCl en condiciones desnaturizantes, y entre 1.25 - 1.50 M NaCl en condiciones no desnaturizantes. Se monitorea la pureza del producto en geles de poliacrilamida (PAGE) desnaturizantes. La proteína purificada se dializa contra 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2 mM EDTA, y se concentra a aprox. 14mg/ml en un filtro Centricon® 10 (Millipore), con corte a 10 kDa de MW. La proteína purificada se puede conservar en refrigeración a 4°C hasta por un año, sin observarse precipitación o degradación significativa (Krivenko, 2002).

El pre-tRNA usado como sustrato canónico es pre-tRNA de fenilalanina (Phe pre-tRNA) de *T. maritima* de 76 nucleótidos (26 kDa), con 9 nucleótidos de secuencia 5'-líder. Dicho sustrato se prepara con transcripción *in vitro* con el método reportado por Reiter (2010) usando protocolos estándar de T7 RNA polimerasa. La secuencia del gen del P RNA se clona en el vector pUC19 entre los sitios de restricción de *BsmAI*, plásmido proporcionado amablemente por el Dr Alfonso Mondragón, del departamento de Biociencias Moleculares de la *Northwestern University*. Se realiza una *maxiprep* para obtener ~3-4 mg del DNA plasmídico con el gen del tRNA inmaduro. Se purifica el plásmido por ultracentrifugación a 90,000RPM por gradiente de CsCl con bromuro de etidio para identificar las bandas y extraerlas.

Se digiere el plásmido con *BsmAI* a 55°C por 1hr (1U/μg DNA en buffer 4, NEB) y se realiza la transcripción *in vitro* del gen con la cantidad de DNA total obtenido, habitualmente 3mg, (dNTP 42mM, RNasin 2000U, RNA pol T7 2.5mg en 10ml totales) durante toda la noche, o al menos 6 horas. Se recupera el pre-tRNA, el cual se purifica por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (PAGE) al 6% de 30x30cm (Adjustable Nucleid Acid Sequencing Kit, 33cm width, model SG-400-33, CBS Scientific Co.). Se localiza por su sombra en el UV, se recupera del gel por difusión con 50mM acetato de potasio pH 7, cloruro de potasio 0.2M, y se precipita en frío con etanol. Los rendimientos obtenidos fueron de 3-4 mg de RNA con buena calidad y pureza, monitoreada por los cocientes $^{260}/_{280}$ y $^{260}/_{230}$. Se monitorea la pureza del producto en geles de poliacrilamida (PAGE) desnaturizantes (urea 7M, buffer TBE 1x) al 6% de 15x15cm (Vertical Slab Gel Unit, The Sturdier, Model SE400, Hoefer Scientific Instruments). Dicho método de visualización, en PAGE al 18%, se emplea también para monitorear actividad posteriormente, ya sea sin o con bromuro de etidio dependiendo de la cantidad de RNA empleada.

b. Reconstitución de la ribozima RNasa P

La reconstitución de la RNasa P holoenzima se lleva a cabo mezclando a una concentración de ~300nM la subunidad de P RNA con la proteína P en proporción de 1:1.1 en buffer TH 1x (Tris pH7.4 33mM, HEPES 66mM) y acetato de amonio 400mM. Se calienta la mezcla a 94°C por 2 minutos en baño María, se enfría a 0°C por 2

minutos y se agrega $MgCl_2$ 100mM. Se cuantifica, por espectrofotometría de volúmenes bajos con el equipo NanoDrop ND-100, la concentración final de la holoenzima para su uso en los ensayos de actividad. Se almacena en refrigeración para uso próximo o se congela a $-20^{\circ}C$ por 1 o 2 semanas.

El protocolo de plegamiento de RNA sin proteína P se realiza mezclando P RNA a una concentración final de 150nM en buffer TH 1x (Tris pH7.4 33mM, HEPES 66mM) y acetato de amonio 400mM. Se calienta la mezcla a $94^{\circ}C$ por 2 minutos en baño María, se enfría a $0^{\circ}C$ por 2 minutos y se agrega $MgCl$ 100mM. Se cuantifica, por espectrofotometría de volúmenes bajos con el equipo NanoDrop ND-100, la cantidad final de la holoenzima para su uso en los ensayos de actividad. Se almacena en refrigeración para uso en próximas horas o se congela a $-20^{\circ}C$ por varios días, incluso varios meses.

La comprobación de actividad se realiza por visualización de sombra en UV en geles de poliacrilamida; se realiza la reconstitución de la RNasa P y el ensayo se lleva a cabo a una concentración final de $20\mu M$ de ribozima, con el sustrato canónico pre-tRNA en concentración alrededor de $45\mu M$. En caso de requerir más definición de las bandas, se usa bromuro de etidio para la visualización. Se lleva a cabo la reacción durante 10 minutos a $50^{\circ}C$, por ser la ribozima de un organismo hipertermófilo capaz de crecer entre 55 y $90^{\circ}C$.

c. Ensayo enzimático de alto rendimiento para RNasa P

El objetivo del diseño experimental es la búsqueda e identificación de inhibidores de unión específicos para la RNasa P mediante ensayos de alto rendimiento con un sustrato fluorescente, en placas de poliestireno negro de 96 pozos de 0.4ml, fondo plano, de baja fluorescencia, sin tratamiento de superficie (Nunc Thermo Scientific, Cat. 265301). Sin embargo, previamente se realizó una caracterización preliminar de la sonda fluorescente en un espectrofluorómetro RF5000U (Shimadzu) en volúmenes convencionales.

El ensayo de reacción para la RNasa P holoenzima reconstituida se lleva a cabo a $45^{\circ}C$ en buffer de actividad TH 1x (Tris pH7.4 33mM, HEPES 66mM). Se optimizaron las cantidades de holoenzima y sustrato para el ensayo de actividad, siendo $20.5nM$ de

holoenzima (concentración del stock recomendada: 400nM) y 210nM de sustrato (concentración recomendada del stock: 4 μ M) las concentraciones mínimas para detectar actividad de RNasa P en un volumen de 60 μ l. Esta concentración está en concordancia con Thakur (2005), quien recomienda que las concentraciones finales para las sondas FRET estén entre 50 y 500nM para obtener buenas proporciones señal-ruido por espectrofluorimetría. Los fragmentos a probar se adicionaron en una concentración de prueba de entre 10-50 μ M de cada uno, esto es, a aproximadamente 20,000-30,000x sobre la concentración de RNasa P para poder distinguir efectos en la actividad.

La ejecución de los ensayos de actividad se realiza agregando el buffer de actividad y la RNasa P holoenzima, o la subunidad de RNA según el experimento a ejecutar, con el fragmento a probar. Se incuba el fragmento y holoenzima por 5 min a 45°C con agitación orbital moderada durante 2 segundos cada 2.5 minutos, y se mide la fluorescencia basal de cada mezcla de reacción. Se inicia la reacción agregando el sustrato minihélice fluorescente – diseñado y presentado en este trabajo – y tomando una lectura de fluorescencia inicial.

El equipo utilizado para los ensayos es un espectrofluorómetro para placas multipozo DTX 880 XS Multimode Detector (Beckman Coulter). Los parámetros a ajustar en el equipo son: Filtro de excitación (nm): 485 SL 1; Filtro de emisión (nm): 535 SL 1; Tiempo de integración (segundos): 3, lectura superior de la fluorescencia de cada pozo, detectada en modo *Cinético*, sin agitación, con lecturas al menos 10 lecturas cada 90-120 segundos. De las curvas cinéticas obtenidas de Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU por sus siglas en inglés) vs. tiempo, se calculan las pendientes máximas a 7 puntos por un método de regresión lineal con el software Multimode Detection Software (versión 2.0.0.12). Posteriormente, en una hoja de cálculo electrónica se realiza la transformación manual y el análisis de las pendientes a unidades nanomolares de sustrato por minuto con una calibración de RFU vs. concentración de sustrato hidrolizado para obtener una medida de actividad enzimática relativa. Se comparan los valores de velocidad para detectar cambios en la actividad contra controles sin inhibidores analizados en el mismo lote de ensayos.

Debido a que hay evidencia de que el DMSO aumenta la actividad de la subunidad de RNA de la RNasa P (Kazakov, 1991), en los controles experimentales para comparación de actividad se adicionó DMSO o PEG en la concentración respectiva dependiendo de la solubilidad de los fragmentos a prueba. En la tabla 3 se muestran los ensayos control que se realizaron para evitar artefactos y para establecer una escala de actividad relativa calculada por el aumento de fluorescencia que se espera observar durante la evaluación de los inhibidores de la RNasa P.

i. Stocks de reactivos para ensayo en alto rendimiento

- Para los ensayos de alto rendimiento, se recomienda almacenar una dilución a 3.6-4 μ M de la sonda FRET a -20°C y protegida de la luz, para asegurar su estabilidad.
- La concentración inicial de fragmentos dependerá de la biblioteca comercial de estos compuestos, sin embargo se recomienda diluir la solución original de fragmentos a alrededor de entre 0.1 y 1mM en agua tratada con DEPC (sólo en caso de ser posible debido a la limitada solubilidad acuosa de estos compuestos por lo general). Esto con el fin de optimizar el manejo de volúmenes para alcanzar la concentración propuesta en el diseño del ensayo al hacer la mezcla de reacción.
- El buffer de actividad TH se preparará a 10x y se diluirá a 1x al realizar los ensayos individuales.

ii. Ensayos individuales y controles experimentales

- El volumen final mínimo de los ensayos está estandarizado en 60 μ l para placas de 96 pozos (Volumen de pozo: ~400 μ l).
- En la tabla 3 se encuentran descritas las condiciones de los experimentos control realizados para la estandarización del ensayo de alto rendimiento para RNasa P.

Tabla 3. Experimentos control para la estandarización del ensayo enzimático.

Control	Proteína P	P RNA	Sonda FRET	Fragmento	DMSO	MgCl ₂ [300mM]	Buffer actividad TH	Actividad/ Comentario
1							X	#
2	X	X	X		X		X	100%
3	X		X		X		X	0%*
4	X	X		X	X		X	°
5		X	X		X		X	^
6		X	X		X	X	X	~
7	X	X	X				X	+

"X" indica que el reactivo mencionado se incluye en el experimento control planteado

Fluorescencia basal debida a la placa o a la solución de amortiguador

* Para determinar la tasa de degradación química de la sonda FRET

° A realizarse en todos los ensayos, previo al inicio de la reacción. Se esperan nulos cambios en la fluorescencia, no evidenciando actividad enzimática

^ Se espera una tasa catalítica muy baja

~ Se espera un aumento en la tasa catalítica respecto al ensayo anterior

+ Ensayo para detectar la actividad basal de la ribozima sin el efecto activador del DMSO (Kazavok, 1991)

iii. Consideraciones para el diseño de la minihélice FRET para actividad de RNasa P

Para el diseño del sustrato en el que se fundamenta el presente proyecto se tomaron en cuenta las necesidades y el estado del arte alrededor de la enzimología de la RNasa P en el momento del desarrollo del proyecto. En la presente sección se describirá el proceso seguido para poder llegar al diseño de la sonda sustrato para los ensayos en alto rendimiento de la RNasa P.

En primer lugar, se requirió utilizar una secuencia de ribonucleótidos que fuera reconocida por la ribozima para ser catalizada, así como que esta cumpliera con criterios para seleccionar los pares resonantes fluorescente óptimos (Johansson, 2006). Las sondas para los ensayos con estas moléculas fluorescentes son efectivos y reportan una interacción FRET en distancias moleculares entre 10-100Å (Klostermeier, 2002), por lo que las sondas de RNA candidatas para el presente ensayo se deben

diseñar con longitudes menores a 100Å entre sus dos extremos. El ancho promedio de un nucleótido es de 0.34nm (3.4Å), por lo que la sonda diseñada, de encontrarse sin plegamiento y a su máxima extensión, debe ser menor a 30 nucleótidos; en caso de ser más larga, se debe buscar una alta probabilidad de plegamiento del RNA en donde ambos extremos permitirían a las moléculas del FRET a estar cercanas entre ellas.

Por otro lado, la mayoría de los compuestos que se incluyen en la Biblioteca R₀3-1000 de Maybrige son visiblemente coloridos, teniendo colores rojizos y amarillos en solución acuosa. Es por eso que el marcaje de FRET fue seleccionado para tener longitudes de onda activas entre 400 y 570nm (espectro visible violeta a verde) para evitar interferencias potenciales de las moléculas de bajo peso molecular probadas.

Tras una revisión bibliográfica exhaustiva, se encontró que la información sobre los múltiples sustratos de RNasa P es extensa, pero hay poco reportado alrededor de oligonucleótidos pequeños (<20 nt). Experimentos, como los realizados por Liu (1996) y Altman (2005), describen una serie de mRNAs menores a 100nt y riboswitches que tienen sitios de corte para RNasa P, como el de la coenzima B₁₂ y de la arginasa, entre otros. Los sustratos identificados para la ribozima de estudio son pre-tRNAs, de los que existen alrededor de 16 diferentes; mRNAs de operones bacterianos; RNAs no codificantes, como el 2S y 4.5S; secuencias de RNA que pueden funcionar como mensajeros y de transferencia, llamados tmRNA; snoRNAs; y algunos RNAs antisentido de fagos (Bränvall, 2007; Liu, 2010; Altman, 2011). Como se hace evidente por la diversidad de sustratos sobre los que lleva a cabo la catálisis, esta ribozima es un buen blanco farmacológico por ser de alta importancia fisiológica.

Con el conocimiento de algunas secuencias sustrato para RNasa P, se han identificado las características mínimas básicas para poder ser reconocidos, unidos y cortados por la RNasa P. Experimentos de Liu (1996) demostraron que un oligonucleótido de 8-12 nt de RNA puede ser procesado por el P RNA, el cual debe formar necesariamente un dúplex de 3-7 pb. Por lo tanto, concluyen que un sustrato incluso tan pequeño como de 3pb puede ser escindido por P RNA. Las secuencias 3'-CCA y una cadena líder en 5' son importantes para la eficiencia catalítica, pero no indispensables para el corte ni para seleccionar el sitio de escisión por la ribozima. Especialmente para el sustrato usado por Liu (1996), la secuencia 3'-CCA fue

particularmente importante para la proximidad de la secuencia sustrato al sitio activo. Sin embargo, se cuantificó que un sustrato mínimo (phe7) es hidrolizado por P RNA al menos 100 veces más lentamente que un pre-tRNA, por lo que se puede confirmar el amplio universo de sustratos de RNA para la RNasa P, sin embargo compromete su eficiencia catalítica.

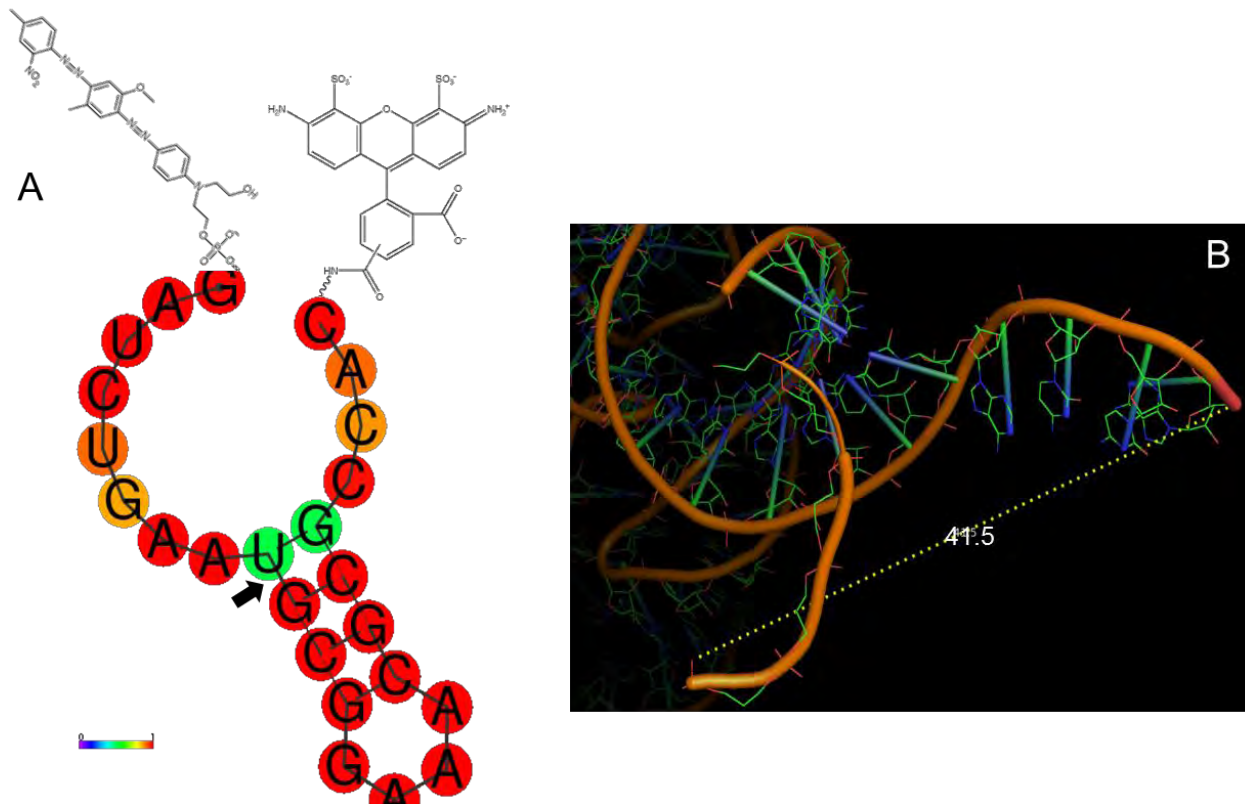


Fig. 18. **A.** Sustrato minihélice FRET propuesto en este proyecto con su plegamiento secundario predicho con el servidor RNAFold Web, con colores indicando probabilidades de plegamiento de las bases (Rojo indica probabilidad de posición de 1; azul indica probabilidad nula de la posición). Se incluye, de manera esquemática, una representación de las moléculas del par FRET añadidas a la sonda de RNA, estando en el extremo 3' el fluoróforo Alexa Fluor 488 y en el extremo 5' el extintor BHQ, aspecto que será detallado más adelante en el texto. La flecha negra indica el sitio de corte canónico de RNasa P. **B.** La distancia calculada entre el tRNA maduro y la cadena 5'-líder es de 41.5Å (Código 3Q1R, PDB).

Con los criterios anteriores, el sustrato candidato que mejor cubría los requerimientos fue la minihélice pMini3pbUG (Fig. 18.A), cuya cinética de catálisis por la RNasa P fue descrita por Brännvall (2007). La secuencia candidata de 24 nucleótidos (5'-GAU CUG AAU GCG GAA ACG CGC CAC -3') tiene una tendencia alta a adquirir una estructura secundaria, predicha por el servidor RNAFold Web Server (Gruber,

2008), con un plegamiento termodinámicamente espontáneo (-7.30 kcal/mol) (Fig. 18.A). Un análisis estructural del sustrato completo pre-tRNA (Fig. 18.B) muestra que su plegamiento dejará el extremo 5' del 3' separado por ~40Å. Mediante este análisis, puede ser inferido indirectamente que el sustrato minihélice elegido tendrá una separación entre sus extremos 3' y 5' menor al valor mencionado, principalmente por ser de menor tamaño, en comparación con el pre-tRNA completo, y por la predicción de su plegamiento.

De los experimentos cinéticos de Bränvall & cols. (2007) acerca de esta mini-hélice para RNasa P, se confirmó que el corte del sustrato reducido pMini3pbUG por P RNA es dependiente de Mg^{2+} . Además, se encontró que este sustrato redujo su afinidad (K_d) y la eficiencia catalítica de la reacción en 40 y 10 veces respectivamente, cuando se compara con los parámetros enzimáticos de un pre-tRNA de tamaño completo.

Para este sustrato diseñado, se usó el par de fluoróforos/extintores (o *quenchers*, por su nombre de uso ampliamente extendido): Alexa488/BHQ1 (o BHQ2), de acuerdo a los resultados de Marras & cols. (2002), buscando una eficiencia de extinción alta (>90%) con FRET y por contacto entre las moléculas (Fig. 17), así como por la disponibilidad comercial del reactivo con proveedores conocidos (*Sigma Proligo* e *Integrated DNA Technologies, Inc.*). La interacción de la sonda (fluoróforo y extintor) con la luz se describe, junto con otras características, en la tabla 4.

Respecto a la posición de las moléculas que tendrán la interacción FRET en la sonda, estas tienen la orientación propuesta porque la base guanina ejerce un efecto extintor sobre los fluoróforos (Thakur, 2005), por lo que se debe evitar que éste se posicione en el extremo 5' de la sonda propuesta. Sin embargo, la eficiencia del marcador-extintor debe ser determinada de manera empírica (TriLink BioTechnologies, 2012), ya que ésta depende de la sonda diseñada y del entorno del ensayo. Para disminuir posibles impedimentos estéricos entre la sonda FRET con el sitio catalítico de la RNasa P, se seleccionó las dos moléculas más pequeñas posibles y con mejores características de solubilidad. Por lo tanto, como primera opción se sintetizó el par 5'-BHQ1 – Alexa 488-3' (Fig. 18.B), mientras que la opción dos fue el par 5'-BHQ2 – Alexa 488-3', que también fue probada con el presente método de alto rendimiento.

Tras todas estas consideraciones, se diseñó la sonda FRET para la actividad de la RNasa P, cuyas características anteriormente descritas están resumidas en la tabla 4. Suponiendo una concentración final de la sonda FRET de 100nM, como se ha propuesto antes, se calculó que con 100nmol de material inicial de la sonda diseñada se tendría suficiente material inicial para realizar alrededor de 1,350 ensayos individuales en microvolúmenes. Esta cantidad de ensayos fue suficiente para la estandarización del método, corridas iniciales, ensayos control, replicados técnicos y la prueba de las 1000 moléculas de fragmentos incluidos en la librería de Maybridge R₀3-1000 y la biblioteca de fragmentos pequeños de Zenobia.

Tabla 4. Resumen de las consideraciones para el diseño de la sonda FRET.

Elemento/ Propiedad	Característica seleccionada	Detalle / Referencia
Fluoróforo	Alexa Fluor 488	λ excitación máx (nm): 494 λ emisión máx (nm): 517 λ absorbancia máx (nm): 495
Extinción (Q) con Alexa 488	Black Hole Quencher 1 (A _{máx} 534nm)	Q _{FRET} = 91 Q _{contact} = 95 (Marras, 2002)
	Black Hole Quencher 2 (A _{máx} 580nm)	Q _{FRET} = 91 Q _{contact} = 93 (Marras, 2002)
Posición de fluoróforos	5'-BHQ - Alexa 488-3'	G en extremo 5' puede ejercer apagamiento sobre fluoróforo
Interacción sonda - luz	Coeficiente de extinción $\sim 288,244 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $\text{nmol}/\text{OD}_{260} = 3.47$ $\mu\text{g}/\text{OD}_{260} = 30.82$	Predicción teórica (TriLink BioTechnologies, 2012)
Secuencia	5'-GAU CUG AAU GCG GAA ACG CGC CAC -3'	(Bränvall, 2007)
Tamaño	24 nucleótidos / Distancia entre extremos $\sim 40\text{Å}$	Peso Molecular = 8,947.7g/mol
Estructura secundaria	Predicción con alta probabilidad de formar un tallo (Fig. 18.A)	Predicción teórica (RNA fold Web Server)

d. Ensayo térmico para RNA

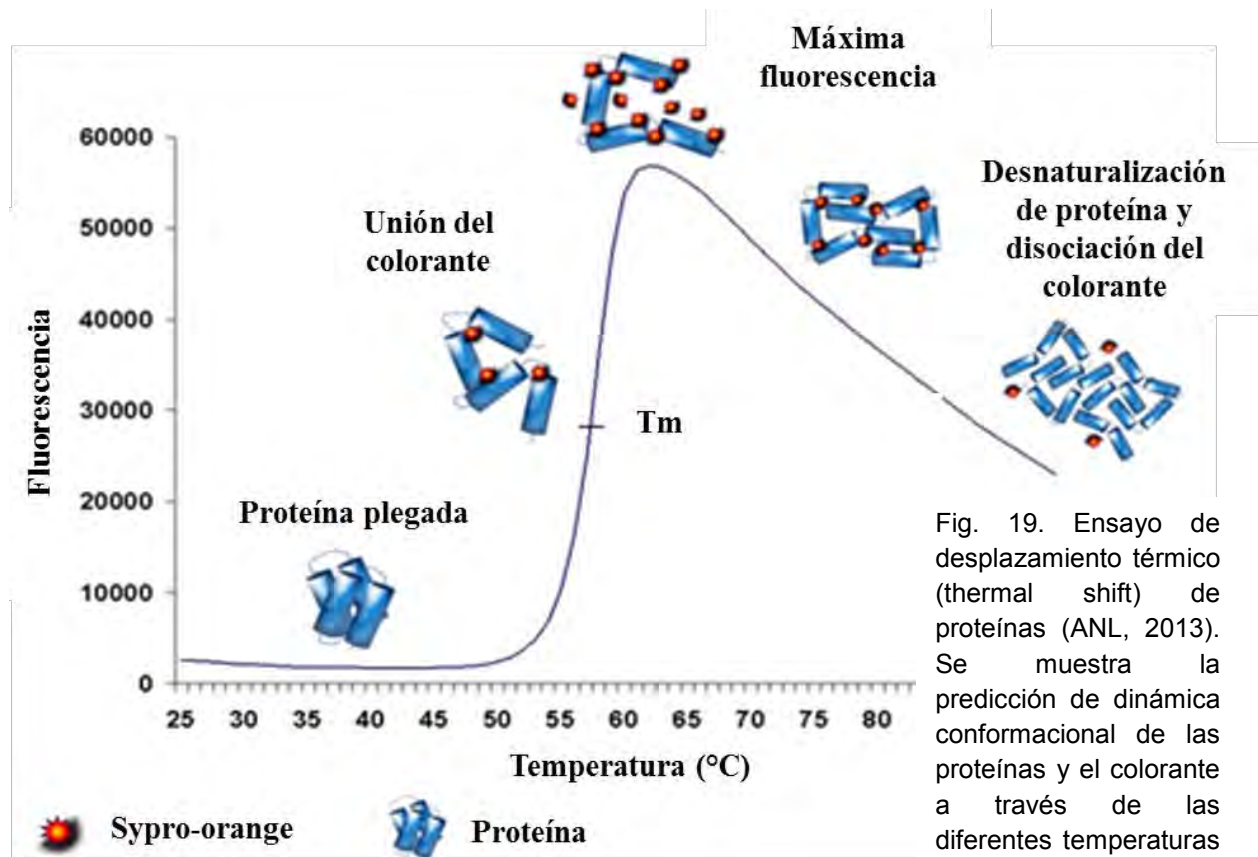
Para analizar el cambio conformacional de RNasa P ante los fragmentos seleccionados, se diseñó un método para monitorear el plegamiento del RNA dependiente de la temperatura. Estos experimentos, de manera análoga a la metodología de desplazamiento térmico (*Thermal Shift*) para cambios conformacionales de proteínas, se espera que provean información relacionada con la interacción de la molécula de estudio con posibles ligandos o la estabilidad de las macromoléculas en diferentes soluciones amortiguadoras o condiciones del medio al experimentar una rampa de temperatura.

El fundamento se basa en el desplegamiento temperatura-dependiente de las proteínas, el cual se monitorea por la unión del colorante Sypro-Orange, un compuesto hidrofóbico con afinidad a las zonas internas de las proteínas. Al unirse esta molécula pequeña a las proteínas al desplegarse (Fig. 19), se presenta un incremento de la fluorescencia antes extinta por estar el colorante en un ambiente acuoso (Lo, 2004). Esto se registra en un detector de fluorescencia a alrededor de 600nm, excitando a 490nm (Life Technologies, 2011).

El parámetro comparativo importante entre las curvas de temperatura vs. fluorescencia es la temperatura en la cual la mitad de la concentración de proteína se encuentra totalmente desnaturalizada y con unión total al colorante y la otra mitad se encuentra en su forma nativa y sin desplegamiento, denominada *T_m* (*melting temperature*). Un incremento o corrimiento de *T_m* a la derecha se asocia de manera común con una mayor estabilidad de la proteína en la condición de prueba, mientras que la disminución en el valor de *T_m* implica la desestabilización de la macromolécula (Fig. 19).

Bajo el mismo planteamiento se diseñó el ensayo de desnaturalización térmica para ácidos nucleicos, específicamente para RNA. Esto fue posible gracias a que es ampliamente conocida la unión de moléculas, como el bromuro de etidio, a los ácidos nucleicos por intercalamiento no covalente entre las bases. Específicamente, para el caso del bromuro de etidio, la interacción ocurre por apilamiento del anillo planar de fenantridinio con un par de bases adyacentes, mostrando especial afinidad por secuencias de purina-pirimidina (Krugh, 1975), por ejemplo, GpC. Dicha interacción

RNA-BrEt causa un incremento en la fluorescencia a $\sim 600\text{nm}$, al excitarse con una longitud de onda óptima de $\sim 300\text{ nm}$, o con menor eficiencia de absorción en $\sim 500\text{nm}$ (Fig. 19). Con este hecho, se espera que a medida que la temperatura aumente, la fluorescencia disminuya por una desnaturalización del RNA y consecuente pérdida de contactos con bromuro de etidio.



El equipo usado fue un sistema de PCR en tiempo real StepOne™ (Applied Biosystems), propiedad del Departamento de Genética Molecular, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en el cual se midieron placas ópticas de 48 pozos de 0.1ml, fondo cónico, para PCR (Fast Optical 48-well reaction plate, Applied Biosystems). Las corridas se efectuaron durante 1 hr 30 min (metodología *fast run*) en una curva de 25 a 99°C, excitando las reacciones a 493nm y detectando la emisión a 620nm (protocolo de lectura de colorante ROX). Se realizó una caracterización (datos no mostrados) en la que se estudió el comportamiento de estos ensayos con los protocolos incluidos en el equipo para los colorantes FAM y SYBR GREEN, sin

embargo los resultados mostraban bajas eficiencias en la fluorescencia para los dos protocolos adicionales mencionados.

Los ensayos de reacción, en un volumen total de 10 μ l, se prepararon en buffer THAM 1x (Concentración Final: HEPES 86mM, Tris pH 7.4 43mM, AmOAc 167mM y MgCl₂ 16.6mM), agregando concentraciones de RNA desde 0.5 hasta 90 μ M. La mezcla de reacción se calienta a 90°C por 2 minutos, se enfría a 0°C por 2 minutos y se agrega bromuro de etidio 0.25 μ g/ μ l.

Para los ensayos tradiciones de desplazamiento térmico para proteínas – procedimiento que no aplica exactamente para la variante del ensayo empleada para ácidos nucleicos en el presente proyecto -, los datos obtenidos se analizan con el software StepOne v2.2.2 (Applied Biosystems) para obtener las T_m en cada experimento. Este parámetro se calcula automáticamente derivando la curva de fluorescencia normalizada y determinando el valor máximo de este cálculo. Visualmente, en las curvas derivadas la T_m es el pico en la gráfica de temperatura vs. fluorescencia derivada. De las curvas normalizadas (no derivadas), la T_m se puede encontrar en el medio entre el valor de la máxima y la mínima fluorescencia (Fig. 19), zona que se conoce como ROA (Life Technologies. 2011), por las siglas en inglés de región de análisis (*Region Of Analysis*).

Cabe destacar que con altas concentraciones de ácidos nucleicos para este ensayo, es decir a partir de 20 μ M, el perfil resultante que se obtiene cuando se convierten los espectros a fluorescencia derivada es claro y se observan picos que se podrían correlacionar con la T_m obtenida en los experimentos en proteínas (Ver discusión en la Sección 4.d). Sin embargo, a medida que se reduce la concentración de RNA, la intensidad de fluorescencia en la curva obtenida es consecuentemente menor y el cociente señal/ruido es más bajo, dando lugar a análisis artefactuales.

Es por eso que en los experimentos realizados en este proyecto, donde se trabajó con una concentración baja de RNasa P (1 μ M) o pre-tRNA, - tal como se discute y justifica en la sección correspondiente - se optó por el análisis en las curvas de fluorescencia normalizada (no derivada) para estudiar los efectos de la temperatura y de los fragmentos probados.

4. Resultados y discusiones particulares

a. Reconstitución de RNasa P holoenzima y pruebas funcionales

Se produjo la subunidad de P RNA de la RNasa P con el protocolo descrito y se comprobó la calidad del RNA mediante PAGE y por espectrofotometría. Posteriormente, se realizó el protocolo de reconstitución de RNasa P y se incubó con el sustrato canónico, el cual se produjo también con el protocolo de transcripción *in vitro* descrito.

Se corroboró que la RNasa P reconstituida fue funcional al observar un corte de pre-tRNA al incubarse 10min a 50°C (Fig. 20). Como prueba preliminar de cinética, se monitoreó la reacción tomando muestras de la mezcla cada 2 min (Fig. 21), comprobando que la reacción a 50°C ocurre en 10min para una concentración equimolar de sustrato-ribozima (45µM).

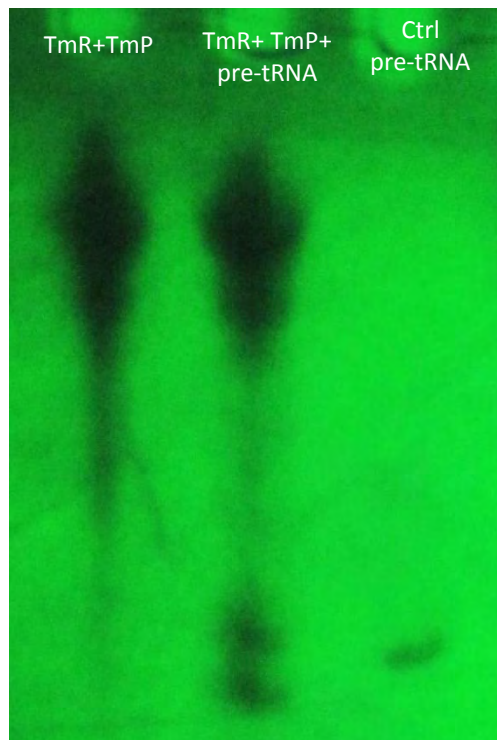


Fig. 20. Comprobación de la actividad de RNasa P. En el carril de en medio, donde se analiza el sustrato se incubado con la RNasa P holoenzima (RNA + proteína), se detectó la aparición de una banda de menor peso a la del sustrato íntegro. Se colocaron controles de RNasa P holoenzima (primer carril) y de sustrato pre-tRNA (última columna), el cual fue incubado con el mismo protocolo de actividad que la RNasa P, pero sin la ribozima (Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 18%).

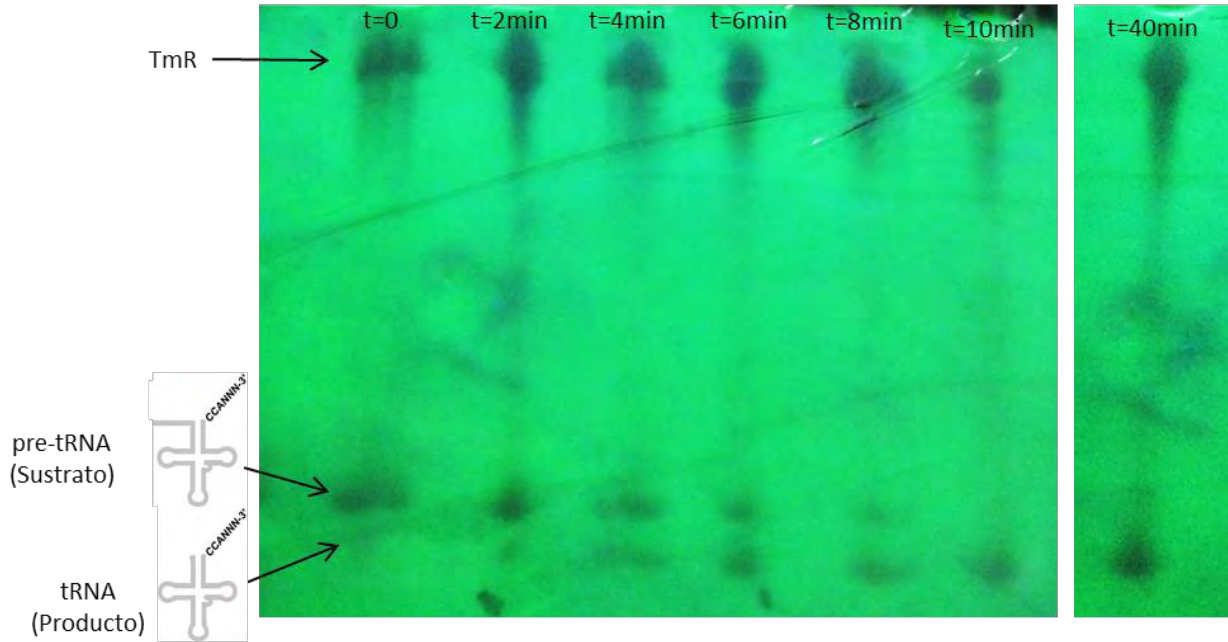


Fig. 21. Cinética de actividad de RNasa P sobre el sustrato canónico pre-tRNA (Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 18%). La banda correspondiente a la subunidad de RNA de la RNasa P se indica como TmR.

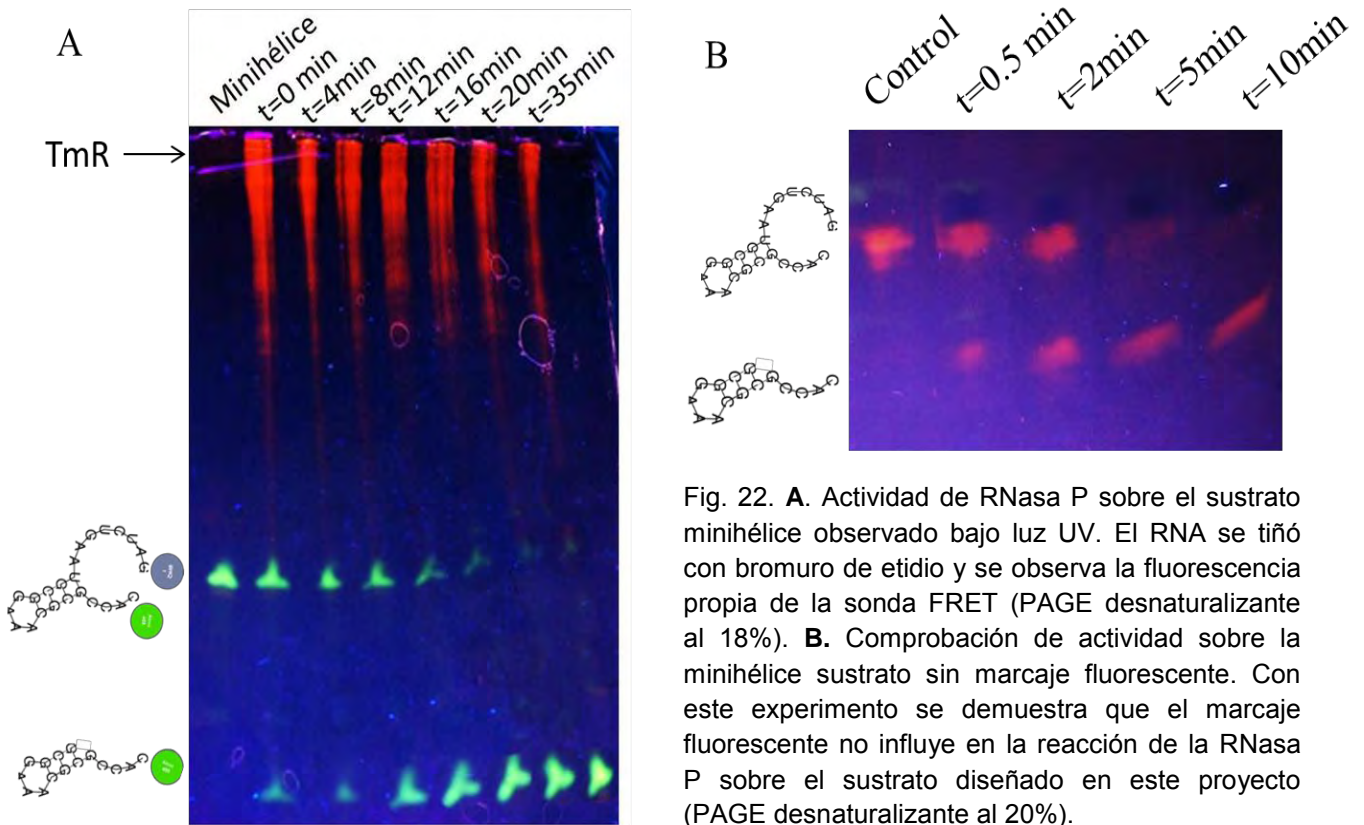


Fig. 22. **A.** Actividad de RNasa P sobre el sustrato minihélice observado bajo luz UV. El RNA se tiñó con bromuro de etidio y se observa la fluorescencia propia de la sonda FRET (PAGE desnaturalizante al 18%). **B.** Comprobación de actividad sobre la minihélice sustrato sin marcaje fluorescente. Con este experimento se demuestra que el marcaje fluorescente no influye en la reacción de la RNasa P sobre el sustrato diseñado en este proyecto (PAGE desnaturalizante al 20%).

Se analizó la utilidad del protocolo de reconstitución descrito con el calentamiento, enfriamiento, y adición de acetato de amonio, encontrando que éste sí es indispensable para obtener la ribozima funcional (gel y datos no mostrados). Se infiere que este protocolo le permite el correcto plegamiento de las subunidades para la asociación funcional de la RNasa P.

Se realizó una cinética de RNasa P con el sustrato minihélice en gel, encontrando que el sustrato FRET presenta una excitación inespecífica bajo luz UV (254nm). Esta excitación provoca una emisión de Alexa Fluor 488 en una longitud de onda estimada en menos de 400nm, por lo que la molécula extintora de la sonda no absorbe dicha emisión y se detecta entonces la fluorescencia emitida por el fluoróforo, tanto en el sustrato de 24 nucleótidos, como en el producto de 15 nucleótidos (Fig.22).

b. Estandarización del ensayo de alto rendimiento para RNasa P

Se comprobó que la RNasa P tiene actividad hidrolítica sobre el sustrato minihélice FRET y se realizó una cinética de actividad durante 20 min a 50°C (Fig. 22.A), ya que se estimaba que por ser un sustrato menos afín se requeriría más tiempo para completar la reacción. Adicionalmente, se comprobó que las moléculas que forman el par FRET en los extremos de la sonda sustrato no afectan la catálisis, ya que la reacción de la ribozima también se lleva a cabo sobre la minihélice sin marcaje fluorescente (Fig. 22.B).

Se caracterizó la fluorescencia del sustrato para corroborar de manera experimental los datos de excitación y emisión reportados por el proveedor para el fluoróforo incluido en la sonda con un espectrofluorómetro RF5000U (Shimadzu). Se determinó un pico de absorbancia en 488nm y una emisión máxima en 518nm, valores teóricos reportados para Alexa 488. También se comprobó de manera preliminar un aumento de la fluorescencia dependiente del tiempo cuando se incubó el sustrato con la RNasa P holoenzima en las condiciones de reacción.

Se procedió a estandarizar el ensayo en bajos volúmenes de alto rendimiento en el espectrofluorómetro para placas multipozo según el procedimiento descrito. Se determinó que las mejores lecturas de fluorescencia se obtuvieron con las condiciones

indicadas sobre el tiempo de integración y la posición del detector sobre la placa. Dadas las capacidades manuales y técnicas, tanto de dispensación de reactivos en las placas como de respuesta del equipo, la máxima lectura simultánea fue de 48 pozos (media placa), para que el tiempo entre lectura de cada pozo no excediera de 3 minutos.

Los primeros ensayos con esta estrategia se destinaron a optimizar las mediciones y la cantidad de ribozima y sustrato minihélice (Mh), así como caracterizar el comportamiento de este sustrato fluorescente para obtener lecturas significativas con el menor gasto de insumos. Se ejecutaron las condiciones control propuestas descritas en *Materiales y métodos* (Fig. 23). Se comprobó, en las longitudes de onda de trabajo, la fluorescencia específica del sustrato minihélice en los ensayos de reacción, así como su estabilidad en el tiempo y su eficiencia de apagamiento por FRET (Fig. 23, 6to pozo).

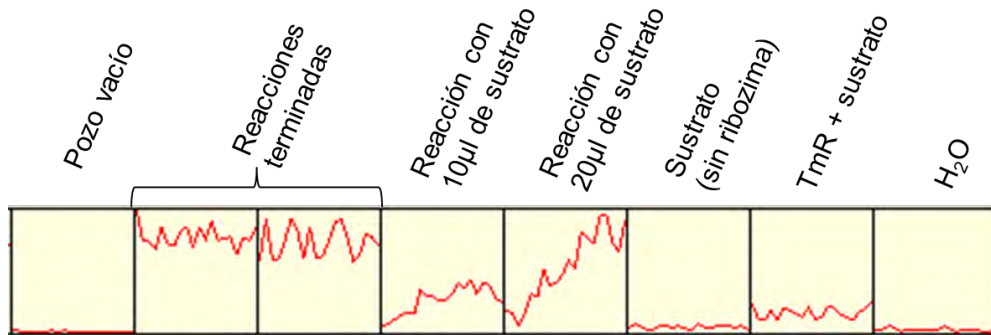


Fig. 23. Estandarización del ensayo en placas multipozos y prueba de condiciones para la estrategia de alto rendimiento.

La figura 24 muestra la calibración del sustrato minihélice, digerido con RNasa A, para poder realizar la conversión de datos de RFU_{\min} resultantes de las cinéticas, a nM de sustrato hidrolizado/ \min . Se observó una correlación lineal de dichas variables hasta la concentración estudiada de $1\mu\text{M}$ de sustrato. Todas las lecturas se realizaron en un volumen de $60\mu\text{l}$ en las placas multipozo usadas para los ensayos de actividad.

Por otro lado, se caracterizó el efecto activador del DMSO (Fig. 25) sobre la actividad de RNasa P ya que los fragmentos de la biblioteca Maybridge se encuentran disueltos en dicho compuesto. Se encontró que la actividad de la RNasa P es aproximadamente dos veces mayor en concentraciones mayores de 50nM del disolvente, rango en el que se encontrarán las concentraciones de trabajo para la prueba de los fragmentos. Sin embargo, por debajo de esta concentración, la activación llega a ser cercana a 7 veces alrededor de los $20\text{-}30\text{nM}$ de disolvente. Dicho efecto

coincide con la activación reportada en la literatura del disolvente DMSO sobre la catálisis de la RNasa P.

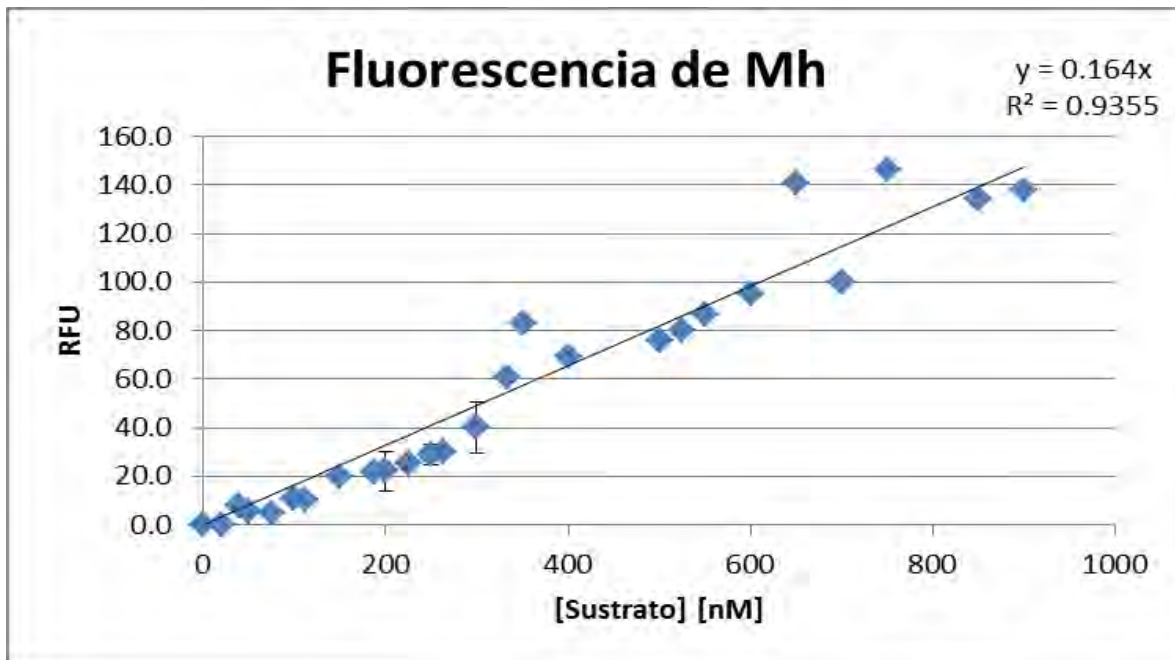


Fig. 24. Curva de calibración de concentración de sustrato (digerido con RNasa A para asegurar una completa digestión) vs. unidades relativas de fluorescencia (RFU) en placas multipozo.

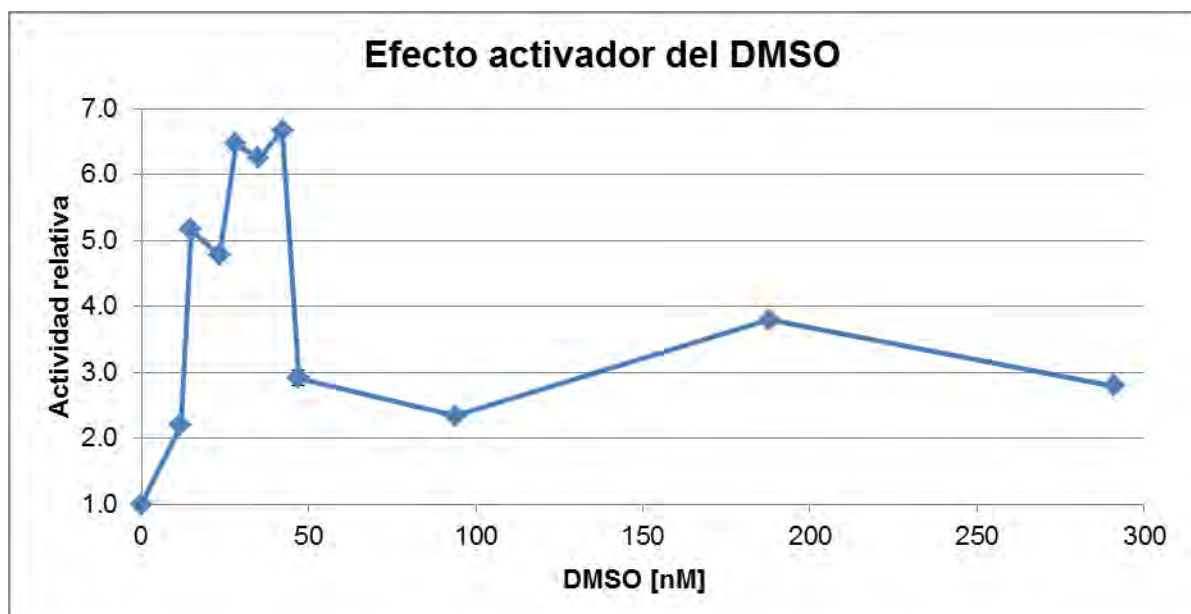


Fig. 25. Caracterización del efecto de la concentración de DMSO sobre la actividad de RNasa P. Se destaca el efecto activador en concentraciones relativamente bajas del disolvente en contraste con el efecto a concentraciones mayores, lo cual será discutido en el texto.

Se sugiere que la fuerte interacción del agua con el disolvente vía puentes de hidrógeno reduce la interacción del agua con la ribozima, lo cual reduce la flexibilidad de la conformación tridimensional de la RNasa P, incrementando la población de moléculas con dicha conformación activa y por tanto incrementando la catálisis sobre los pre-tRNAs.

Por otro lado, el efecto en concentraciones mayor a 50nM de DMSO, donde el efecto activador cae y se estabiliza en alrededor de dos veces la velocidad basal, resulta complejo de explicar con los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, algunas de las explicaciones hipotetizadas para este efecto es que empieza a existir una interacción entre las mismas moléculas de DMSO a estas concentraciones, estimulando la pérdida de contactos del disolvente con el agua. Esto permite entonces que las moléculas de agua vuelvan a solvatar a la estructura de RNA, e incluso a los iones divalentes, favoreciendo nuevamente la flexibilidad de la ribozima. Cabe la mención de que este efecto activador no se encontró con el disolvente de los fragmentos de la biblioteca Zenobia, PEG-400.

El ensayo ya estandarizado permitió cuantificar la actividad de RNasa P, para ejecutar la caracterización de la ribozima con el sustrato minihélice (Fig. 26). Las pendientes obtenidas se graficaron en el software GraphPad Prism[®] 6.01 para obtener los parámetros cinéticos. Se calcularon los parámetros cinéticos para la enzima en concentraciones altas (100mM) y bajas (10mM) de MgCl₂ (Fig. 26.B; tabla 5), corroborando su efecto activador en la ribozima, además de que se encontró que la alta concentración iónica (Mg²⁺) favorece el plegamiento de las estructuras de RNA. En la sección de *Discusiones generales y perspectivas* del presente trabajo se analizan estos parámetros cinéticos obtenidos (tabla 5) y se hará un ejercicio comparativo de los valores contra los reportados en la literatura.

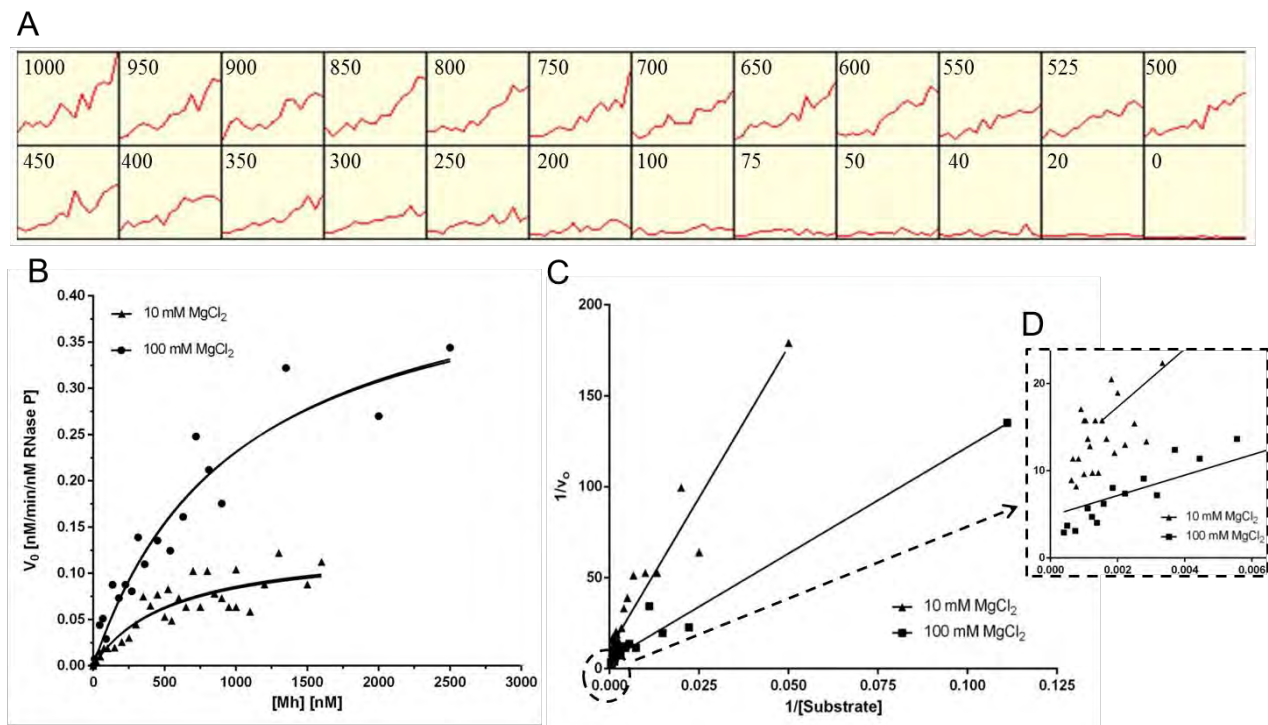


Fig. 26. Caracterización de la actividad de la RNasa P por la estrategia de alto rendimiento. **A.** Curvas de actividad de RNasa P con concentraciones decrecientes de sustrato minihélice (Concentración en μM indicada en cada recuadro). A partir de estas gráficas, las pendientes fueron calculadas para obtener la velocidad inicial de la ribozima. **B.** Ajuste no lineal al modelo de Michaelis-Menten para la RNasa P con el sustrato minihélice en dos diferentes concentraciones de magnesio. **C.** Transformación de Lineweaver-Burk para analizar el ajuste lineal de los datos. A partir de estos modelos se generaron los parámetros cinéticos de la tabla 5. **D.** Acercamiento al origen de la gráfica de la imagen C. (\blacktriangle = 10mM MgCl_2 ; \bullet \blacksquare = 100mM MgCl_2)

Tabla 5. Parámetros cinéticos preliminares de la RNasa P holoenzima con el sustrato minihélice en diferentes concentraciones de MgCl_2 .

Parámetro	10mM MgCl_2	100mM MgCl_2
V_{\max} $\left[\frac{\text{nM sustrato}}{\text{min}} \right]$	9.69	22.92
K_m [μM]	0.54	0.98
k_{cat} [min^{-1}]	0.1292	0.4584
Tiempo de ciclo catalítico	7.74	2.18
k_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$]	0.24×10^6	0.47×10^6
Ajuste no lineal al modelo de Michaelis-Menten	20 concentraciones 33 puntos $R^2=0.78$	20 concentraciones 23 puntos $R^2=0.90$

c. Selección de fragmentos potenciales para inhibición de RNasa P

A partir de los experimentos anteriores, donde se comprobó la actividad de RNasa P, y tras la estandarización y optimización del ensayo, se procedió a probar los fragmentos de las bibliotecas Zenobia y Maybridge. Se realizaron diluciones de trabajo de los stocks originales y se prepararon cocteles de 2, 4 u 8 fragmentos, dependiendo de la disponibilidad y de la organización de las bibliotecas, para las pruebas de los 1,352 compuestos totales analizados en este trabajo.

Para la biblioteca Zenobia los controles se realizaron con PEG-400, mientras que para la biblioteca Maybridge se establecieron controles de actividad con DMSO, por estar solubilizados los fragmentos en el disolvente respectivo. Cabe destacar que, por lo general, se colocó en cada fila de las placas multipozos un control de actividad de RNasa P, agregando el disolvente respectivo (DMSO o PEG-400), para considerar las variaciones experimentales en las cinéticas y para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

En los primeros ensayos, se ubicaron los cocteles de fragmentos que mostraban inhibición a una concentración de $50\mu\text{M}$ sobre $\sim 20\text{nM}$ de RNasa P holoenzima. Se siguió una metodología experimental para separar los fragmentos de estas mezclas anteriores y probarlos individualmente para discernir al fragmento inhibidor del coctel. El anexo 1 muestra los ensayos que permitieron llevar a cabo el proceso de selección de los fragmentos con potencial actividad inhibidora de RNasa P.

El criterio de selección fue por inspección visual de las gráficas, seleccionando los ensayos marcados en rojo en cada anexo. Esta selección se corroboró comparando las gráficas visualmente contra los controles de actividad y posteriormente realizando un análisis numérico de actividad enzimática relativa obtenida de la pendiente del ajuste lineal a 6 o 7 tiempos en cada registro experimental (valores no mostrados) con el Multimode Detection Software. Dicho parámetro se calculó con el fin de tener una base semi-cuantitativa para poder seleccionar ensayos positivos de inhibición.

Se estandarizó el valor relativo de actividad para cada placa con controles internos. La velocidad promedio relativa a concentración de trabajo 1x de PEG-400 o DMSO para usarse como referencia de actividad varía entre placas dependiendo de la concentración de ribozima y sustrato empleada para la realización de dichos ensayos, o

debido a las variaciones experimentales de las lecturas. Para la biblioteca Zenobia, se seleccionaron los siguientes pozos como positivos (Ver Anexo 1), cuya correspondencia en la biblioteca se indica a continuación:

Pozo	D11	D10	B6 / D12	C5	C6	D6
Mezcla Zenobia	1.12	2.01	2.06	3.05	3.06	4.06

En los cocteles de 3 fragmentos (Ver Anexo 1), las mezclas consideradas como positivas fueron sólo los pozos A5, A6, C6 y C7. La correspondencia de estos pozos con las mezclas de 3 fragmentos puede ser revisada en el anexo 1.i. Finalmente, tras la selección de 4 fragmentos potenciales de la biblioteca de Zenobia, se muestran los ensayos individuales (Ver Anexo 1.i y Fig. 27), en donde se detectaron como potenciales positivos los fragmentos 2.01D, 2.06D, 3.05F y 4.06F.

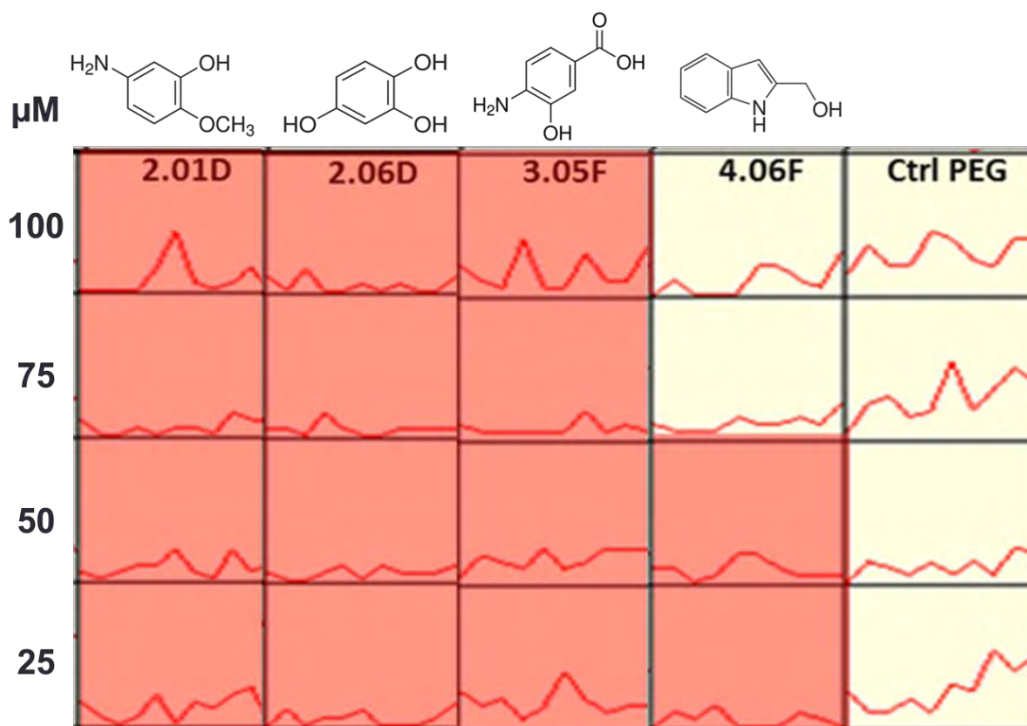


Fig. 27. Ensayos individuales a 4 concentraciones con fragmentos de la biblioteca Zenobia seleccionados según el Anexo 1. Se probaron 4 concentraciones diferentes de cada uno de los fragmentos, de 25 a 100 μM en orden decreciente de manera vertical por columna. Se indica en la primera fila el fragmento evaluado en las 4 celdas hacia abajo de la misma columna y en la parte superior se muestra la estructura química de la molécula correspondiente.

Para la biblioteca de Maybridge, se seleccionaron los siguientes pozos como positivos en las placas respectivas (Ver Anexo 3.i):

- *Placa 1 y 2.* A5, B7, B11, C8, C9 y E11
 - Placas evaluadas de la biblioteca Maybridge: 1 y 2
 - Número de fragmentos a probar de manera individual: 12
- *Placa 3 y 4.* C9, D5, E9, F8 y G4
 - Placas evaluadas de la biblioteca Maybridge: 3 y 4
 - Número de fragmentos a probar de manera individual: 10
- *Placa 5 a 8.* C8, E6 y G8
 - Placas evaluadas de la biblioteca Maybridge: 5, 6, 7 y 8
 - Número de fragmentos a probar de manera individual: 10
- *Placa 9 a 13.* B4, B9, D6, E2, G2 y H2
 - Placas evaluadas de la biblioteca Maybridge: 9, 10, 11, 12 y 13
 - Número de fragmentos a probar de manera individual: 29

Posteriormente, en el anexo 3.ii se muestran los experimentos individuales y los pozos considerados positivos marcados en rojo. La tabla 6 resume los fragmentos potencialmente exitosos para esta biblioteca.

Tabla 6. Fragmentos de la biblioteca Maybridge con actividad inhibidora sospechada.

Pozo en placa de fragmentos individuales <i>(Anexo 3.ii)</i>	Fragmento de Maybridge con actividad inhibidora
B5	3D5
C9	6E6
D2	7C8
D6	8C8
D9	8G8
E2	9B9
E3	9D6
E8	10B5
G3	12B9
G4	12D6
G5	12E2
G9	13B5

Una vez determinados los candidatos potenciales, se efectuaron ensayos con fragmentos individuales con 4 concentraciones distintas para asegurar el efecto sobre la cinética (Ver *Anexo 3.iii*). Las concentraciones probadas fueron 25, 50, 75 y 100 μM , con lo que se intentó identificar una concentración mínima inhibitoria o caracterizar su función, sin embargo la cantidad de concentraciones distintas no fueron suficientes para hacer una buena caracterización, además de que el ruido en algunos ensayos volvió a generar variaciones experimentales.

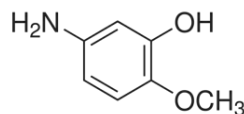
Por una omisión experimental en el manejo de los datos, dichas lecturas no se pudieron realizar para el fragmento 8G8 de Maybridge. Por otra parte, para Zenobia, a pesar de no haber resultado seleccionados en el escaneo anterior, se probaron también los fragmentos individuales 2.04E y 4.06B por no poder concluir, debido a la metodología de selección, un claro efecto inhibitorio sobre la actividad de la RNasa P.

De los 16 fragmentos destacados inicialmente para ambas bibliotecas, se refinó la lista a 7 fragmentos inhibidores potenciales, seleccionándolos en caso de mostrar una inhibición clara en las cinéticas en al menos las tres concentraciones mayores de las 4 probadas de manera individual (Fig. 27 y *anexo 3.iii*).

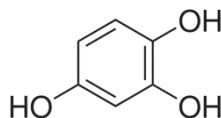
Los compuestos identificados como posibles inhibidores de RNasa P en concentraciones de 20-100 μM , sobre 20nM de RNasa P, se enlistan a continuación (se incluye la coordenada correspondiente de la biblioteca y el número CAS de cada uno):

+ Zenobia:

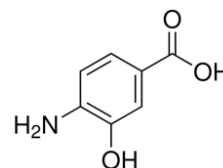
2.01D. 5-amino-2-metoxifenol (CAS 1687-53-2)



2.06D. 1,2,4-bencetriol (CAS 533-73-3)

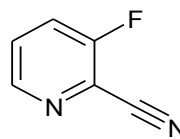


3.05F. Ácido 4-amino-3-hidroxibenzoico (CAS 2374-03-0)



+ Maybridge:

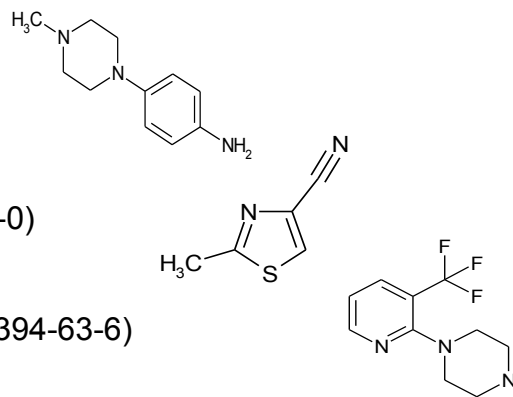
9D6. 3-fluoro-2-piridincarbonitrilo (CAS 97509-75-6)



12B9. 4-(4-metilpiperazin) anilina (CAS 16153-81-4)

12D6. 2-metil-1,3-tiazol-4-carbonitrilo (CAS 21917-76-0)

12E2. 1-[3-(trifluorometil)-2-piridil]piperazina (CAS 87394-63-6)



Con los resultados obtenidos hasta este experimento, la posibilidad de éxito de encontrar un inhibidor en una biblioteca de fragmentos resultó <1%, específicamente 0.85% para Zenobia y 0.4% para Maybridge. Este porcentaje resulta menor a lo calculado a partir de los ejemplos para este tipo de estrategias (Scott, 2012), que es de ~1% habitualmente para el diseño de fármacos basado en fragmentos. Esta menor tasa de éxito probablemente se deba a que el blanco farmacológico de este proyecto es una molécula de RNA, y no una proteína, éstas últimas con un mayor número de estudios y estadísticas descriptivas sobre diseño de fármacos.

Sobre estos fragmentos elegidos como inhibidores potenciales se continuó trabajando para poder realizar pruebas confirmatorias de actividad monitoreada por PAGE y por el ensayo térmico de RNA. Para dichas actividades se solicitaron los compuestos puros de los candidatos de la biblioteca de Zenobia al proveedor Sigma, mientras que sobre la biblioteca Maybridge sólo están disponibles 2 de los 4 candidatos seleccionados.

d. Ensayo térmico de RNA. Diseño y resultados preliminares

Para el ensayo de desnaturalización térmica para RNA se analizó y comparó el comportamiento de tres diferentes secuencias de RNA: el pre-tRNA sustrato de RNasa P, el sustrato minihélice y la subunidad P RNA, así como el efecto que ejercen los fragmentos seleccionados sobre dichos RNAs.

Debido a que los ácidos nucleicos fluorescen al asociarse con bromuro de etidio a ~600nm, al excitarse con una longitud de onda óptima de ~300nm, o con menor eficiencia en ~500nm (Fig. 28), se espera que a medida que la temperatura aumente, la fluorescencia disminuya por una desnaturalización del RNA y consecuente pérdida de

contacto con bromuro de etidio, cuyo diseño experimental se explicó en la sección 3.d. En las longitudes de onda de trabajo, se realizó la rampa de temperatura descrita en *Materiales y métodos* y se comprobó el efecto de la concentración de bromuro de etidio, además de que se analizaron las diferentes secuencias de RNA de trabajo del presente proyecto. Como se puede observar en la figura 29.A, el perfil de una molécula de RNA es distintivo y puede ser analizado de la siguiente forma: en la medida en que se aumenta la temperatura, disminuye la fluorescencia de la muestra, ya que se pierden contactos del ácido nucleico con el BrEt. Se infiere que este efecto ocurre debido a un desplegamiento de la estructura tridimensional del RNA.

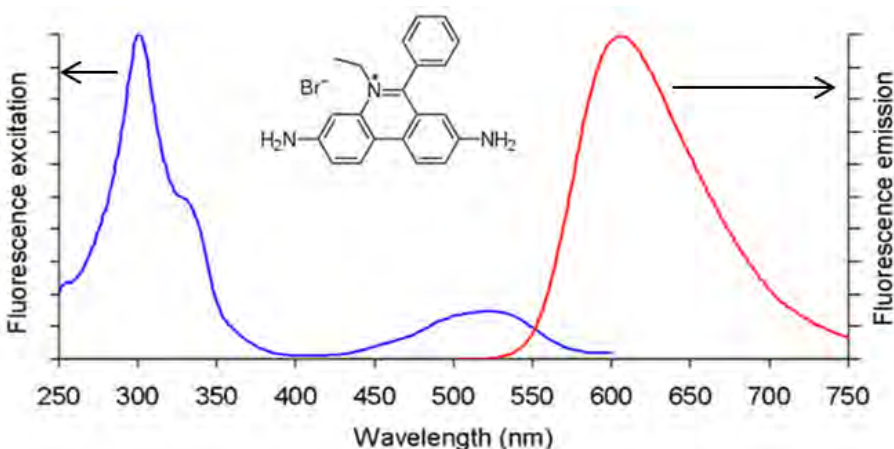


Fig. 28. Espectros de fluorescencia de absorción y emisión de ácidos nucleicos asociados con bromuro de etidio (Life Technologies Corp., 2013).

Por otro lado, el sustrato minihélice fluorescente muestra un comportamiento diferente, incluso se podría considerar inverso a las moléculas no marcadas. Por sí sola, esta sonda presenta fluorescencia, la cual debería incrementar mientras mayor es la distancia entre fluoróforos al desplegarse la sonda por el aumento de temperatura. Basado en esto, las curvas 29.B y 29.C demuestran que ya sea con o sin BrEt, la Mh incrementa su fluorescencia mientras mayor es la temperatura del ensayo. Finalmente, se destaca que el protocolo de reconstitución para la sonda minihélice no fue indispensable (Fig. 29.D), probablemente por el corto tamaño de dicha molécula, así como también por su alta probabilidad de plegamiento en la forma predicha. Adicionalmente, se realizaron perfiles de fluorescencia del RNA sin BrEt (no mostrado), el cual presentó una emisión despreciable.

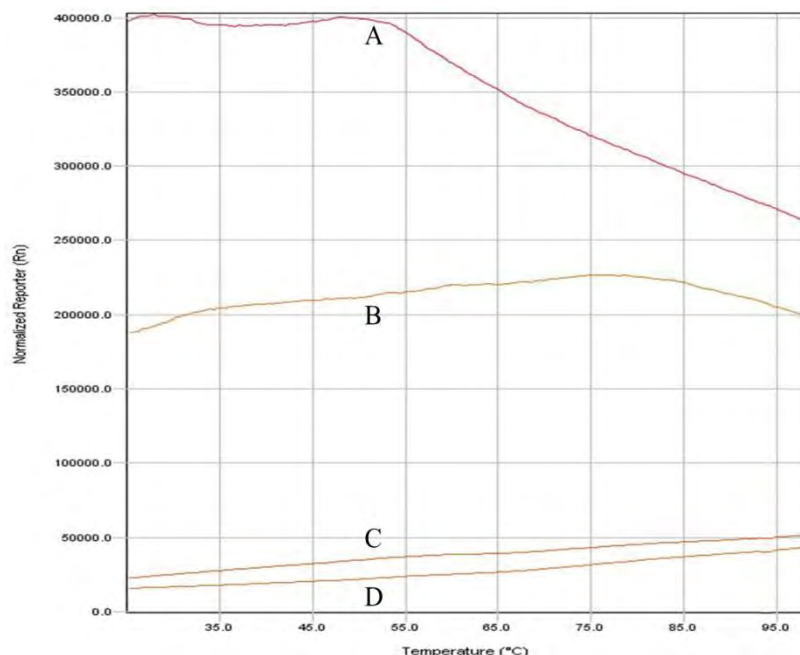


Fig. 29. Curvas de fluorescencia normalizada vs. temperatura del ensayo térmico para RNA. A. Perfil de fluorescencia con BrEt de una secuencia de RNA sin una molécula fluorescente intrínseca. B. Perfil de fluorescencia de la minihélice sustrato fluorescente con BrEt. C. Perfil de fluorescencia de la minihélice sustrato sin BrEt. D. Perfil de fluorescencia de la minihélice sustrato sin BrEt y sin el protocolo de reconstitución mencionado en secciones previas. Cabe destacar que la fluorescencia del RNA sin BrEt es despreciable.

A pesar de los resultados mostrados, al compararlos con los de un ensayo convencional de desplazamiento térmico (*thermal shift*) de proteínas, los perfiles de fluorescencia derivada (no mostrados aquí) resultan ruidosos y poco claros. Quizá una razón sea por las diferencias estructurales entre proteínas y RNA, ya que al ser más flexible la molécula se hace más complicada la interpretación del espectro. Por esta razón, sólo se analizaron los perfiles de fluorescencia normalizada, y no los de fluorescencia derivada, ya que un pico en estas gráficas se podría considerar como análogo a la temperatura de disociación (T_m) en un *thermal shift*. Sin embargo, es pertinente la aclaración de que muy probablemente estas T_m aparentes no tendrían la misma implicación de la que tienen en ensayos con proteínas.

Aun así, sin el cálculo del parámetro termodinámico T_m , se procedió a ensayar los fragmentos identificados por el método de actividad en alto rendimiento (Fig. 30). Se analizaron diferentes condiciones y concentraciones de compuestos sobre la secuencia de P RNA. Se estudió el compuesto 2.06D (1,2,4-bencetriol) de la biblioteca Zenobia, elegido como el inhibidor más prometedor derivado de este trabajo, y se probaron diferentes concentraciones. Analizando la fluorescencia normalizada de los ensayos con dicho fragmento 2.06D con una concentración de $1\mu\text{M}$ de P RNA (Fig. 30.A), a mayores concentraciones del compuesto se evidencia una disminución en la señal de

emisión detectada por la interacción del RNA con el BrEt. A partir de 2,500x (concentración final: 2.5 mM) de fragmento, y hasta 10,000x (concentración final: 10 mM), se encuentra una señal de fluorescencia baja, equivalente a la emisión de la mezcla del fragmento con bromuro de etidio, considerada como la fluorescencia basal del ensayo. A menores concentraciones del fragmento, la emisión aumenta (625x y 1,250x) llegando con la concentración más baja a la fluorescencia control del RNA en interacción total con BrEt.

Del experimento anterior y su análisis se deriva la discusión acerca de que los fragmentos afines al RNA, específicamente el 2.06D disminuye la frecuencia de contacto del bromuro de etidio con dicha estructura, teniendo un efecto de desplazamiento del bromuro de etidio de sus sitios de unión a la molécula de RNA a mayores concentraciones del compuesto de prueba. Este efecto habla de la afinidad del compuesto al RNA, aunque ésta resulta poco selectiva, ya que se encontró un efecto similar con diferentes secuencias de RNA probadas con este compuesto, como se discutirá más adelante. Como nota aclaratoria, la concentración de bromuro de etidio usada para estos ensayos se encontraba alrededor de 1.27mM según un cálculo teórico, por lo que la cantidad de esta molécula indicadora de fluorescencia en los experimentos se encuentra en el mismo orden de magnitud que los fragmentos agregados.

Sobre los ensayos con algunos fragmentos seleccionados de la biblioteca Maybridge (Fig. 30.B), tanto en los obtenidos de la selección en alto rendimiento como de algunos analizados de manera adicional, las observaciones pertinentes de los resultados preliminares obtenidos es que los fragmentos 10D6 y 12B9 (nombres de las moléculas mostradas en la sección 5.c) muestran un drástico efecto de desplazamiento del bromuro de etidio en concentraciones de 10,000x, similar al encontrado con el fragmento 2.06D. Algunos otros, como el 7C8 y el 10B9 presentan una fluorescencia mayor a la de la escala mostrada en la fig. 30.B (perfil no mostrado), aumentando y disminuyendo con la temperatura respectivamente. Este efecto se podría correlacionar con la asociación al RNA y sus cambios con la rampa de temperatura. Sin embargo, para poder concluir sobre el efecto debido a estos fragmentos, no se realizaron las pruebas y controles suficientes al respecto.

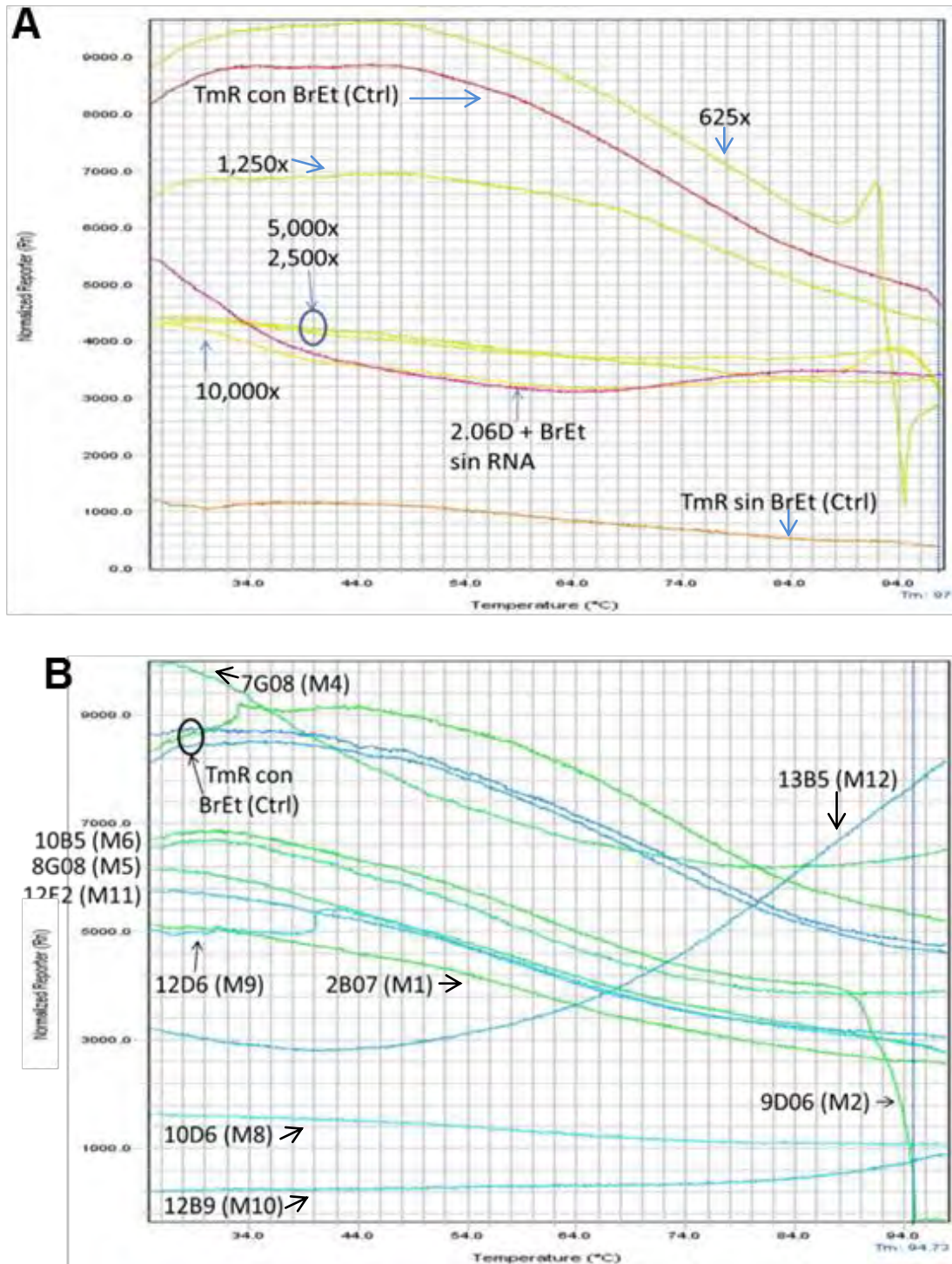


Fig. 30. Ensayo de desnaturación térmica de RNA con fragmentos de prueba. **A.** Curvas de fluorescencia normalizada de P RNA con el fragmento 2.06D de la biblioteca Zenobia a diferentes concentraciones. Las implicaciones de estos experimentos son explicadas y discutidas en el texto. **B.** Curva de fluorescencia normalizada del P RNA con fragmentos de la biblioteca Maybridge a concentración de 10,000x (10mM) sobre la concentración de la subunidad de RNA. El experimento control de TmR con BrEt mostrado en esta gráfica fue realizado por triplicado, y los tres perfiles se muestran agrupados en la leyenda de dicha curva. Las implicaciones de estos experimentos son explicadas y discutidas en el texto.

Como comentario global sobre los experimentos realizados con esta técnica novedosa de desplazamiento térmico para RNA, se puede afirmar que el efecto encontrado de los fragmentos ensayados sobre el RNA puede relacionarse con el favorecimiento de la pérdida de contactos de la molécula indicadora (BrEt), lo que nos permite inferir las afinidades del inhibidor-BrEt en un amplio rango de temperaturas. No obstante, para los resultados mostrados en este proyecto, dicho efecto no es secuencia-específico para el P RNA, que es la intención inicial del presente trabajo. Esta unión-desplazamiento de BrEt se encontró que se evidencia sobre RNA en general, ya que se encuentra un efecto similar sobre secuencias de RNA más cortas que el P RNA, como lo es un pre-tRNA y sobre la minihélice sustrato (Fig. 29), las cuales tienen predicciones de plegamiento y estructura tridimensional diferente.

A pesar de lo expuesto anteriormente, se comprobó que se puede hacer una comprobación complementaria de los datos del ensayo en alto rendimiento con esta estrategia analítica de desnaturalización térmica de RNA. Los compuestos detectados como potenciales inhibidores se unen al RNA, aunque de manera inespecífica, causando inhibición de la actividad catalítica de la RNasa P.

Finalmente, esta metodología no se continuó explorando en este proyecto, pero el diseño inicial y algunos resultados preliminares, mostrados en esta sección, proponen una estrategia que puede continuarse desarrollando a futuro. Este método planteado requiere de la realización de más experimentos y controles - que probablemente justificarían el desarrollo de un proyecto de posgrado completo - , así como el planteamiento de más aplicaciones que podría tener esta técnica para el análisis en alto rendimiento de moléculas de RNA.

Este método biofísico resulta de particular interés, ya que el análisis del desplazamiento de moléculas de unión a ácidos nucleicos y sus aplicaciones para el desarrollo de fármacos no está reportado ampliamente en la literatura. Por lo tanto, la optimización de esta técnica, así como el estudio e implementación de nuevos indicadores fluorescentes para ácidos nucleicos, como SYBR GREEN o GelRed, podría convertirla en una estrategia de alto rendimiento sensible, específica y rápida para el descubrimiento de moléculas inhibitoras para ribozimas y otras secuencias nucleotídicas.

e. Ensayo de actividad en gel para fragmentos

Comprobando el efecto de los inhibidores seleccionados se procedió a realizar el ensayo de actividad en gel con el sustrato canónico (pre-tRNA de 76 nts) en un primer intento. Sin embargo, los resultados derivados de estos experimentos no fueron los esperados, ya que no se distinguió ningún efecto claro a simple vista en la relación sustrato/producto en gel con sombra en el UV entre los experimentos control de actividad y las pruebas con inhibidores (datos no mostrados).

Sin embargo, realizando la prueba de actividad sobre el sustrato minihélice se distinguió un efecto inhibitorio del fragmento 2.06D (Fig. 31.A). Claramente se observa que a 2,500x de concentración (ensayos a la izquierda, Fig. 31.A), el ensayo con el fragmento 2.06D muestra un retraso en la velocidad de reacción comparando con los demás ensayos. Sobre los otros experimentos en la misma llave, no es clara la distinción de algún efecto. Por otra parte, en la llave derecha, se encuentra el efecto de retraso en prácticamente todos los fragmentos evaluados a comparación del control de actividad, excepto el fragmento 4.06F, probablemente por la concentración tan alta que se maneja en este set de ensayo.

Sobre este efecto y el análisis de inhibición en este tipo de experimentos en gel, es necesario comentar que al ser un ensayo en punto final – en comparación con la estrategia cinética (en tiempo real) en alto rendimiento – las diferencias muy modestas de velocidad de los ensayos con ciertos inhibidores puede que no sean detectadas por la estrategia experimental y el método de visualización del resultado. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que a pesar de que no se confirma un efecto claro de inhibición de los fragmentos y compuestos probados, salvo para el fragmento 2.06D, éstos quizá sí presenten una ligera inhibición sobre la actividad de la RNasa P.

Por otro lado, para poder distinguir si el efecto encontrado de inhibición sobre la holoenzima ocurre por unión a la subunidad catalítica de RNA o a la proteína P, se estandarizó el ensayo de actividad también para la subunidad catalítica de RNA, sin proteína P (Fig. 31.B). Para esto, se debió incrementar la concentración de iones, específicamente de acetato de amonio y cloruro de magnesio.

Tras realizar los ensayos de actividad sobre la subunidad de P RNA para los fragmentos seleccionados (Fig. 31.B), tanto de Zenobia como de Maybridge, se

encuentra que el único efecto claro es también el obtenido con el fragmento 2.06D, así como con el bromuro de etidio, cuya afinidad a los ácidos nucleicos se encuentra que inhibe la actividad catalítica. El carril "Ctrl" muestra un estándar de actividad de P RNA sobre el sustrato minihélice fluorescente. En este gel también se probaron los fármacos conocidos por unirse al ribosoma, neomicina y cloranfenicol (últimos carriles, Fig. 31.B), sin embargo no se distinguieron efectos claros sobre la actividad de RNasa P. Gracias a este resultado, podemos afirmar que el efecto inhibidor - no específico - del bromuro de etidio y del fragmento 2.06, sobre la RNasa P es debido a la unión de estas moléculas al ácido nucleico.

Aprovechando estos experimentos de actividad en gel como una comprobación adicional del ensayo de alto rendimiento diseñado, se realizó un escaneo completo de los cocteles de 8 fragmentos de la biblioteca Zenobia, para buscar una correlación de ensayos de alto rendimiento y de actividad en gel. Dichos resultados, mostrados y explicados en el anexo 2, muestran una correlación cualitativa de actividad entre ambas metodologías de ensayos, salvo en las mezclas 4.06 y 1.04 (en nomenclatura fila.columna), en los cuales el ensayo aparentemente está inhibido en alto rendimiento, pero tiene actividad normal en gel. Esta discordancia se puede deber a fallas técnicas en las lecturas en los ensayos en alto rendimiento, así como también a la solubilidad de los fragmentos, ya que en el ensayo en gel la concentración de fragmentos usada tuvo que ser mayor que en el ensayo HT, por lo que se presentó precipitación de algunas especies químicas en la mezcla de reacción.

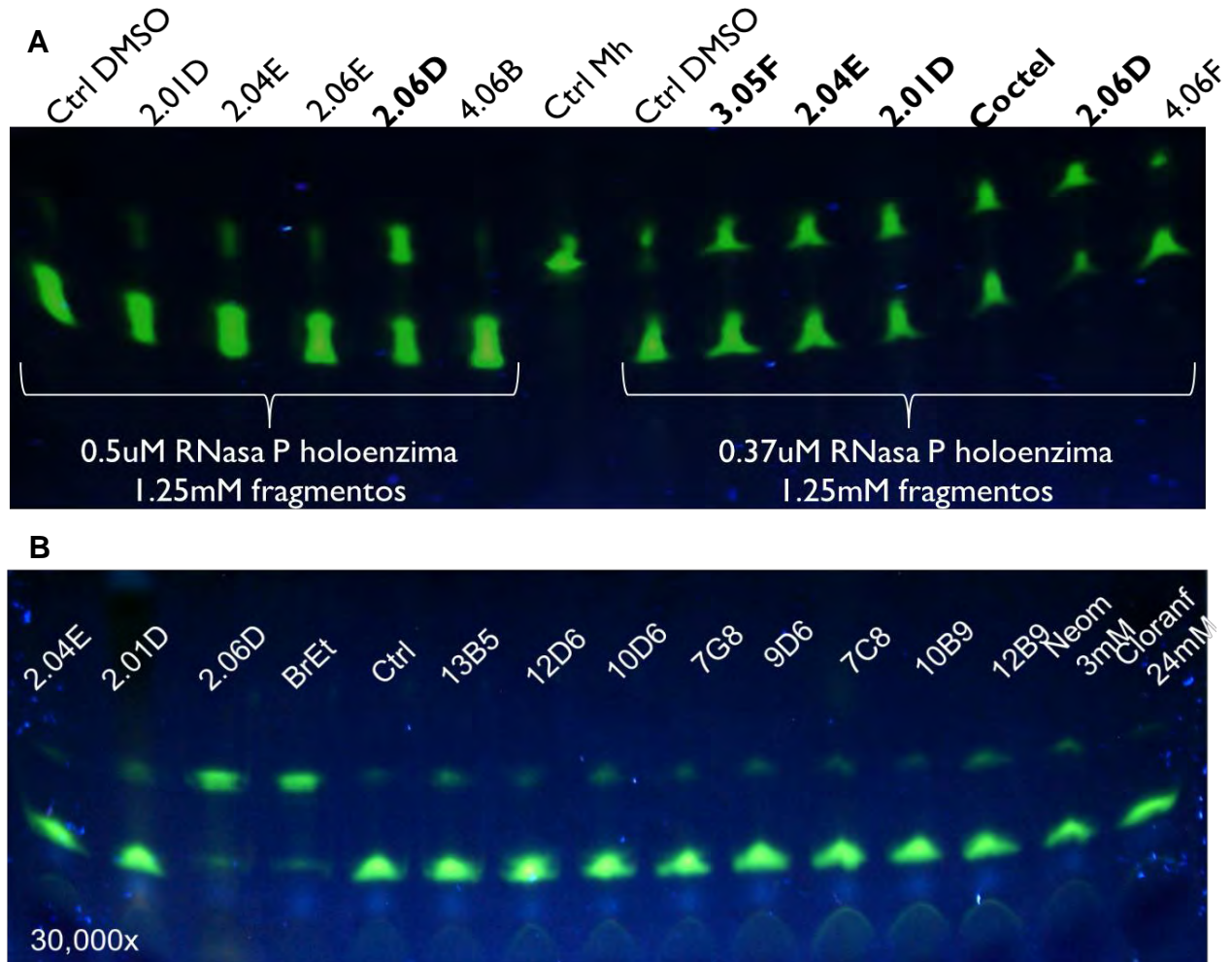


Fig. 31. **A.** Gel de actividad en punto final para RNasa P holoenzima con fragmentos derivados de la selección de la biblioteca Zenobia con el ensayo de alto rendimiento en tiempo real. Se incluyen controles de actividad a la concentración de trabajo de DMSO (indicados como “Ctrl DMSO”), además de que se muestra también un estándar de referencia de la minihélice sin catalizar (mostrada como “Ctrl Mh”). Las llaves en blanco agrupan concentraciones de fragmentos distintos; la de la izquierda con una concentración 2,500x mayor que la de la RNasa P, mientras que la de la derecha con una concentración 3,378x por encima de la concentración de RNasa P. El carril “Coctel” muestra una mezcla de los fragmentos probados individualmente en este gel. **B.** Gel de actividad en punto final para P RNA con fragmentos a una concentración de 30,000x sobre la concentración de P RNA, derivados de la selección con el ensayo de alto rendimiento en tiempo real, tanto de la biblioteca Zenobia (nombres de fragmentos en formato placa.columna-fila, ej. 2.01D) como Maybridge (fragmentos en formato placa-fila-columna, ej. 12D6).

5. Discusiones generales y perspectivas

La actividad esencial de la RNasa P para los organismos vivos, así como sus diferencias estructurales y en composición de subunidades entre la forma eucarionte y procarionte, hacen de esta macromolécula una alternativa viable y tangible para el diseño racional de fármacos específicos con potencial actividad antibiótica. Por otro lado, el diseño de fármacos basado en fragmentos es una estrategia moderna de gran impacto en el ámbito del desarrollo farmacológico de nuevas moléculas. Sus ventajas incluyen una mejor exploración de un mayor espacio químico mediante compuestos de menor tamaño, posibilitándose un análisis tanto funcional como estructural de la interacción ocurrida entre el ligando y el blanco de interés terapéutico, lo cual permite un análisis y refinamiento posterior de estos resultados.

Sin embargo, para poder explotar dicha herramienta a su máxima expresión y con el mayor provecho, es necesario idear estrategias experimentales de alto rendimiento para el monitoreo de actividad o unión para la selección de compuestos con actividad potencial sobre las moléculas objetivo. Sólo gracias a ensayos en alto rendimiento, el escaneo exhaustivo de bibliotecas de número considerable de compuestos (> 1,000), aunado a una probabilidad de éxito habitualmente menor al 5%, hace factible el tamizaje en busca de compuestos bioactivos en cuestiones técnicas, económicas y temporales.

El cuello de botella en esta área con la RNasa P como blanco farmacológico se encuentra en el ensayo tradicional de medición de actividad catalítica de la ribozima, ya que está limitado en cuestión de escalamiento y optimización (Ver sección 1.a.v). Por esta razón, los resultados presentados en este proyecto son trascendentales, por su innovación y aportación significativa al área del conocimiento e investigación sobre la RNasa P. El ensayo de fluorescencia diseñado en este trabajo para la medición de actividad de RNasa P con la secuencia de nucleótidos tomada de estudios de Brännvall y cols. (2007), y modificada para usarse por transferencia de energía resonante fluorescente (FRET), así como los métodos estandarizados para monitoreo de plegamiento térmico, permiten la optimización de los ensayos en alto rendimiento para el monitoreo de la actividad de la ribozima en cuestión.

En la presente sección se discutirán algunos aspectos generales relacionados con los experimentos y resultados obtenidos, que aunados a las discusiones particulares de los resultados en las secciones anteriores del trabajo, conformarán el análisis crítico del proyecto. En primera instancia, derivado del ensayo en alto rendimiento, se pudo realizar la primera caracterización preliminar de la actividad de la RNasa P con un ensayo diferente al usado tradicionalmente (Fig. 26 / Tabla 5). Dichos resultados pudieron ser comparados con datos encontrados en la literatura y normalizados para estos fines (Tabla 7) en tres referencias publicadas con datos enzimáticos completos y comparables con este estudio.

De dicho análisis se destaca que tanto la afinidad (K_m) como la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de la RNasa P por el sustrato mini-hélice son notoriamente más bajas que las encontradas sobre el sustrato completo en RNasa P de dos diferentes organismos procariontes; sin embargo, estos valores se encuentran en el orden de magnitud de los parámetros reportados a lo largo de casi tres décadas de investigación sobre esta ribozima.

Tabla 7. Cuadro comparativo de parámetros cinéticos reportados para RNasa P, así como los datos obtenidos con el sustrato fluorescente en el presente proyecto. En este resumen se muestran parámetros de actividad calculados con diversas mutantes de RNasa P, tanto de *E. coli* como de *T. maritima*, así como con sustratos mutantes y diferentes concentraciones de Mg^{2+} ; no obstante, esta tabla permite ubicar el rango aproximado en el cual están ubicados los valores cinéticos de la RNasa P de *T. maritima* con el sustrato minihélice fluorescente obtenidos por alto rendimiento.

K_m [μM]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_m [* $10^6 M^{-1} min^{-1}$]	Organismo de estudio	Referencia
0.033 – 0.5	1.3 - 29	0.07 - 8.7	<i>E. coli</i>	Guerrier-Takada, 1989
0.07 - 0.41	0.004 – 0.17	0.01 - 2.6	<i>E. coli</i>	Liu, 1996
--	--	4.9 – 15	<i>T. maritima</i>	Reiter, 2010
0.98	0.46	0.47	<i>T. maritima</i>	Datos obtenidos con la estrategia de alto rendimiento en el presente trabajo

Sobre los fragmentos potencialmente inhibidores encontrados como resultado de este tamizaje, se destaca que en la biblioteca de Zenobia los tres compuestos seleccionados como positivos para este proyecto resultan ser moléculas de benceno trisustituidas. El inhibidor más claro de estos, el 1,2,4-bencentriol (molécula 2.06D), resultó ser un compuesto conocido desde años atrás por unirse con alta afinidad e independientemente de la secuencia a ácidos nucleicos, el cual además tiene propiedades oxidantes y mutágenicas sobre el DNA (Zhang, 1996; Zhang, 1998; Chung, 2002). Esta unión no específica a ácidos nucleicos también se comprobó con la actividad de este compuesto sobre el perfil de fluorescencia del pre-tRNA, con lo cual se observa un efecto de desplazamiento del bromuro de etidio con concentraciones crecientes de 1,2,4-bencentriol (Fig. 30.A). Debido al hallazgo de dicho ligando no específico para ácidos nucleicos, se experimentó también con el efecto del bromuro de etidio en la actividad de la RNasa P, logrando una inhibición clara de la actividad también.

Se concluye entonces, de los resultados anteriores, que ciertas uniones de moléculas no específicas interfieren con la actividad de la ribozima, debido principalmente al intercalamiento de dichos compuestos en la estructura tridimensional no sólo de la RNasa P, sino de otros ácidos nucleicos también, como su sustrato. Adicionalmente, se comprueba que el ensayo de alto rendimiento y el sustrato minihélice diseñado en este proyecto permiten detectar cambios en la actividad de la ribozima, con lo que tras estos experimentos al menos se cuenta con un par de controles negativos de actividad catalítica de RNasa P, el 1,2,4-bencentriol (fragmento 2.06D) y bromuro de etidio.

Sobre los fragmentos de la biblioteca Maybridge, el efecto y los resultados obtenidos fueron menos claros que para la biblioteca Zenobia. Se piensa que esto se relaciona probablemente con el disolvente DMSO que disuelve a los compuestos de la biblioteca Maybridge, ya que existe una activación de la RNasa P debida a este disolvente, y esto quizá haya interferido con el tamizaje de las moléculas inhibidoras, no encontrando cinéticas claras de maduración – catálisis del extremo 5'-líder – del pre-tRNA. Sin embargo, de los 4 compuestos elegidos de esta biblioteca se encuentran

moléculas que incluyen ciclos aromáticos y una proporción importante de nitrógeno, las cuales son características importantes para la unión de moléculas a los ácidos nucleicos.

Aunado a lo anterior, como se pudo analizar en la sección 1.vi del presente trabajo sobre los compuestos inhibidores descritos para la RNasa P (Tabla 1), las moléculas pequeñas empleadas para inhibir la función de RNA catalítico han sido descritas en la literatura desde hace algunos años (Vourekas, 2008), con un caso de éxito bastante claro que es el ribosoma bacteriano. Tomando un ejemplo particular de inhibidores para el ribosoma, los aminoglucósidos, estos compuestos deben ser, entre algunas otras características, largos, flexibles y con cargas positivas, que se unen a ciertos sitios importantes de la región catalítica y de reconocimiento de la ribozima. Dicha unión se sabe que ocurre tanto por las propiedades fisicoquímicas (tamaño y carga) de las moléculas pequeñas, como por la estructura tridimensional de ambas. Es por eso que incluso el pH del medio es importante para la afinidad por el número de cargas positivas que los grupos amino de estas moléculas tienen, ya que de estas dependerá la unión o no a secuencias de ácido nucleicos.

Con la investigación y análisis anterior sobre ligandos para RNA, se encontró que las bibliotecas de compuestos disponibles hoy en día para la selección de compuestos y posterior diseño de fármacos basado en fragmentos no son óptimas para el descubrimiento de fragmentos para RNA, ya muchas de estas bibliotecas incluso están optimizadas y predichas para la unión de moléculas a proteínas. Como perspectiva, para proyectos posteriores sobre la misma línea de investigación, se recomienda en primera instancia buscar bibliotecas principalmente con moléculas de mayor peso molecular, más largas, flexibles y cargadas positivamente, por todo lo comentado anteriormente. El desarrollo de bibliotecas de moléculas en este aspecto ha empezado a despuntar con ciertos grupos de investigación alrededor del mundo, que han diseñado prototipos de bibliotecas con alrededor de 100 fragmentos para ácidos ribonucleicos (Bodoor, 2009). Se espera que esta tendencia vaya en aumento con el paso de los años por venir, ya que el interés de dirigir fármacos secuencia-específicos para estas macromoléculas se ha incrementado por el descubrimiento de funciones cada vez más variadas y esenciales de moléculas de RNA en la célula.

Sin embargo, en relación con lo anterior, en el tamizaje llevado a cabo en este proyecto con las bibliotecas de Maybridge y Zenobia, presumiblemente optimizadas para unión a proteínas, no fue posible distinguir un efecto específico de los fragmentos sobre la proteína P de la RNasa P al trabajar con la holoenzima (RNA + Proteína) para los ensayos de actividad. Esto probablemente sea debido a las concentraciones altas del ion divalente Mg^{2+} (~100mM) y del NH_4Ac (>300mM) adicionadas para poder afianzar mejor la estructura funcional de la ribozima y, en consecuencia, incrementar la velocidad catalítica de la RNasa P, incluso llegando a poder prescindir de la proteína P para la catálisis *in vitro*.

Discutiendo sobre el ensayo diseñado de actividad en alto rendimiento, tras analizar las ventajas y desventajas del método, se puede afirmar que la afinidad disminuida del sustrato propuesto, comprobada en los experimentos realizados en comparación con el pre-tRNA canónico, fue una ventaja experimental. La *baja* afinidad del sustrato mini-hélice para la RNasa P nos permitió detectar cambios sutiles de actividad, ya que las velocidades y concentraciones de sustrato fueron variables críticas durante el desarrollo experimental, caracterización y optimización del ensayo en el presente trabajo. Se comprobó que incluso los compuestos inhibidores de ambas bibliotecas encontrados por el ensayo con la sonda FRET en alto rendimiento no demostraron efecto inhibitorio claro en los ensayos en geles desnaturalizantes con el sustrato canónico (datos no mostrados).

Por otro lado, consideramos un hecho innovador y de relevancia para trabajos futuros alrededor de la investigación en la ribozima la optimización hecha sobre el ensayo con la intención de escalarlo a microvolúmenes para el uso en alto rendimiento. Sin embargo, a pesar de que las cinéticas de selección de fragmentos en este proyecto significaron un reto respecto a la estandarización y cálculo cuantitativo por el ruido experimental detectado (Sección 4.c y anexo 1), el ensayo tiene un gran potencial cuantitativo en la medida en que se aumente el cociente señal/ruido. Proponemos que esto se puede lograr ya sea mejorando los aspectos técnicos – que se puede lograr usando un equipo más sensible y rápido – o haciendo posible la disminución del volumen del ensayo en placas de 384 pozos o más, obviamente con la consiguiente

optimización de la cantidad de sustrato en cada pozo. Con estas modificaciones, la señal fluorescente a detectar se incrementaría y se podría obtener un mejor cociente señal/ruido, como el observado en la caracterización preliminar de la Fig. 26, a diferencia de los resultados obtenidos en la mayoría de las cinéticas del anexo 1.

Como perspectivas en este sentido se podría plantear la automatización del ensayo en nanovolumenes, ya que hasta ahora las limitantes para realizarlo han sido la capacidad manual y técnica para continuar haciendo más pequeños los volúmenes del ensayo. En la medida en que se reduzcan estas dificultades técnicas, se podrá aumentar la concentración de sustrato sin comprometer la viabilidad económica del ensayo para obtención de mejor señal/ruido.

Otro aspecto importante, derivado de este proyecto, es la interacción de distintas metodologías de análisis instrumental, además del ensayo de actividad diseñado para RNasa P, para obtener información y lograr una caracterización más completa de la interacción entre dos moléculas, y la función resultante. El ensayo de desnaturalización térmica para RNA con bromuro de etidio como indicador fluorescente, análogo al *thermal shift* usado en análisis conformacional de proteínas, es una herramienta no descrita en la literatura ni utilizada previamente a la realización de este trabajo.

El diseño y los resultados preliminares de esta estrategia experimental, que aún requiere trabajo y desarrollo analítico, permitió la detección de la fluorescencia de los ácidos nucleicos al unírseles bromuro de etidio. Dicha emisión se reducirá al perderse la interacción del marcador con el RNA, probablemente por el desplegamiento de las secuencias por efecto de la temperatura. Además, mediante esta técnica también se pudo comprobar el efecto temperatura-dependiente de la fluorescencia de la sonda sustrato (Fig. 29), ya que el perfil obtenido respecto a los RNAs no fluorescentes es distinto, por lo que se puede comprobar el estado e integridad del sustrato por esta técnica también.

En resumen, este método biofísico nos da información sobre la estabilidad térmica de las secuencias de RNA, así como de la afinidad de ciertas moléculas a los ácidos nucleicos por efecto del desplazamiento del bromuro de etidio. Eventualmente, a medida que el desarrollo en moléculas pequeñas de unión a RNA secuencia-específica

avance, se predice que se podrá calcular cuantitativamente la especificidad de unión de compuestos a distintas secuencias de RNA de manera selectiva.

Sobre el sustrato fluorescente mini-hélice – del cual también se puede visualizar su corte en geles desnaturalizantes similar al ensayo convencional de actividad de RNasa P con sustratos radioactivos - es destacable que permite la comprobación cruzada y retroalimentación de los hallazgos provenientes del alto rendimiento de manera directa en geles de poliacrilamida con cantidades mínimas de sustrato gracias a su fluorescencia intrínseca. Este hecho permite la validación y comprobación de la utilidad de la estrategia de alto rendimiento propuesta en el presente proyecto, así como la validación futura de los resultados obtenidos, primero tamizando una gran cantidad de compuestos por alto rendimiento en placas multipozo, para posteriormente comprobar visualmente el efecto de las moléculas seleccionadas como inhibidores potenciales mediante el corte del sustrato en el gel. Además, y como propuesta de continuidad del presente trabajo, se podrán calcular biofísicamente afinidades y cambios conformacionales de la RNasa P con la metodología diseñada y propuesta del ensayo de desplazamiento térmico para RNA.

Finalmente y de manera general, el empleo de la fluorescencia en el presente proyecto para los métodos desarrollados para la catálisis de la RNasa P, además del monitoreo en tiempo real y en alto rendimiento, permite optimizar y escalar los volúmenes de los ensayos y la retroalimentación de resultados a través de diversas metodologías con el uso del sustrato fluorescente. Dicha innovación en la determinación de la actividad de la RNasa P posibilitó el análisis de múltiples condiciones y de dos bibliotecas de fragmentos extensas completas, aunque en un futuro esta misma herramienta permitirá enfocar mejor la búsqueda de fragmentos y fármacos completos hacia la RNasa P como blanco farmacológico específico.

6. Conclusiones

En el presente trabajo se diseñó un sustrato de tamaño mínimo basado en un mecanismo FRET, mediante el cual se logró monitorear la actividad catalítica de la ribozima RNasa P. Con esto, se introdujo una innovación significativa proponiendo un ensayo enzimático fluorescente, sensible, específico y no tóxico, con capacidad de escalarse a alto rendimiento en microvolúmenes, para la determinación de actividad catalítica de la RNasa P. Gracias a esto, fue posible el tamizaje de dos bibliotecas de fragmentos para el diseño de fármacos inhibidores para la RNasa P, de los cuales el efecto de sólo uno (1,2,4-bencenotriol) pudo ser comprobado en geles de poliacrilamida con el mismo sustrato fluorescente.

Además del diseño del sustrato mini-hélice para RNasa P, se introdujo el fundamento de una técnica novedosa de desnaturalización térmica para RNA con bromuro de etidio como indicador fluorescente. Este método puede resultar útil para un análisis conformacional rápido temperatura-dependiente de secuencias de ácidos nucleicos, así como para estudiar el desplazamiento del bromuro de etidio por otros ligandos de unión a RNA. Estos dos métodos propuestos en el presente proyecto, ofrecen la ventaja de proveer información complementaria para la validación cruzada de los resultados obtenidos mediante las técnicas de alto rendimiento.

Como una perspectiva de este trabajo, se ha planteado la realización de pruebas masivas con otras bibliotecas de compuestos de fuentes naturales y de fragmentos específicos de unión a ácidos nucleicos, con el fin de descubrir y diseñar fármacos antibióticos específicos para la RNasa P bacteriana.

7. Referencias

- Altman S, Wesolowski D, Guerrier-Takada C, Li Y. (2005). RNase P cleaves transient structures in some riboswitches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (32): 11284-11289
- Altman S. (2011). Ribonuclease P. Review. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 366: 2936–2941
- Argonne National Laboratory. (2013). Ligand screening. [Electrónico]. Biosciences Division. Molecular and Systems Biology. U.S. Department of Energy. http://www.bio.anl.gov/molecular_and_systems_biology/Sensor/sensor2.html. [Recuperado en Abril de 2013, de WWW].
- Berchanski A, Lapidot A. (2008). Bacterial RNase P RNA Is a Drug Target for Aminoglycoside–Arginine Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*. 19 (9): 1896–1906
- Bioinformatics and chemical informatics research center (BCIRC). (2009). ZINC database [Electrónico]. <http://zinc.docking.org>. [Recuperado en Mayo de 2012, de WWW].
- Bodoor K, Boyapati V, Gopu V, Boisdore M, Allam K, Miller J, Treleven D, Weldeghiorghis T, Aboul-ela F. (2009). Design and Implementation of an Ribonucleic Acid (RNA) Directed Fragment Library. *Journal of Medicinal Chemistry*. 52, 3753–3761
- Borman S. (2009). Targeting RNA: Unique challenges face developers of drugs that hit disease-related RNAs rather than disease-related proteins. *Chemical & Engineering News*. 87 (39): 63-66
- Bränvall M, Kikovska E, Wu S, Kirsebom L. (2007). Evidence for Induced Fit in Bacterial RNase P RNA-mediated Cleavage. *Journal of Molecular Biology*. 372: 1149-1164
- Chung HW, Kang SJ, Kim SY. (2002). A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. *Mutation Research*. 516: 49-56
- Congreve M, Carr R, Murray C, Jhoti H. (2003). A 'Rule of Three' for fragment-based lead discovery?. *Drug Discovery Today*. 8 (19): 876-877
- de Kloe GE, Bailey D, Leurs R, de Esch IJP. (2009). Transforming fragments into candidates: small becomes big in medicinal chemistry. *Drug Discovery Today*. 14 (13/14): 630-646
- Ellis JC, Brown JW. (2010). The evolution of RNase P and its RNA. Chapter 2 in: Liu F, Altman S (editors). Ribonuclease P. *Protein Reviews Series*. Volume 10. USA: Springer
- Evans D, Marquez S, Pace N. (2006). RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends in Biochemical Sciences*. 31 (6): 333-341
- Ferenczy GG, Keseru GM. (2012). How are fragments optimized? A retrospective analysis of 145 fragment optimizations. *Journal of Medicinal Chemistry*. 56(6): 2478-2486
- Fujimoto A, Kikuchi Y, Tanaka T. (2009). Substrate recognition of pre-tRNA by ribonuclease P – subsite model of natural ribozyme originated from E. coli. *Nucleic Acids Symposium Series*. 53: 35-36
- Gaffney PJ, Edgell TA. (1995). The International and "NIH" units for thrombin--how do they compare?. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 74(3): 900-903
- Gallego J, Varani G. (2001). Targeting RNA with small-molecule drugs: Therapeutic promise and chemical challenges. *Accounts of Chemical Research*. 34: 836-843

- Galloway WRJD, Spring DR. (2011). Better leads come from diversity. *Nature*. 470: 42-43
- Geselowitz DA, Cramer H, Wondrak EM, Player MR, Torrence PF. (2000). Fluorescence resonance energy transfer analysis of RNase L-catalyzed oligonucleotide cleavage. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*. 10(1): 45-51
- Gobert A, Pinker F, Fuchsbauer O, Gutmann B, Boutin R, Roblin P, Sauter C, Giegé P. (2013). Structural insights into protein-only RNase P complexed with tRNA. *Nature Communications*. 4:1353
- Gößringer M, Helmecke D, Hartmann RK. (2012). Characterization of RNase P RNA Activity in Hartig JS. (2012). Ribozymes : Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. 848
- Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R, Hofacker IL. (2008). The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Research*. 36 (suppl 2): W70-W74
- Gruegelsiepe H, Willkomm DK, Goudinakis O, Hartmann RK. (2003). Antisense Inhibition of Escherichia coli RNase P RNA: Mechanistic Aspects. *ChemBioChem*. 4(10): 1049–1056
- Guan L, Disney M. (2012). Recent advances in developing small molecules targeting RNA. *ACS Chemical Biology*. 7: 73-86
- Guerrier-Takada C, Lumelsky N, Altman S. (1989). Specific Interactions in RNA Enzyme-Substrate Complexes. *Science*. 246: 1578-1584
- Gutman B, Gobert A, Giege P. (2012). PRORP proteins support RNase P activity in both organelles and the nucleus in *Arabidopsis*. *Genes & Development*. 26(10):1022-1027
- Hernandez-Cid A, Aguirre-Sampieri S, Diaz-Vilchis A, Torres-Larios A. (2012). Ribonucleases P/MRP and the Expanding Ribonucleoprotein World. *IUBMB Life*. 64(6): 521–528
- Hori Y, Bichenkova EV, Wilton AN, El-Attug MN, Sadat-Ebrahimi S, Tanaka T, Kikuchi Y, Araki M, Sugiura Y, Douglas KT. (2001). Synthetic Inhibitors of the Processing of Pretransfer RNA by the Ribonuclease P Ribozyme: Enzyme Inhibitors Which Act by Binding to Substrate. *Biochemistry*. 40(3): 603-608
- Howard MJ, Lim WH, Koutmos M. (2012). Mitochondrial ribonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5' processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(40):16149-54
- Huang B. (2009). MetaPocket: a meta approach to improve protein ligand binding site prediction. *OMICS*. 13(4): 325-330
- Hyen C, Dima R, Thirumalai D. (2006). Size, shape and flexibility of RNA structures. *The Journal of Chemical Physics*. 125 (19): 194905 1- 194905 10
- Irwin J, Shoichet BK. (2005). ZINC. A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 45(1): 177-182
- Johansson MK. (2006). Choosing Reporter–Quencher Pairs for Efficient Quenching Through Formation of Intramolecular Dimers. *Methods in Molecular Biology*. 335:17-29
- Kalavrizioti D, Vourekas A, Tekos A, Tsagla A, Stathopoulos C, Drinas D. (2003). Kinetics of inhibition of ribonuclease P activity by peptidyltransferase Inhibitors. Effect of antibiotics on RNase P. *Molecular Biology Reports*. 30: 9-14

- Kawamoto SA, Sudhakar CG, Hatfield CL, Sun J, Behrman EJ, Gopalan V. (2008). Studies on the mechanism of inhibition of bacterial ribonuclease P by aminoglycoside derivatives. *Nucleic Acids Research*. 36 (2): 697–704
- Kazakov S, Altman S. (1991). Site-specific cleavage by metal ion cofactors and inhibitors of M1 RNA, the catalytic subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88: 9193-9197
- Kazantsev AV, Krivenko AA, Harrington DJ, Carter RJ, Holbrook SR, Adams PD, Pace NR. (2003). High-resolution structure of RNase P protein from *Thermotoga maritima*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100 (13): 7497-7502
- Kazantsev AV, Pace NR. (2006). Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nature Reviews Microbiology*. 4: 729-740
- Klostermeier D, Millar D. (2001). RNA Conformation and Folding Studied with Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Methods*. 23: 240–254
- Koutmou K, Day-Storms J, Fierke C. (2011). The RNR motif of *B. subtilis* RNase P protein interacts with both PRNA and pre-tRNA to stabilize an active conformer. *RNA*. 17: 1225-1235
- Koutmou K, Zahler N, Kurz J, Campbell F, Harris M, Fierke C. (2009). Protein–Precursor tRNA Contact Leads to Sequence-Specific Recognition of 5' Leaders by Bacterial Ribonuclease P. *Journal of Molecular Biology*. 396: 195-208
- Krivenko A, Kazantsev AV, Adamidi C, Harrington DJ, Pace NR. (2002). Expression, purification, crystallization and preliminary diffraction analysis of RNase P protein from *Thermotoga maritima*. *Acta Crystallographica*. D58: 1234-1236
- Krugh TR, Wittlin FN, Cramer SP. (1975). Ethidium Bromide - dinucleotide complexes. Evidence for intercalation and sequence preferences in binding to double-stranded nucleic acids. *Biopolymers*. 14: 197-210.
- Krupp G. (2003). Antisense oligoribonucleotides and RNase P. A great potential. *Biochimie*. 75(1-2): 135-139
- Kurz JC, Niranjanakumari S, Fierke CA. (1998). Protein component of *B. subtilis* RNase P specifically enhances the affinity for precursor tRNA^{Asp}. *Biochemistry*. 37: 2393–2400
- Lakowicz JR. (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd edition. US: Springer.
- Life Technologies Corp. (2013). Product Spectra - Ethidium bromide/DNA. [Electrónico]. <http://es-mx.invitrogen.com/site/mx/es/home/support/Product-Technical-Resources/Product-Spectra.1305dna.html>. [Recuperado en Noviembre de 2012, de WWW].
- Life Technologies. (2011). Protein Thermal Shift Studies. User Guide. US: Applied Biosystems.
- Liu F, Altman S (editors). (2010). Ribonuclease P. *Protein Reviews Series*. Volume 10. USA: Springer
- Liu F, Altman S. (1996). Requirements for cleavage by a modified RNase P of a small model substrate. *Nucleic Acids Research*. 24 (14): 2690-2696
- Lo MC, Aulabaugh A, Jin G, Cowling R, Bard J, Malamas M, Ellestad G. (2004). Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Analytical Biochemistry*. 332: 153-159

- Lorenz R, Bernhart SH, Höner zu Siederdisen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, Hofacker IL. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*. 6 (1): 26
- Marras S, Kramer F, Tyagi S. (2002). Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research*. 30 (21): e122
- McClain W, Guerrier-Takada C, Altman S. (1987). Model substrates for an RNA enzyme. *Science*. 238: 527-530
- McClain W, Lai L, Gopalan V. (2010). Trials, travails and triumphs: An account on RNA catalysis RNase P. *Journal of Molecular Biology*. 397 (3): 627-646
- Mikkelsen NE, Brännvall M, Virtanen A, Kirsebom LA. (1999). Inhibition of RNase P RNA cleavage by aminoglycosides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(11): 6155-60
- Mondragón A. (2013). Structural Studies of RNase P. *Annual Review of Biophysics*. 42:537–57
- Moumné R, Catala M, Larue V, Micouin L, Tisné C. (2012). Fragment-based design of small RNA binders: Promising developments and contribution of NMR. *Biochimie*. 94: 1607-1619
- Murray CW, Blundell TL. (2010). Structural biology in fragment-based drug design. *Current Opinion in Structural Biology*. 20:497–507
- Myszka D, Paul J. (2011). Exploring the horizons of small molecule drug discovery: the evolution and application of the ideal fragment library. *Drug Discovery World* 12: 51-58
- Nair PC, Malde AK, Drinkwater N, Mark AE. (2012). Missing Fragments: Detecting Cooperative Binding in Fragment-Based Drug Design. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 3: 322–326
- Pan T (2010). Folding of Bacterial RNase P RNA. Chapter 5 in: Liu F, Altman S (editors). (2010). Ribonuclease P. *Protein Reviews Series*. Volume 10. USA: Springer
- Papadimou E, Georgiou S, Tsambaos D, Drainas D. (1998). Inhibition of Ribonuclease P Activity by Retinoids. *Journal of Biological Chemistry*. 273 (38): 24375–24378
- Papadimou E, Monastirli A, Stathopoulos C, Tsambaos D, Drainas D. (2000a). Modulation of ribonuclease P activity by calcipotriol. *European Journal of Biochemistry*. 267: 1173-1177
- Papadimou E, Monastirli A, Tsambaos D, Drainas D. (2000b). Additive Inhibitory Effect of Calcipotriol and Anthralin on Ribonuclease P Activity. *Biochemical Pharmacology*. 60: 91–94
- Rawat N, Biswas P. (2011). Shape, flexibility and packing of proteins and nucleic acids in complexes. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 13(20): 9632-9643
- Reiter N, Osterman A, Mondragon A. (2012). The bacterial ribonuclease P holoenzyme requires specific, conserved residues for efficient catalysis and substrate positioning. *Nucleic Acids Research*. 1-10
- Reiter N, Osterman A, Torres-Larios A, Swinger K, Pan T, Mondragon A. (2010). Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA. *Nature*. 468: 784-791
- Schulz MN, Hubbard RE. (2009). Recent progress in fragment-based lead discovery. *Current opinion in pharmacology*. 9: 615-621
- Scott D, Coyne A, Hudson S, Abell C. (2012). Fragment-based approaches in drug discovery and chemical biology. *Biochemistry*. 51: 4990-5003

- Seeliger D, de Groot BL. (2010). Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 24: 417–422
- Starck SR, Roberts RW. (2002). Puromycin oligonucleotides reveal steric restrictions for ribosome entry and multiple modes of translation inhibition. *RNA*. 8(7): 890–903
- Stathopoulos C, Tsagla A, Tekos A, Drainas D. (2000). Effect of peptidyltransferase inhibitors on ribonuclease P activity from *Dictyostelium discoideum*. Effect of antibiotics on RNase P. *Molecular Biology Reports*. 27: 107–111
- Sun L, Campbell FE, Zahler NH, Harris ME. (2006). Evidence that substrate-specific effects of C5 protein lead to uniformity in binding and catalysis by RNase P. *EMBO Journal*. 25: 3998–4007
- Tekos A, Tsagla A, Stathopoulos C, Drainas D. (2000). Inhibition of eukaryotic ribonuclease P activity by aminoglycosides: kinetic studies. *FEBS Letters*. 485: 71-75
- Thakur C, Xu Z, Wang Z, Novince Z, Silverman R. (2005). A convenient and sensitive fluorescence resonance energy transfer assay for RNase L and 2',5' oligoadenylates. *Methods in Molecular Medicine*. 116:103-113
- Therapeutic Targets Database. (2012, Marzo). RNase P RNA / RNase P protein. [Electrónico]. <http://bidd.nus.edu.sg/group/cjtttd/ZFTTDDetail.asp?ID=TTDR00061>; <http://bidd.nus.edu.sg/group/cjtttd/ZFTTDDetail.asp?ID=TTDR01208>. [Recuperado en Abril de 2012, de WWW].
- Thermo Fisher Scientific. (2012). Maybridge library. [Electrónico]. <http://www.maybridge.com>. [Recuperado en Febrero de 2012, de WWW].
- Thermo Fisher Scientific. (2012). The Maybridge Ro3 Fragment Library Brochure [Electrónico]. <http://www.maybridge.com>. [Recuperado en Febrero de 2012, de WWW].
- Torres-Larios A, Swinger KK, Pan T, Mondragón A. (2006). Structure of ribonuclease P—a universal ribozyme. *Current Opinion in Structural Biology*. 16: 327–335
- Townsend H, Jha B, Han J, Maluf K, Silverman R, Barton D. (2008). A viral RNA competitively inhibits the antiviral endoribonuclease domain of RNase L. *RNA*. 14: 1026-1036
- TriLink BioTechnologies, Inc. (2012). Quenchers. [Electrónico]. <http://www.trilinkbiotech.com/tech/quenchers.asp>. [Recuperado en Abril de 2012, de World Wide Web].
- Trott O, Olson AJ. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 31(2): 455–461
- Trylska J, Thoduka SG, Dabrowska Z. (2013). Using sequence-specific oligonucleotides to inhibit bacterial rRNA. *ACS Chemical Biology*. 8 (6): 1101–1109
- University of Texas Medical Branch. (2010-2011). Docking at UTMB. Watowich Lab. [Electrónico]. <http://docking.utmb.edu/index.php>. [Recuperado en Abril de 2012, de World Wide Web].
- Vioque A. (1989). Protein synthesis inhibitors and catalytic RNA. Effect of puromycin on tRNA precursor processing by the RNA component of Escherichia coli RNase P. *FEBS Letters*. 246:137–139
- Vitiello D, Pecchia DB, Burke JM. (2000). Intracellular ribozyme-catalyzed trans-cleavage of RNA monitored by fluorescence resonance energy transfer. *RNA*. 6(4): 628–637

- Vourekas A, Stamatopoulou V, Toumpeki C, Tsitlaidou M, Drainas D. (2008). Insights into Functional Modulation of Catalytic RNA Activity. *IUBMB Life*. 60 (10): 669-683
- Waldrop GL. (2009). Smaller Is Better for Antibiotic Discovery. *ACS Chemical Biology*. 4(6): 397-399
- Walker SC, Engelke DR. (2006). Ribonuclease P: The evolution of an ancient RNA enzyme. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 41: 77-102
- Walker SC, Engelke DR. (2010). A Protein-Only RNase P in Human Mitochondria. *Cell*. 135(3): 412-414
- Whittaker M, Law RJ, Ichihara O, Hestekamp T, Hallett D. (2010). Fragments: past, present and future. *Drug Discovery Today, Technologies*. 7 (3): e163-e171
- Willkomm DK, Gruegelsiepe H, Goudinakis O, Far RKK, PD RB, Erdmann VA, Hartmann RK. (2003). Evaluation of Bacterial RNase P RNA as a Drug Target. *ChemBioChem*. 4 (10): 1041-1048
- Willkomm DK, Pfeffer K, Klebe G, Hartmann RK. (2010). RNase P as drug target. Chapter 13 in: Liu F, Altman S (editors). (2010). Ribonuclease P. *Protein Reviews Series*. Volume 10. USA: Springer
- Zahler N, Christian E, Harris M. (2003). Recognition of the 5' leader of pre-tRNA substrates by the active site of ribonuclease P. *RNA*. 9:734-745
- Zenobia Therapeutics. (2012). Fragment Library 1. [Electrónico]. http://www.zenobiatherapeutics.com/Library_1.html. [Recuperado en Mayo de 2012, de World Wide Web].
- Zhang L, Bandy B, Davison A. (1996). Effects of metals, ligands and antioxidants on the reaction of oxygen with 1,2,4-benzenetriol. *Free Radical Biology and Medicine*. 20(4): 495-505
- Zhang L, Wang Y, Shang N, Smith M. (1998). Benzene metabolites induce the loss and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in human lymphocytes. *Leukemia Research*. 22 (2): 103-113
- Zhang R, Monsma F. (2010). Fluorescence-based thermal shift assays. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 13(4): 389-402
- Zhang Z, Li Y, Lin B, Schroeder M, Huang B. (2011). Identification of cavities on protein surface using multiple computational approaches for drug binding site prediction. *Bioinformatics*. 27 (15): 2083-2088

8. Anexos

Anexo 1. Ensayos de actividad de RNasa P en alto rendimiento para selección de inhibidores para la biblioteca Zenobia

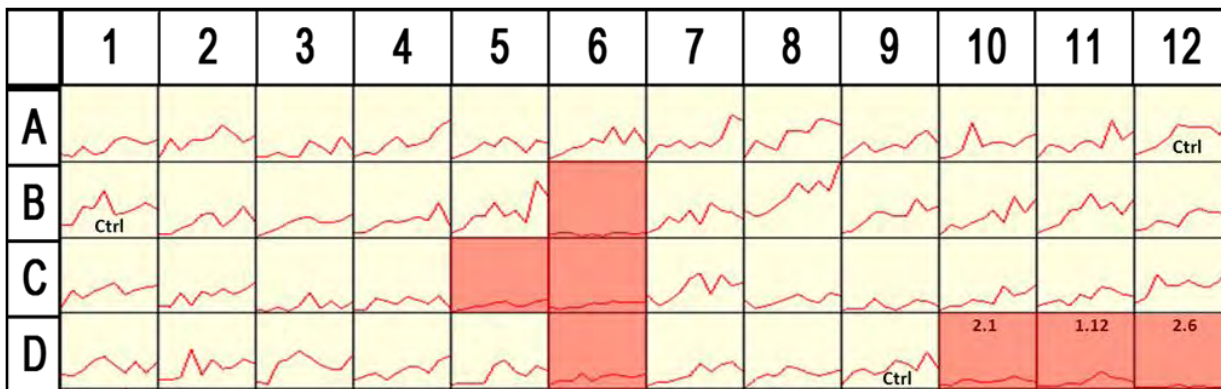
A continuación se muestran los ensayos de actividad realizados para los fragmentos a prueba en placas multipozo. En todas las placas, se marcaron con rojo los ensayos identificados como positivos para inhibición según la selección descrita en “Resultados”. Si la placa se muestra fragmentada indica que la lectura se realizó en diferentes corridas

En algunas cinéticas se muestra dentro del cuadrado una nota, indicando si es control de actividad, la concentración de disolvente agregada respecto a la concentración de trabajo (ej. 1x, 2x, 3x, etc. serían uno, dos, o tres volúmenes de disolvente respecto al volumen de solución de fragmentos adicionada en cada pozo) o el coctel o fragmento al que corresponde dicho ensayo.

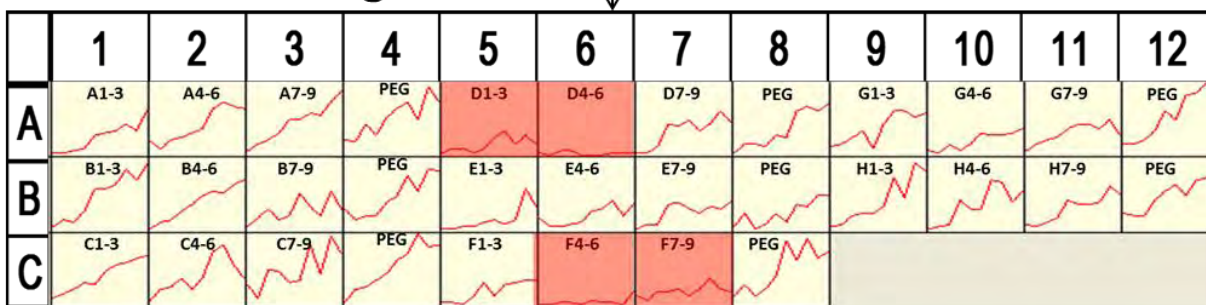
i. Estrategia de selección de fragmentos de la biblioteca Zenobia

La decodificación de la placa de cocteles de 8 fragmentos es como sigue: la fila A corresponde a la placa 1 de Zenobia, la fila B a la placa 2, y así respectivamente. Sobre las columnas, cada pozo es la mezcla de los 8 fragmentos de la misma columna de la placa respectiva de la biblioteca Zenobia. Sobre los pozos A12, B1 y D9, éstos son controles experimentales de actividad con DMSO. Los cocteles respectivos a esos pozos se realizaron en los pozos D10 y D11, mientras que el D12 es un replicado del coctel 2.6.

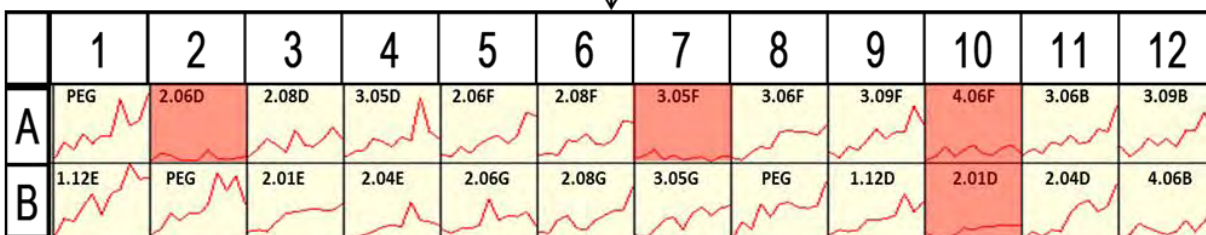
Cocteles de 8 fragmentos



Cocteles de 3 fragmentos



Individuales



En la placa que corresponde a los cocteles de 3 fragmentos, el nombre de la mezcla evaluada se indica en cada pozo. Dichas mezclas se hicieron a partir de fragmentos individuales, haciendo combinaciones de compuestos antes no mezclados para poder describir el posible efecto inhibitor de algunas mezclas de fragmentos en lugar de compuestos individuales.

Cada mezcla, cuyo nombre se indica en negritas en la lista abajo mostrada, se compone de los 3 fragmentos enumerados, nombrados con un código relativo a la biblioteca 1 de Zenobia. Dicho código se compone como sigue: Primer número = Placa de la biblioteca 1 de Zenobia; Segundo número (después del punto) = Número de Columna de la placa respectiva; Letra final = Fila en la que se encuentra el compuesto (Ejemplo: El fragmento 2.08C está localizado en la placa 2, columna 8, fila C de la biblioteca 1 de Zenobia):

A1-3: 1.12A, 2.01A, 2.04A
A4-6: 2.06A, 2.08A, 3.05A
A7-9: 3.06A, 3.09A, 4.06A
B1-3: 1.12B, 2.01B, 2.04B
B4-6: 2.06B, 2.08B, 3.05B
B7-9: 3.06B, 3.09B, 4.06B
C1-3: 1.12C, 2.01C, 2.04C
C4-6: 2.06C, 2.08C, 3.05C
C7-9: 3.06C, 3.09C, 4.06C
D1-3: 1.12D, 2.01D, 2.04D
D4-6: 2.06D, 2.08D, 3.05D
D7-9: 3.06D, 3.09D, 4.06D
E1-3: 1.12E, 2.01E, 2.04E
E4-6: 2.06E, 2.08E, 3.05E
E7-9: 3.06E, 3.09E, 4.06E
F1-3: 1.12F, 2.01F, 2.04F
F4-6: 2.06F, 2.08F, 3.05F
F7-9: 3.06F, 3.09F, 4.06F
G1-3: 1.12G, 2.01G, 2.04G
G4-6: 2.06G, 2.08G, 3.05G
G7-9: 3.06G, 3.09G, 4.06G
H1-3: 1.12H, 2.01H, 2.04H
H4-6: 2.06H, 2.08H, 3.05H
H7-9: 3.06H, 3.09H, 4.06H

Tal como se describe en los resultados, un ejemplo de la selección de compuestos sería como se explica a continuación en sentido inverso a la manera en la que se realizó experimentalmente: El fragmento 2.06D (pozo A2 de la placa "Individuales"), con actividad aparentemente inhibidora, deconvuelto a partir de la mezcla D4-6 (pozo A6 de la placa "Cocteles de 3 fragmentos"), fue encontrado en los primeros ensayos en el pozo B6 y su replicado en el pozo D12 de la placa "Cocteles de 8 fragmentos". Otro ejemplo sería la selección del fragmento 3.05F (pozo A7 de la placa "Individuales"), con actividad aparentemente inhibidora, que fue encontrado en la mezcla F4-6 (pozo C6 de la placa "Cocteles de 3 fragmentos"), a su vez rescatado de los primeros ensayos en el pozo C5 de la placa "Cocteles de 8 fragmentos".

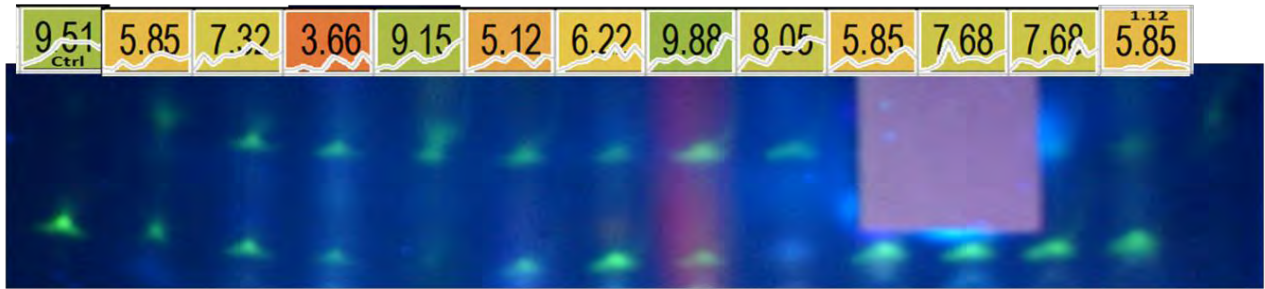
Anexo 2. Correlación de actividad en gel con ensayo HT para RNasa P con cocteles de fragmentos de biblioteca Zenobia

En este anexo se muestran los ensayos de alto rendimiento mostrados en el anexo 1.i con los cocteles de 8 fragmentos de la biblioteca Zenobia. La decodificación de la placa de cocteles de 8 fragmentos es como sigue: la fila 1 corresponde a la placa 1 de Zenobia, la fila 2 a la placa 2, y así respectivamente. En cada placa se incluye un experimento control con la concentración de trabajo de PEG-400. El último carril de los experimentos en la fila 1 y 2 corresponden a la banda de la minihélice sin catalizar.

Se muestran en cada pozo los valores de actividad enzimática de RNasa P relativa, calculados con la pendiente de la regresión lineal de las curvas de fluorescencia vs. tiempo. Se coloreó cada ensayo estableciendo un código de colores tipo semáforo, donde en rojo y naranja oscuro se pueden identificar los ensayos con inhibición. La fluorescencia no debida al sustrato minihélice se atribuye a la fluorescencia diversa de los fragmentos bajo luz UV.

Los resultados de los geles y su correlación con los ensayos en alto rendimiento se comentan y discuten en la sección *Resultados y discusiones particulares* dentro del texto.

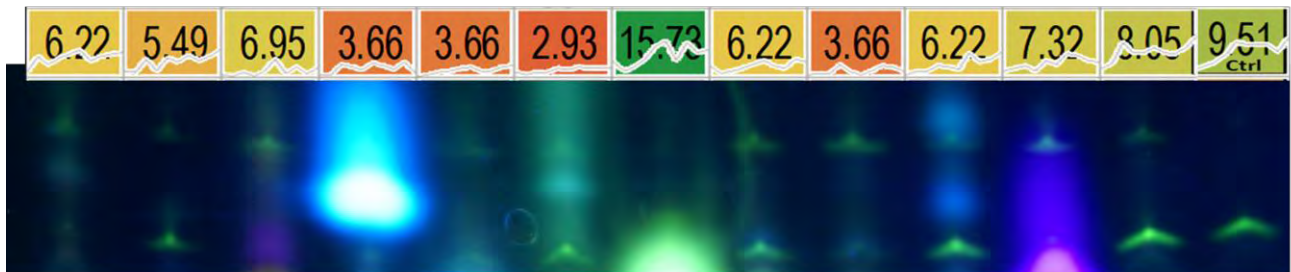
Fila 1



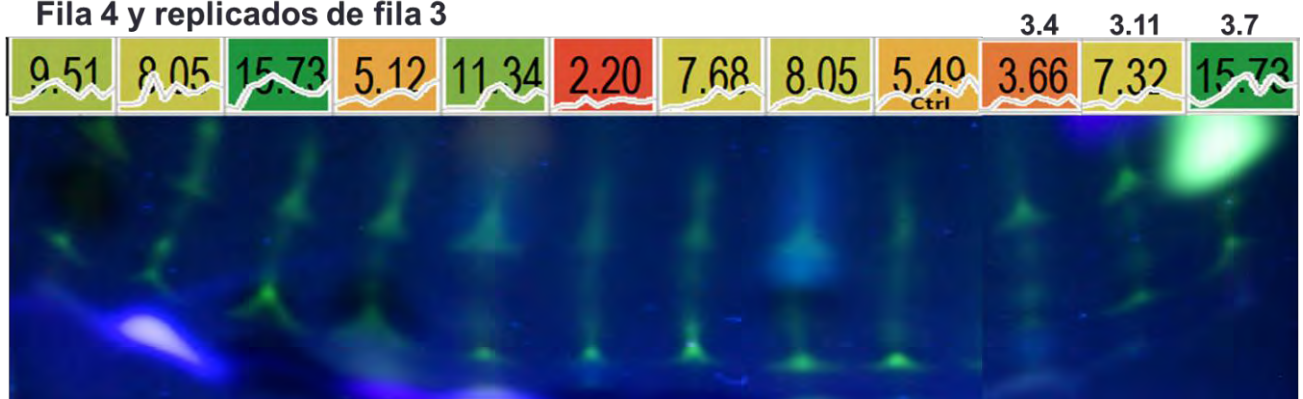
Fila 2



Fila 3



Fila 4 y replicados de fila 3



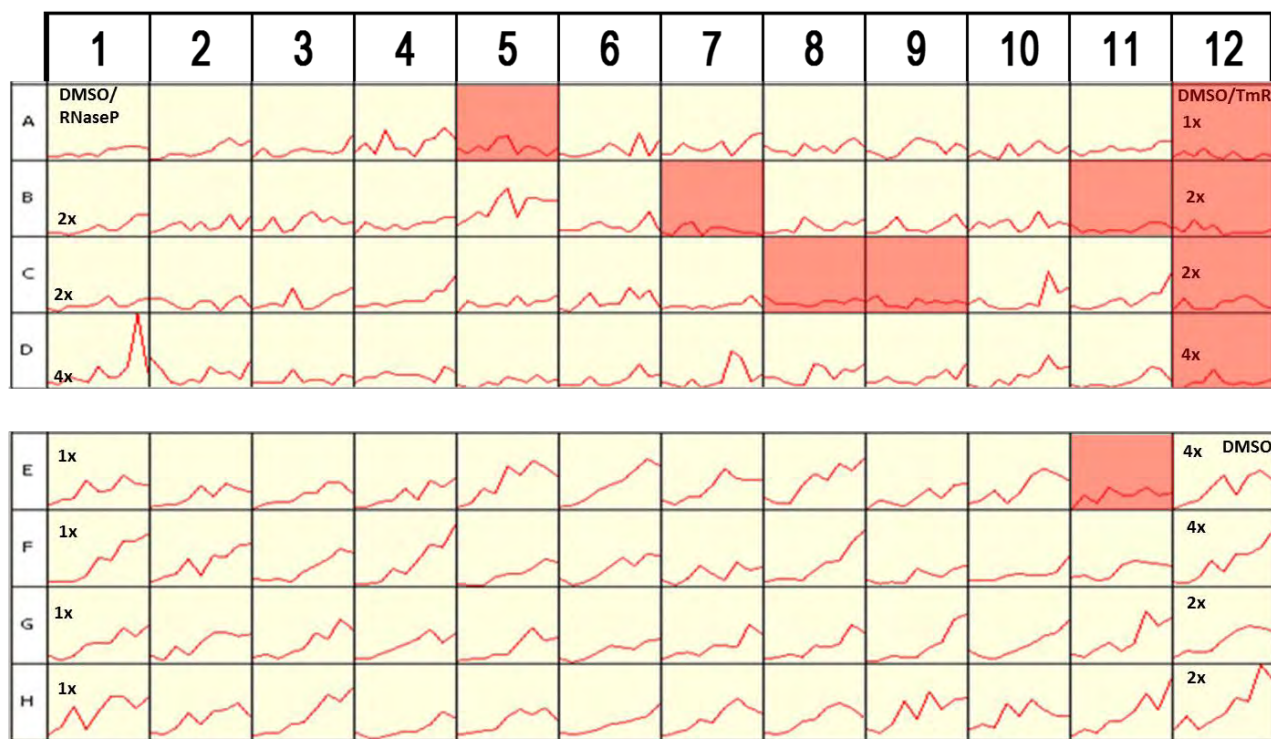
Anexo 3. Ensayos de actividad de RNasa P en alto rendimiento para selección de inhibidores para la biblioteca Maybridge

i. Estrategia de selección de fragmentos de la biblioteca Maybridge

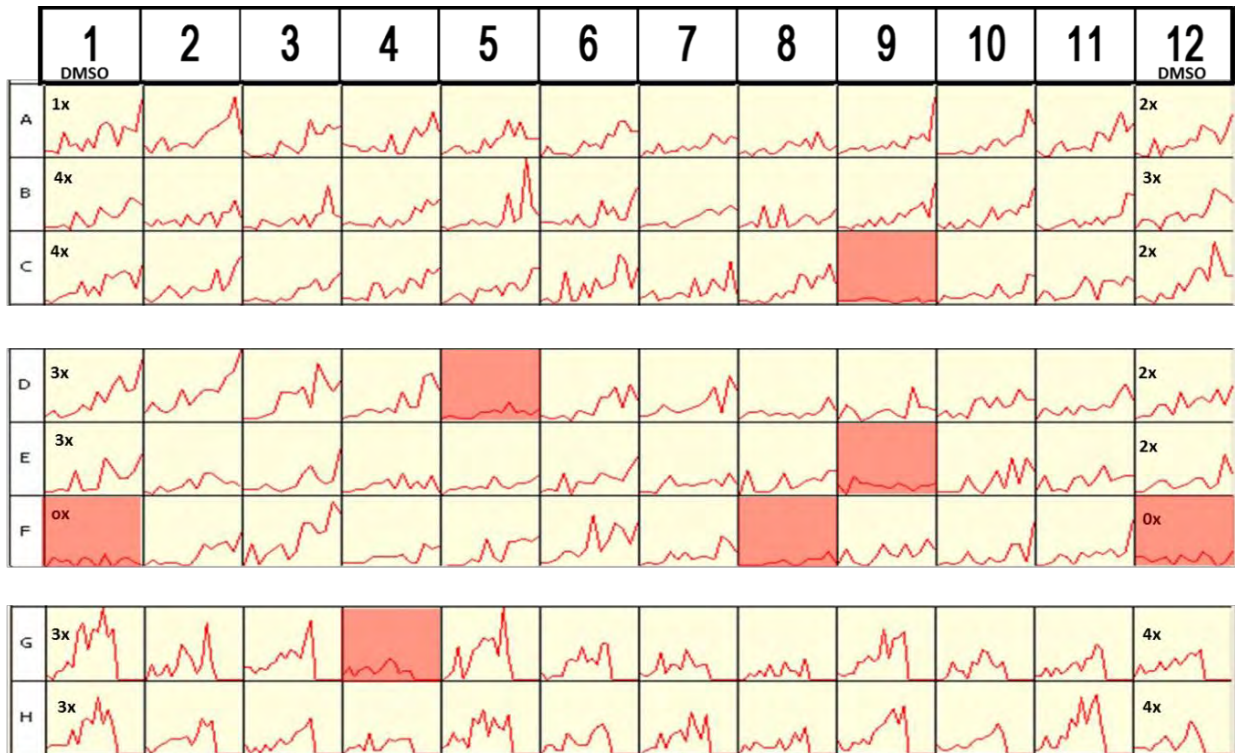
Para las placas de la biblioteca Maybridge, los fragmentos probados son los ensayos de las columnas 2 a la 11. En las columnas 1 y 12 de todas las placas se agregaron controles de actividad con DMSO u otras condiciones usadas para establecer valores de referencia de actividad. Sobre los controles, todos se realizaron con RNasa P holoenzima, a menos que se indique TmR en la parte superior, las cuales fueron realizadas sólo con la subunidad de RNA de la RNasa P.

En las placas I, II, III y IV, donde se probaron cocteles de fragmentos, se marcaron en rojo los ensayos que, por inspección visual, se consideraron con inhibición.

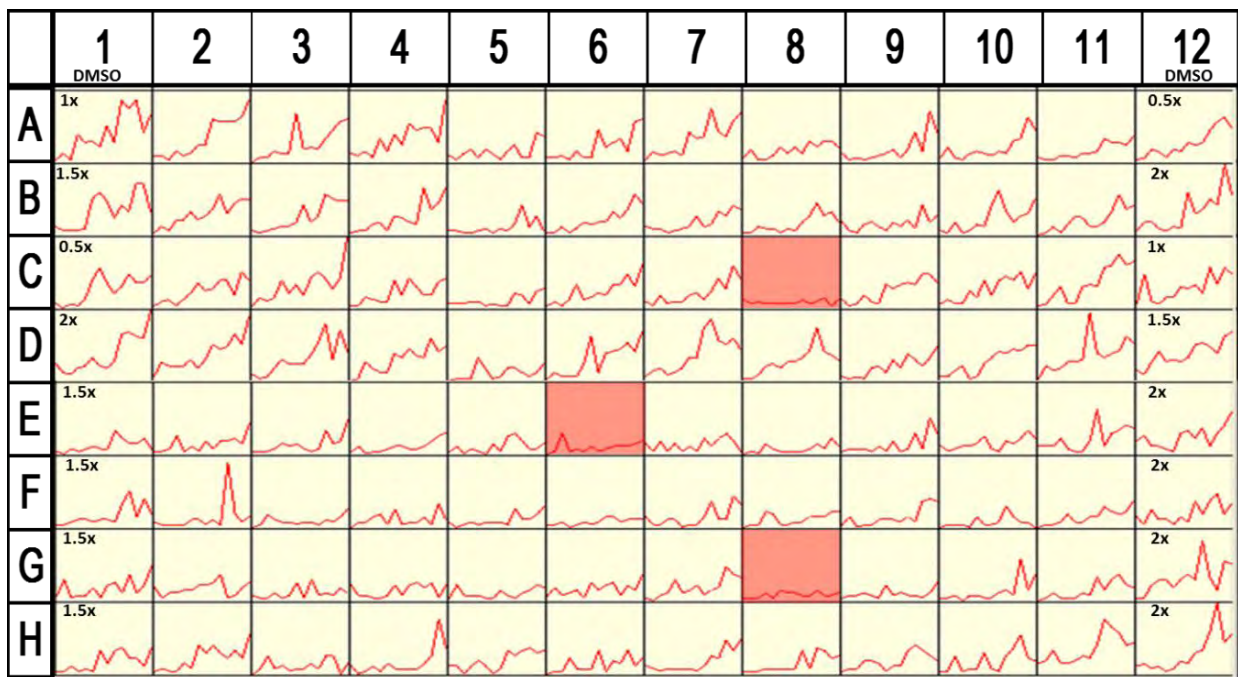
I. Placa 1 y 2 de Maybridge



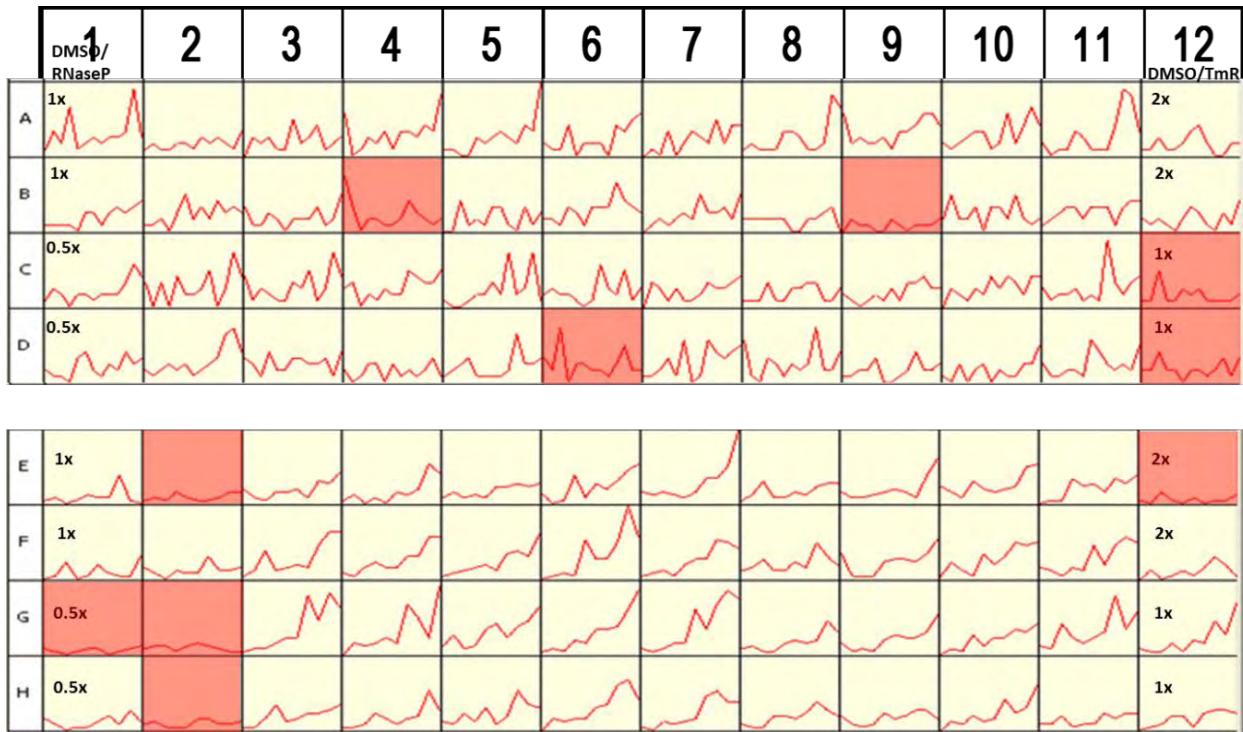
II. Placa 3 y 4 de Maybridge



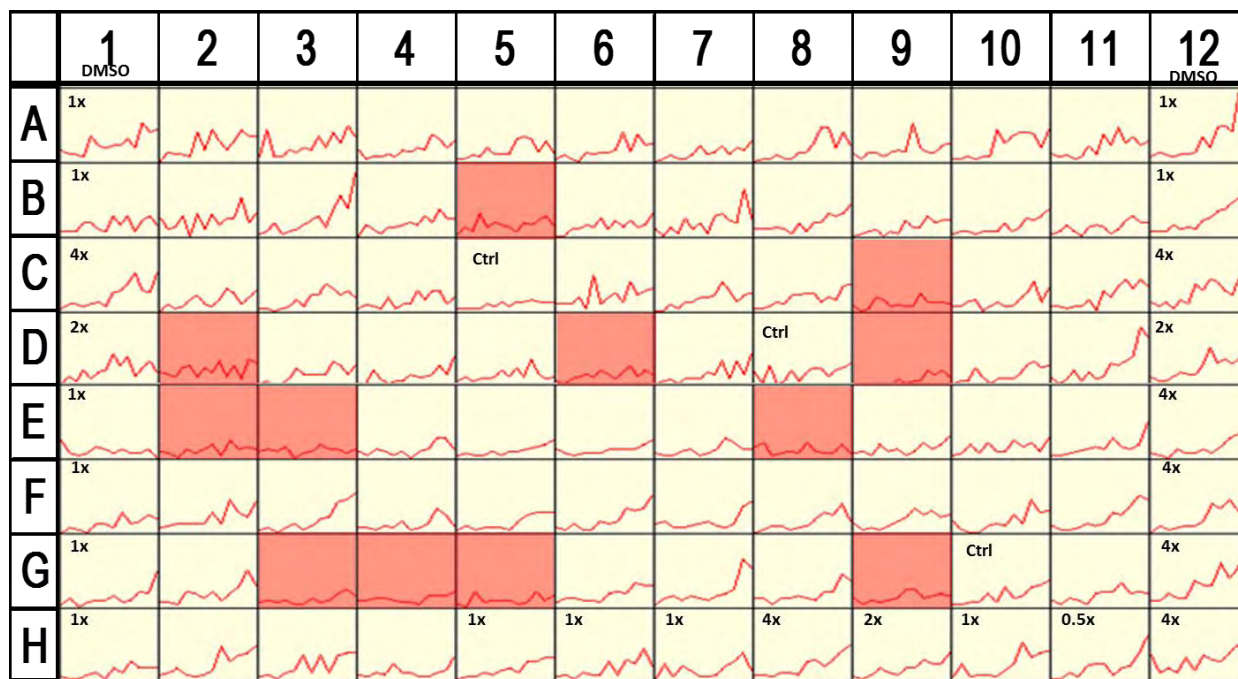
III. Placa 5 a 8 de Maybridge



IV. Placa 9 a 13 de Maybridge



ii. Ensayos con fragmentos potenciales individuales de Maybridge



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1x	1A5	1B7	1B11	1C8	1C9	1E 11	2A5	2B7	2B11	2C8	1x
B	1x	2C9	2E 11	3C9	3D5	3E 8	3F8	3G4	4C9	4D5	4E 8	1x
C	4x	4F8	4G4	5C8	Ctrl	5G5	5G8	6C8	6E 6	6G5	6G8	4x
D	2x	7C8	7E 6	7G5	7G8	8C8	8E 6	Ctrl	8G8	9B4	9B5	2x
E	1x	9B9	9D6	9E 2	9G2	9H3	10B4	10B5	10B9	10D6	10E 2	4x
F	1x	10G2	10H2	11B4	11B5	11B9	11D6	11E 2	11G2	11H2	12B4	4x
G	1x	12B5	12B9	12D6	12E 2	12G2	12H2	13B4	13B5	Ctrl	13D6	4x
H	1x	13E 2	13G2	13H2	1x	1x	1x	4x	2x	1x	0.5x	4x

La correspondencia de los fragmentos de Maybridge probados en la primera placa mostrada en esta página se muestra en la imagen siguiente, con nomenclatura

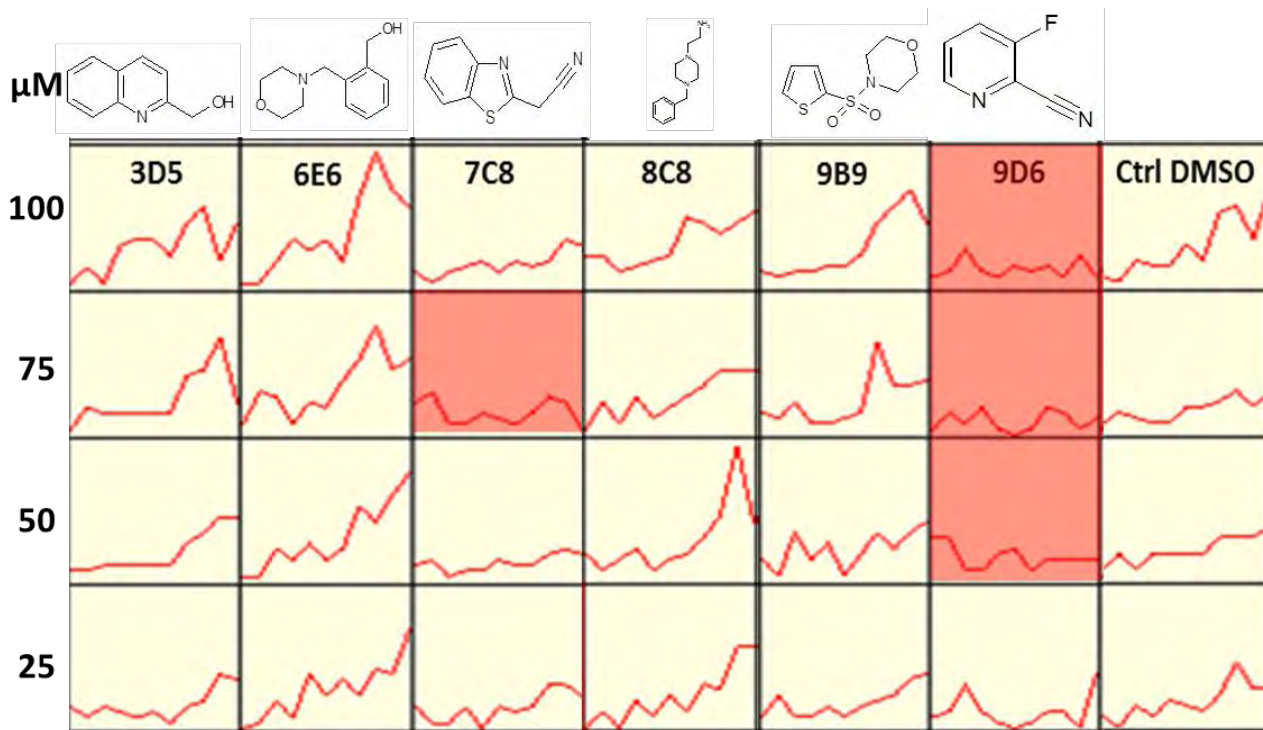
placa-coordenada (Ej. El fragmento en la coordenada E6 de la placa 6 de Maybridge se muestra como 6E6).

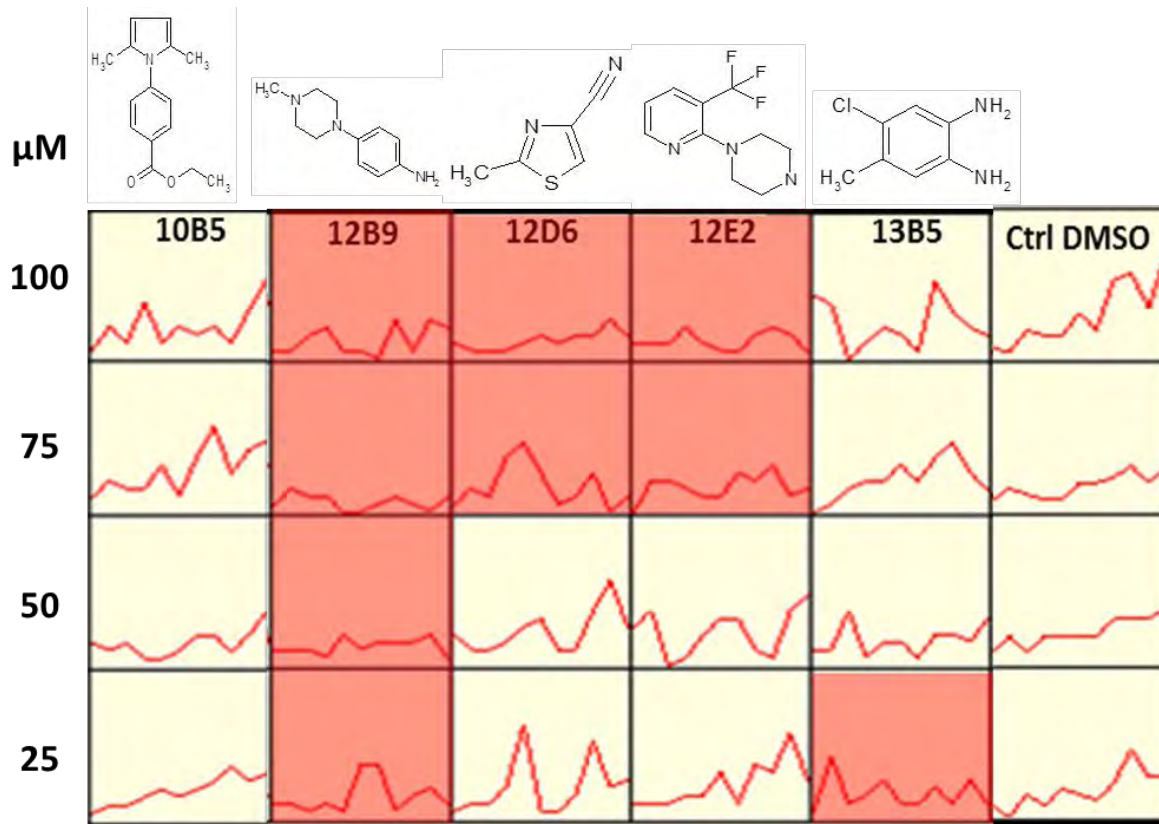
En estos ensayos se incluyen controles (indicados como “ctrl”) y ensayos con el disolvente DMSO indicando la concentración de disolvente agregada respecto a la concentración de trabajo (ej. 1x, 2x, 3x, etc. serían uno, dos, o tres volúmenes de disolvente respecto al volumen de solución de fragmentos adicionada en cada pozo).

iii. Ensayos con 4 concentraciones de fragmentos potenciales de Maybridge

Tras la selección de 12 fragmentos potenciales de la biblioteca de Maybridge (para el fragmento 8G8 no se realizó este ensayo por una omisión experimental), se probaron 4 concentraciones diferentes de cada uno de los fragmentos, de 25 a 100 μM en orden decreciente de manera vertical, para descartar falsos positivos.

Se indica en la primera fila el fragmento evaluado en las 4 celdas hacia abajo de la misma columna y en la parte superior se muestra la estructura química de la molécula correspondiente. En la última columna se muestra un control con DMSO, disolvente en el que los fragmentos de la biblioteca de Maybridge están disueltos.





Anexo 4. Publicaciones y presentaciones derivadas del presente proyecto

i. Manuscrito en preparación

Para someter a *Analyst* (RSC Publishing) en Octubre del 2013.

A novel high-throughput fluorescence-based assay for the detection of bacterial ribonuclease P activity and its application for screening inhibitors

Díaz-Tufinio C¹, Varela-Gómez M², Torres-Larios A¹

¹Biochemistry and Structural Biology Dept., Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México; ²Medical Proteomics Unit, Instituto Nacional de Medicina Genómica

*Correspondence to:

Alfredo Torres-Larios

Biochemistry and Structural Biology Dept., Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico DF, Mexico

Tel: 152 55 5622 5640

Fax: 152 55 5622 5630

E-mail: torres@ifc.unam.mx

Abstract

RNase P, a ubiquitous and essential ribozyme that cleaves the 5'-leader sequence of tRNAs, is an attractive pharmacological target for combating bacterial resistance to antibiotics. The lack of high-throughput, analytical methods to measure the catalytic activity of RNase P, however, is a bottleneck in the discovery of inhibitory compounds. In this work, we describe the design and optimization of a novel, non-toxic activity assay for RNase P based on a small fluorescent substrate. The resulting fluorescent minihelix shows an increase in sensitivity due to its 100-fold lower RNase P catalytic efficiency than the natural pre-tRNA RNase P substrate. This fluorescent probe allows for direct in-gel detection and, through the inclusion of a FRET quencher, can be monitored in a high-throughput ribozyme activity assay. Using this technique, we performed a preliminary characterization of a bacterial RNase P holozyme and further inhibition screening using a fragment library in 96-well microplates. We clearly identified an RNase P inhibitor that, although it is not specific for the ribozyme, serves as proof-of-concept demonstrating this method's utility for discovering potential RNase P-targeted therapeutics.

Keywords

Ribonuclease P, Catalytic activity, Drug discovery, High-Throughput Screening (HTS), Fluorescence

Introduction

Antibiotic resistance of pathogenic microorganisms is a growing health concern that presents many challenges for effective medical treatment. One of the fundamental difficulties in expanding our repertoire of usable antimicrobial agents stems from the relatively small number of biological pathways that are targeted by current antibiotic therapies. Presently, most bacterial infection treatment regimens target a limited set of enzymes, principally those involved in cell wall, cell membrane, RNA, and protein biosynthetic pathways. To overcome current drug resistances ¹, it is therefore paramount to develop novel antibiotics with alternative molecular targets.

Among the many structures and functions of RNA molecules, ribozymes and RNA-protein complexes have been posited as feasible targets due to their key roles in microbial physiology ². Specifically, ribonuclease P (RNase P) is an essential gene in prokaryotes ³, making it a potential antibacterial drug target ⁴.

Prokaryotic RNase P is a ribonucleoprotein complex that catalyzes the cleavage of the 5'-leader sequence of pre-tRNAs during tRNA maturation. The complex is composed of an RNA subunit (350-400 nucleotides, 120-125 kDa) and a small protein subunit (~110 amino acids, 14-17.5 kDa) ^{5,6} referred to as the P RNA and the P protein, respectively. The RNA component serves as the primary biocatalyst in the reaction. The function of RNase P protein, inferred from structural and functional data, is to bind the 5'-leader region of the pre-tRNA substrate and assist product release ⁶. This ribozyme is dependent on divalent metal ions; Mg²⁺ is needed for a proper folding and activity ⁷ and at high concentrations of Mg²⁺ *in vitro* (>100 mM), P RNA is catalytically active without the protein subunit ⁸.

RNase P substrate processing is site specific, but not sequence specific, and recognition is mediated by both RNA and protein subunits. While the 'typical' pre-tRNA substrate of this enzyme is usually around 76 nt in length, it has been demonstrated that even 8-12 nt RNAs which form a 3-7 bp duplex can be cleaved by P RNA ⁹. Pre-tRNA recognition elements, such as the 3'-CCA end and 5'-leader sequences ¹⁰, are important for enhancing catalytic efficiency of this ribozyme, but ultimately do not alter the target cleavage site. Furthermore, additional substrates for RNase P that do not contain these recognition elements whatsoever are known (such as the

4.5S RNA⁷). Taken together, these findings suggest that RNase P can act on a gamut of substrate sequences.

Catalysis by RNase P, a diffusion-limited reaction¹¹, is accomplished through a bimolecular nucleophilic substitution (S_N2 reaction) which utilizes two divalent cations to coordinate water molecules and thus facilitate proton transfer⁶. Thus far, the analytical methodology for RNase P activity determination¹² has relied on radiolabeled RNA substrates. After mixing the substrate with RNase P, the RNA product and substrate separated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and exposed to a phosphorimage plate¹². This conventional methodology leaves little chance for detection of RNase P activity on a high-throughput (HT) scale.

In this work, we present the design of an RNase P activity assay using a minimal reported substrate¹³ coupled to a fluorophore on the 3' end and a non-fluorescent quencher on the 5' end. The activity is detected by monitoring FRET, which is amenable to high-throughput screening (HTS) in microplates. This method was used to discover molecules that bind the target RNA, thus inhibiting the activity of the ribozyme.

Results and discussion

FRET substrate probe design and functionality

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) is a physicochemical and spectrophotometrical mechanism used widely in molecular biology for both real-time and end-point assays¹⁴. This mechanism served as the base for designing our synthetic oligonucleotide substrate probe, with a fluorophore molecule and a non-fluorescent quencher (NFQ) molecule at opposing endings. The complete criteria and characteristics of the design of this probe are summarized in Table 1.

When exposed to the excitation wavelength, energy transfer occurs from the fluorophore to the quencher of the intact FRET probe owing to their proximity. If the substrate is cleaved, physical separation of the quencher from the fluorophore allows light emission that can be detected with a spectrofluorometer¹⁸.

A relatively short RNase P substrate ribo-oligonucleotide sequence was selected from literature¹³. The best substrate candidate to fulfill the design assay requirements was the minihelix pMini3pbUG, whose cleavage kinetics were confirmed and characterized by Bränvall *et al*¹³. The 24 nucleotide sequence of this minihelix (5'-GAU CUG AAU GCG GAA ACG CGC CAC-3') is highly predicted to form secondary structure as assessed by RNAFold Web Server¹⁷, with a thermodynamically spontaneous folding of -7.30 kcal/mol (Figure 1.A).

Probes for this type of assay rely on efficient fluorescence quenching; this typically occurs when the fluorophore and quencher are separated from 10 to 100 Å¹⁹. The physical distance between the FRET-pair molecules is predicted to be shorter than the maximum FRET distance (Figure 1.B). Finally, due to the requirement of several excitation-emission cycles per run to obtain kinetic information, Alexa Fluor 488 was selected as the fluorescent dye owed to its high photostability²⁰.

Substrate functionality was first tested in polyacrylamide gels (Figure 2) to ascertain specificity of the ribozyme activity to ensure that the FRET pair molecules (fluorophore and quencher) did not sterically hinder catalysis. After testing for RNase P activity on the modified FRET substrate, confirming the specific cleavage in-gel and optimizing this reaction in microplates (data not shown), we performed a preliminary ribozyme characterization and HTS with a commercial library, looking for potential inhibitor fragments.

Characterization of RNase P with novel fluorescent assay

A set of kinetic plots demonstrates the functionality of RNase P assay substrate in high-throughput (Figure 3.A). A preliminary Michaelis-Menten fit and Lineweaver-Burk analysis was performed and the kinetic parameters were calculated (Figure 3.B; Figure 3.C; Figure 3.D; Table 2). The obtained catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of $0.47 \cdot 10^6 \text{ M}/_{\text{min}}$ can be compared with the values obtained by Bränvall *et al*¹³, 110-fold lower compared to the enzymatic parameters of the full size tRNA precursor. In our case, the value for the catalytic efficiency of a full pre-tRNAPhe is $15 \cdot 10^6 \text{ M}/_{\text{min}}$ ⁶. We also tested the minihelix construct without the fluorescent label, and the same RNase P processing pattern was observed (Figure 4). Taken together, these data support that the presence of the fluorophore and the quencher did not affect the activity significantly.

HTS for Zenobia library and selected inhibitory fragments

A HTS of the 352 fragments of Zenobia Library 1 (Figure 5.A) was assayed in the presence of RNase P and the fluorescent substrate in an attempt to find individual fragment inhibitors. Four fragments were identified as possible inhibitors for RNase P activity. Individual assays for these compounds at four different concentrations (Figure 5.B) confirmed the inhibition for three of them.

After validation of inhibitory fragments in PAGE activity assays, the effect was visibly confirmed only for compound 1,2,4-benzenetriol (Figure 6.A). This molecule is known to be a genotoxic and mutagenic benzene metabolite, described to cause oxidative damage in DNA²²⁻²⁴. This compound binds with high affinity to nucleic acids in a sequence-independent manner, probably by stacking interactions. This effect was confirmed using ethidium bromide (EtBr) in a PAGE assay (Figure 6.A). Although it is not possible to use these molecules as potential scaffolds for rational drug design, our results demonstrate that the methodology developed is able to rapidly assess inhibition of ribozyme activity.

To further test the fluorescent probe, known inhibitor molecules of either prokaryotic or eukaryotic RNase P²⁵⁻²⁷ were tested with our recombinant *T. maritima* RNase P (Figure 6.B). All of the compounds demonstrated an inhibitory effect, despite the selectivity of the inhibitors is not tested yet for our experimental RNase P.

Overall, it is remarkable that we were not able to find a specific inhibitor, either for the P RNA or the P protein, at the conditions and concentration of our assay, from around 2,000-fold (in HTS) to 30,000-fold (in PAGE) test compound over RNase concentration. This reflects the lack of high-affinity compounds available for RNase P, despite the previous work of several groups^{26, 28-32}. We can owe this effect to the modest size of the fragment library used, and moreover the under-representation of RNA-targeting molecules in the screen³³. Nonetheless, we expect that the proposed HT method will contribute to more findings and lead-optimization for better RNase P inhibitors.

Experimental

RNase P reconstitution and traditional activity assay

Plasmids coding for the *Thermotoga maritima* RNase P subunit and a canonical substrate, phenylalanine pre-tRNA from *T. maritima*, were produced and purified by CsCl gradient ultracentrifugation. Both RNAs were produced by *in vitro* transcription and purified by denaturing 6% urea-PAGE with standard protocols. Production and purification of *T. maritima* P protein was accomplished as previously reported³⁴.

The reconstitution of the holoenzyme was performed by mixing P RNA and protein in a 1:1.1 ratio in 1X TH buffer (Tris-HCl pH 7.4 33 mM, HEPES 66 mM) and 100 mM (or 400 mM in the absence of the protein subunit to increase activity) ammonium acetate (AmOAc). The mixture was heated to 94°C for 2 minutes in a water bath, then chilled to 0°C for 2 minutes after which 100 mM MgCl₂ was added. The concentration of the reconstituted holozyme was quantified using a ND-100 NanoDrop after which it was stored for several months at -20°C without considerable degradation or loss of activity.

For the conventional activity assay, reactions were incubated for 10 minutes at 50°C (or at 37°C with 400 mM AmOAc) after which the entire reaction volume was loaded onto a denaturing 18% urea-PAGE. UV shadowing or ethidium bromide staining were used to visualize RNA cleavage. Detection of minihelix fluorescence was achieved under UV-lamp with excitation at ~254 nm.

RNase P HT fluorescence activity assay and fragment screening

The minihelix substrate (Figure 1.A) was adopted from a previously published RNase P substrate, pMini3bpUG, described by Bränvall *et al*¹³ and the chemical synthesis was requested to the custom RNA oligo division, Sigma-Aldrich.

For the RNase activity assay, a 60 µL reaction mixture that contains holozyme at final concentration of 20 nM in TH buffer is pre-incubated at 45°C for at least 5 minutes in black 96-well microtiter flat bottom plate (Costar). The reaction is then initiated by adding 210 nM of the FRET substrate probe. In fragment screening assays, an initial concentration of 50-150 µM of each test compound was added to holozyme and pre-incubated for 5 minutes with gentle agitation at 45°C prior to substrate addition and the basal fluorescence of each reaction was measured.

Immediately after adding the substrate, kinetic activity was monitored at 45°C with at least 10 readings per well every 90-120 seconds in a DTX 880 XS Multimode Detector (Beckman Coulter). The probe was excited at 485 nm and FRET monitored at 535 nm with an integration time of 3 sec. From the kinetic plots of Relative Fluorescent Units (RFU) versus time, linear regression was used to fit the slopes in the linear portion of the curves with at least 7 data points to obtain initial velocities with the Multimode Detection Software, version 2.0.0.12 (Beckman Coulter). Enzyme kinetic non-linear fits for calculating Michaelis-Menten parameters were performed using GraphPad Prism[®] 6.01 software.

For the HTS with fragments, Zenobia Therapeutics Library 1 dissolved in PEG-400 was tested. The 352 compounds from the library were initially tested in cocktails of 8 fragments per well. Subsequently, cocktails that showed inhibition were then taken to determine the individual fragments responsible for inhibition.

Conclusion

HTS methods are among the most common and preferred options for contemporary drug discovery. This is especially true in the case of fragment-based drug design³⁵ since these techniques optimize reagent volumes and improve the output of the drug development process. As one of the two essential, ubiquitous, multiple turnover ribozymes known, RNase P is a highly attractive drug target. The highly sensitive, fluorescence-based high-throughput assay proposed here aims to enhance the suitability of RNase P as a screenable target, allowing for the search of greater chemical spaces and the discovery of specific inhibitory compounds.

Acknowledgements

We thank Jonathan Ipsaro for critical reading of the manuscript and Adelaida Díaz-Vilchis for her technical support on the purification of the P protein. CDT was supported by a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) during the development of this project. This work was supported by CONACYT, grant CB2011-164838, and by the Universidad Nacional Autónoma de México, through the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) grant IN201213, to ATL. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. All authors declare no competing financial or other conflict of interests.

Bibliographic references

1. G. L. Waldrop, *ACS Chem. Biol.*, 2009, vol. 4, pp. 397-399.
2. S. A. Kawamoto, C. G. Sudhahar, C. L. Hatfield, J. Sun, E. J. Behrman and V. Gopalan, *Nucleic Acids Res.*, 2008, vol. 36, pp. 697-704.
3. A. V. Kazantsev and N. R. Pace, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2006, vol. 4, pp. 729-744.
4. D. K. Willkomm, H. Gruegelsiepe, O. Goudinakis, R. Kretschmer-Kazemi Far, R. Bald, V. A. Erdmann and R. K. Hartmann, *ChemBioChem*, 2003, vol. 4, pp. 1041-1048.
5. S. Altman, *Phil. Trans. R. Soc. B*, 2011, vol. 366, pp. 2936-2941.
6. N. Reiter, A. Osterman, A. Torres-Larios, K. Swinger, T. Pan and A. Mondragon, *Nat.*, 2010, vol. 468, pp. 784-791.
7. A. Mondragón, *Annu. Rev. Biophys.*, 2013, vol. 42, pp. 537-557.
8. C Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace and S. Altman, *Cell*, 1983, vol. 35, pp. 849-857.
9. F. Liu and S. Altman, *Nucleic Acids Res.*, 1996, vol. 24, pp. 2690-2696.
10. N. Zahler, E. Christian and M. Harris, *RNA*, 2013, vol. 9, pp. 734-745.
11. K. Koutmou, N. Zahler, J. Kurz, F. Campbell, M. Harris and C. Fierke, *J. Mol. Biol.*, 2009, vol. 396, pp. 195-208.
12. M. Gössringer, D. Helmecke and R. K. Hartmann, in *Ribozymes: Methods and Protocols*, ed, J. S. Hartig, *Methods Mol. Biol.*, 2012, vol. 848.
13. M. Bränvall, E. Kikovska, S. Wu and L. Kirsebom, *J. Mol. Biol.*, 2007, vol. 372, pp. 1149-1164.
14. M. K. Johansson, *Methods Mol. Biol.*, 2006, vol. 335, pp. 17-29.
15. S. Marras, F. Kramer and S. Tyagi, *Nucleic Acids Res.*, 2002, vol. 30, pp. e122.
16. TriLink BioTechnologies Inc., 2010, <http://www.trilinkbiotech.com/tech/quenchers.asp>, Retrieved on April 2012, from World Wide Web.
17. A. R. Gruber, R. Lorenz, S. H. Bernhart, R. Neuböck and I. L. Hofacker, *Nucleic Acids Res.*, 2008, vol. 36, suppl. 2, pp. W70-W74.
18. C. Thakur, Z. Xu, Z. Wang, Z. Novince, Z and R. Silverman, *Methods Mol. Med.*, 2005, vol. 116, pp. 103-113.
19. D. Klostermeier and D. Millar, *Methods*, 2001, vol. 23, pp. 240-254.
20. J. Lakowicz, in *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, 3rd edn., 2006, ch. 3, pp. 70-71.
21. D.C. Schriemer and O. Hindsgaul, *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 1998, vol. 1, pp. 155-170.
22. H. W. Chung, S. J. Kang and S. Y. Kim, *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen*, 2002, vol. 516, pp. 49-56.
23. L. Zhang, B. Bandy and A. Davison, *Free Radical Biol. Med.*, 1996, vol. 20, pp. 495-505.
24. L. Zhang, Y. Wang, N. Shang and M. Smith, *Leukemia Res.*, 1998, vol. 22, pp. 103-113.
25. E. Papadimou, S. Georgiou, D. Tsambaos and D. Drainas, *Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, pp. 24375-24378.

26. N. E. Mikkelsen, M. Brännvall, A. Virtanen and L. A. Kirsebom, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1999, vol. 96, pp. 6155-6160.
27. A. Tekos, A. Tsagla, C. Stathopoulos and D. Drainas, *FEBS Lett.*, 2000, vol. 485, pp. 71-75.
28. A. Berchanski and A. Lapidot, *Bioconjugate Chem.*, 2008, vol. 19 pp. 1896–1906.
29. Y. Hori, E. V. Bichenkova, A. N. Wilton, M. N. El-Attug, S. Sadat-Ebrahimi, T. Tanaka, Y. Kikuchi, M. Araki, Y. Sugiura and K. T. Douglas, *Biochemistry*, 2001, vol. 4, pp. 603-608.
30. C. Stathopoulos, A. Tsagla, A. Tekos and D. Drainas, *Mol. Biol. Rep.*, 2000, vol. 27, pp. 107–111.
31. A. Vioque, *FEBS Lett.*, 1989, vol. 246, pp. 137–139.
32. D. K. Willkomm, K. Pfeffer, G. Klebe and R. K. Hartmann, in *Ribonuclease P*, ed. F. Liu and S. Altman, Protein Reviews Series, Springer, USA, 2010, vol. 10.
33. K. Bodoor, V. Boyapati, V. Gopu, M. Boisdore, K. Allam, J. Miller, D. Treleaven, T. Weldeghiorghis and F. Aboul-ela, *J. Med. Chem.*, 2009, vol. 52, pp. 3753–3761.
34. A. Krivenko, A. V. Kazantsev, C. Adamidi, D. J. Harrington and N. R. Pace, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.*, 2002, vol. 58, pp. 1234-1236.
35. M. Whittaker, R. J. Law, O. Ichihara, T. Hesterkamp and D. Hallett, *Drug Discovery Today Technol.*, 2010, vol. 7, pp. e163-e171.

Figures

Figure 1. A. Schematic representation of the fluorescent minihelix substrate with the predicted fold calculated by the RNAFold Web Server ¹⁷. The designed probe included either Black Hole Quencher 1 (BHQ1) or Black Hole Quencher 2 (BHQ2) in the 5'-end, and Alexa Fluor 488 molecule in the 3'-end. Red brackets indicate the leader sequences, the box frames the 3 bp-stem, and the arrow shows the canonical cleavage site for RNase P. **B.** Distance between 3'-end and the 5'-leader end in a folded pre-tRNA in complex with RNase P (PDB code 3Q1R) is calculated to be ~ 42 Å, well within the 100 Å limit for FRET. It is inferred that the distance between FRET pair molecules in the substrate probe, when it is not cleaved, allows for fluorescent resonance transfer energy (FRET), extinguishing Alexa Fluor 488 fluorescence. Diagram symbols are the same than those used in panel A.

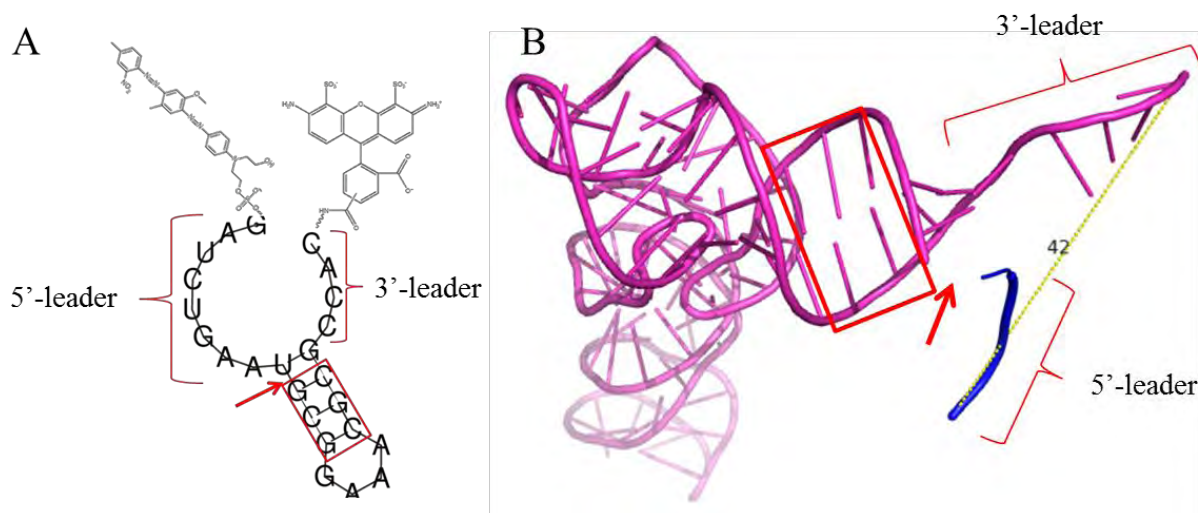


Figure 2. RNase P urea-PAGE kinetic assay with a minihelix fluorescent substrate. Ribozyme catalysis of the fluorescent substrate led to the time-dependent disappearance of the 24-nt substrate with a simultaneous accumulation of the 15-nt product. The predicted folding and FRET pair molecule in each are indicated at the left of the figure (BHQ1 [blue] at the 5' end of the RNA probe and Alexa-488 [green] at the 3' end).

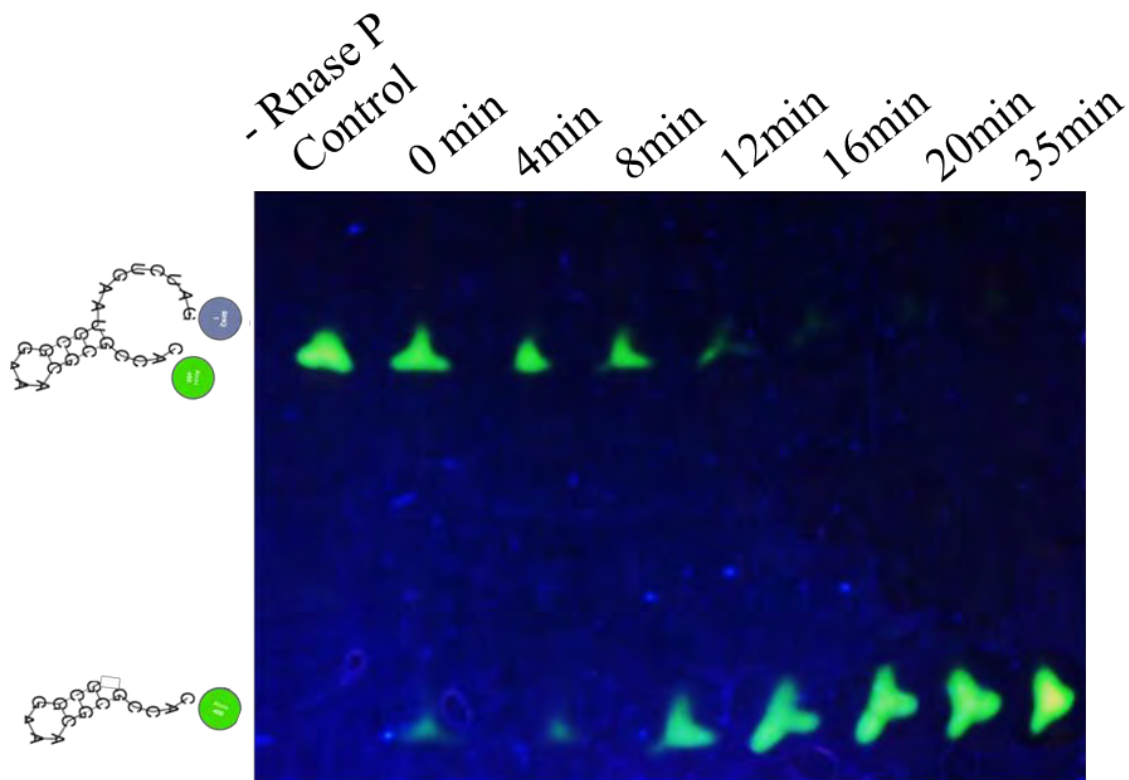


Figure 3. **A.** Representative plots of a preliminary characterization of RNase P activity with minihelix substrate at different concentrations, indicated nM. Each square plots time on the X-axis (20 minutes) and Relative Fluorescence Units on the Y-axis. **B.** The Michaelis-Menten model fit for RNase P activity indicates that the ribozyme behaves enzymatically with the minihelix fluorescent substrate. **C.** Lineweaver-Burk linear transformation of the Michaelis-Menten plot. The dashed squared part of the graph is shown expanded in D.

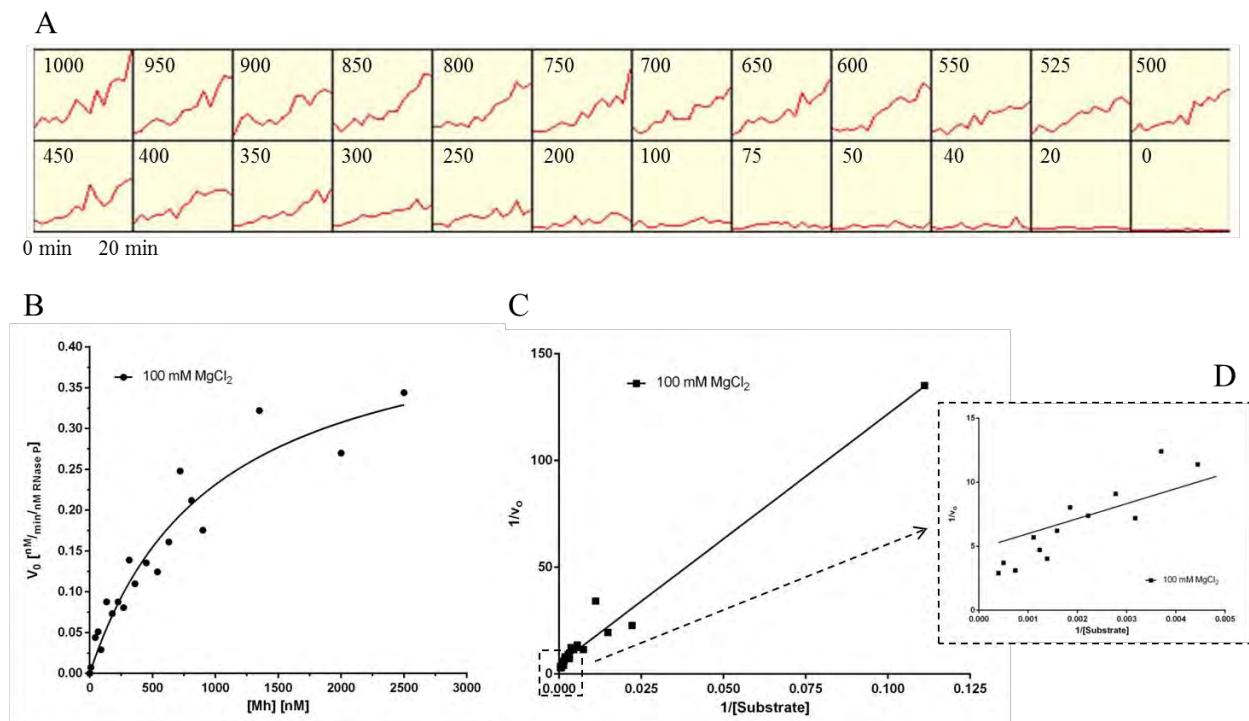


Figure 4. Comparison of RNase P activity using fluorescent and non-fluorescent minihelix substrates in a 20% PAGE end-point activity assay at 55°C. **A.** RNase P end-point activity assay with 5 ng of RNA fluorescent substrate visualized directly with UV light. **B.** RNase P end-point activity assay with 5 ng of RNA non-fluorescent substrate stained with EtBr, then exposed to UV light. In both cases, similar rates of catalysis are observed with disappearance of substrate (upper band) and accumulation of product (lower band).

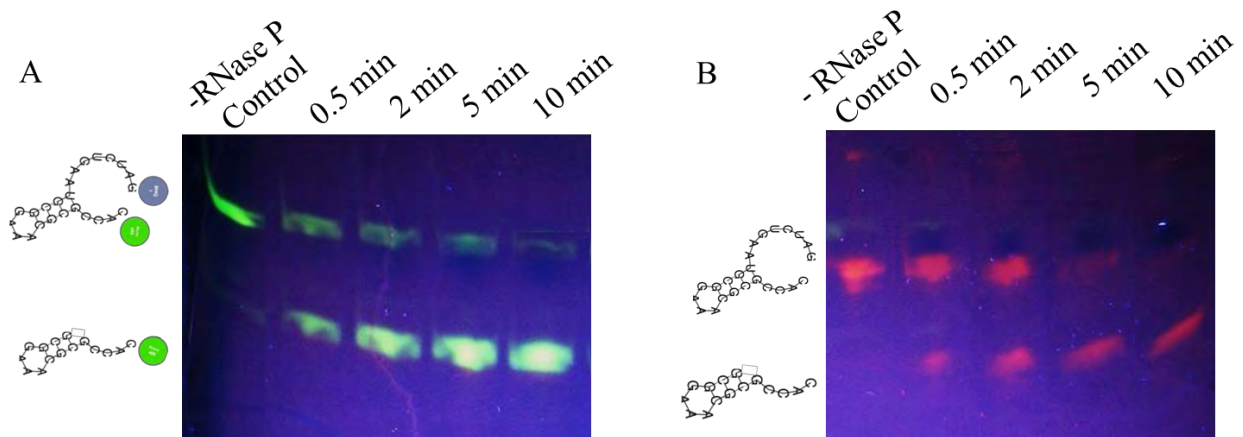
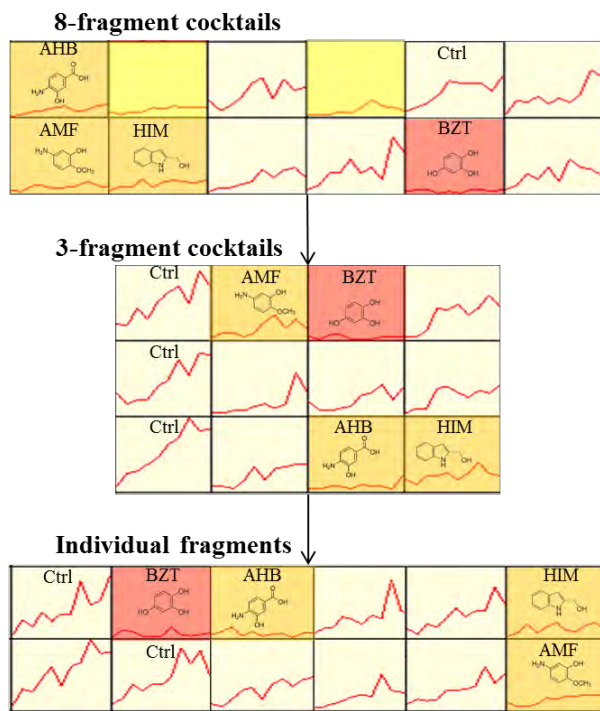


Figure 5. Selected data from the HTS activity assays with inhibitor fragments in 96-well microplates. Fragment selection was performed with 50 μM of each fragment, 20 nM RNase P, and 210 nM of fluorescent substrate. Wells labeled *Ctrl* are activity controls with solvent PEG-400 at working concentration (roughly 5%). The monitoring time for each microplate is the same for every well (>10 minutes each square). Plots marked with red backgrounds were considered to have demonstrated inhibition as compared to internal control standards. Plots indicated with orange backgrounds were considered to be inhibitory by the HTS, but were not able to be verified by urea-PAGE. Plots marked with yellow backgrounds showed inhibition that was attributed to a mixture of compounds. **A.** Compound mixture deconvolution²¹ was used to identify individual inhibitor fragments. From an 8-fragment cocktail mixture in the initial screening, six inhibited assays were selected. Subsequently, 3-fragment cocktails were prepared by mixing fragments in previously unused combinations, obtaining four potential inhibiting mixtures. Finally, individual fragments were tested out of the 3-fragment cocktails, resulting 4 molecules as potential inhibitors. In the figure, the presence of each of these 4 inhibitors in the 8- and 3-fragment cocktails is indicated by the abbreviated name of each compound and its chemical structure in the appropriate plot. **B.** Individual concentration assays for the four potential inhibitors. Compounds BZT, AMF and AHB were considered potential inhibitors in the concentration range tested in this experiment.

Chemical data of compounds: BZT (1,2,4-benzenetriol; CAS 533-73-3), AMF (5-amino-2-metoxiphenol, CAS 1687-53-2), AHB (4-amino-3-hydroxybenzoic acid; CAS 2374-03-0) and HIM (1*H*-indol-2-methanol; CAS 24621-70-3).

A



B

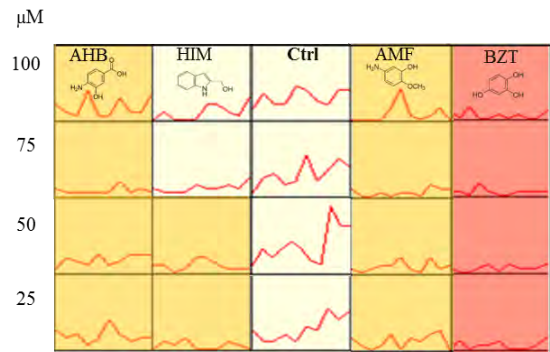
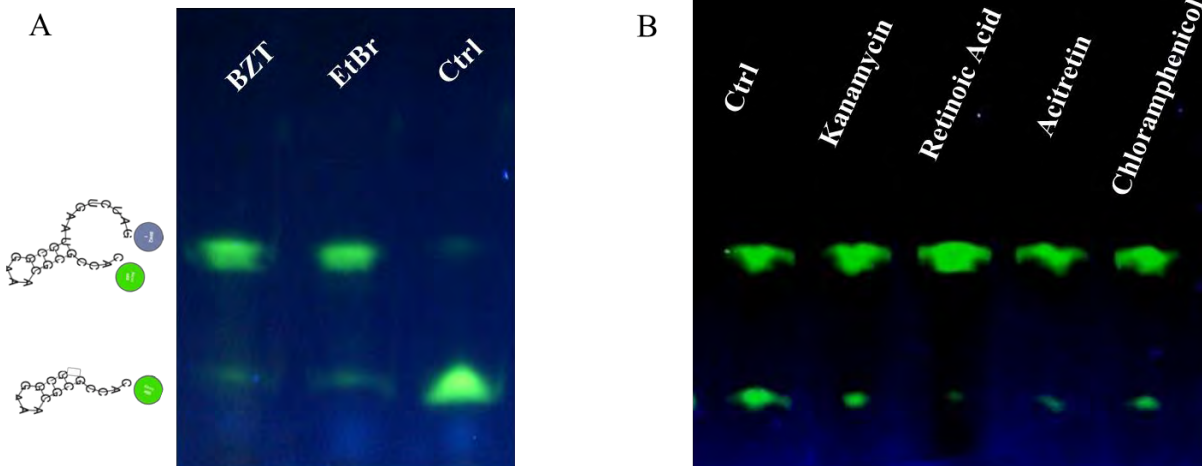


Figure 6. End-point urea-PAGE RNase P activity assays with various inhibitors using the fluorescent minihelix substrate. **A.** RNase P RNA subunit end-point activity assay with 450 ng of fluorescent substrate confirms inhibition by EtBr and fragment BZT (1,2,4-benzenetriol). Concentration of compounds was 30,000-fold greater than the P RNA concentration. As expected, the control activity assay showed almost complete conversion of substrate to product. **B.** RNase P end-point activity assay with known RNase P inhibitors²⁵⁻²⁷ shows that retinoic acid and acitretin, at 6.25mM, have an inhibitory effect on *T. maritima* RNase P²⁵. Kanamycin²⁷ and chloramphenicol demonstrated milder effect at 20 nM. The substrate concentration in this set of experiments was increased two-fold to allow for better quantification of the amount of substrate turnover.



Tables

Table 1. Physicochemical characteristics of the RNA substrate probe designed for the HT RNase P activity assay.

	Characteristic	Details / Reference
Fluorophore	Alexa Fluor 488	Excitation $\lambda_{\max} = 494$ nm Absorbance $\lambda_{\max} = 495$ nm Emission $\lambda_{\max} = 517$ nm ¹⁵
Quenchers used and their interactions with Alexa Fluor 488	Black Hole Quencher 1 (BHQ1)	$A_{\max} = 534$ nm $Q_{\text{FRET}} = 91\%$ $Q_{\text{contact}} = 95\%$ ¹⁵
	Black Hole Quencher 2 (BHQ2)	$A_{\max} = 580$ nm $Q_{\text{FRET}} = 91\%$ $Q_{\text{contact}} = 93\%$ ¹⁵
Fluorophore position	BHQ at 5' end; Alexa Fluor 488 at 3' end	Guanine at the 5' end may have a quenching effect over fluorophore ¹⁵
Spectrophotometrical characteristics of the probe (Theoretical prediction)	Extinction coefficient = $\sim 288,244 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ $\text{nmol}/\text{OD}_{260} = 3.47$ $\mu\text{g}/\text{OD}_{260} = 30.82$	¹⁶
RNA probe sequence	5'-GAU CUG AAU GCG GAA ACG CGC CAC-3'	¹³
Size	24 nucleotides	Molecular weight = 8,947.7g/mol
Secondary structure	High probability of forming 3-4 bp stem (Figure 1.A)	Theoretical prediction with RNA fold Web Server ¹⁷

Table 2. RNase P kinetic parameters with the minihelix fluorescent substrate in HT, with 100 mM MgCl₂. Calculations were performed with using the Michaelis-Menten fit in Figure 3.B.

Kinetic parameters	
V_{max} V_{max} $\left[\frac{nM \text{ substrate}}{min} \right]$	22.92
K_m [μM]	0.98
k_{cat} [min^{-1}]	0.4584
Catalytic cycle time [min]	2.18
k_{cat}/K_m [$M^{-1} min^{-1}$]	0.47×10^6
Michaelis-Menten non-linear fit $R^2=0.90$ 20 different concentrations	

ii. Cartel presentado en la Cuarta Muestra de Carteles del IFC

Lugar: Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Fecha: 25 de Enero de 2013

Diseño basado en fragmentos de inhibidores de la RNasa P bacteriana con un ensayo de alto rendimiento

Díaz-Tufinio C¹, Varela-Gómez M², Torres-Larios A¹

¹Depto. Bioquímica y Biología Estructural, Instituto de Fisiología Celular

²Unidad de Proteómica Médica, Instituto Nacional de Medicina Genómica

Contacto: ctufinio@email.ifc.unam.mx



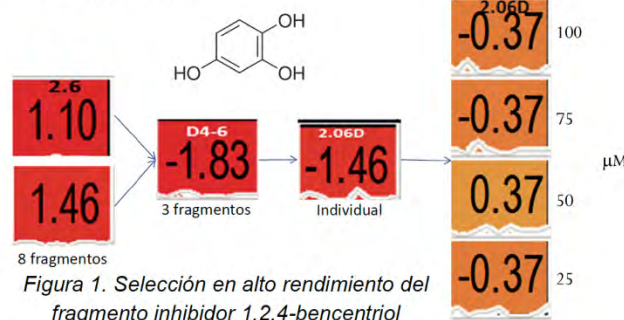
Introducción

La ribonucleasa P es un complejo ribonucleoproteico responsable de la maduración del extremo 5' del tRNA. En bacterias, se compone de una subunidad catalítica de RNA de entre ~300 y 450 nucleótidos y una subunidad proteica de alrededor de 110 aminoácidos. Esta ribozima es indispensable para la síntesis de proteínas, por lo que su funcionamiento es vital.

La hipótesis del proyecto es que se puede afectar la función de la RNasa P bacteriana mediante la inhibición de la formación de la holoenzima o por una interferencia en su mecanismo catalítico con el uso de moléculas de bajo peso molecular, cuya posterior optimización puede generar fármacos potenciales.

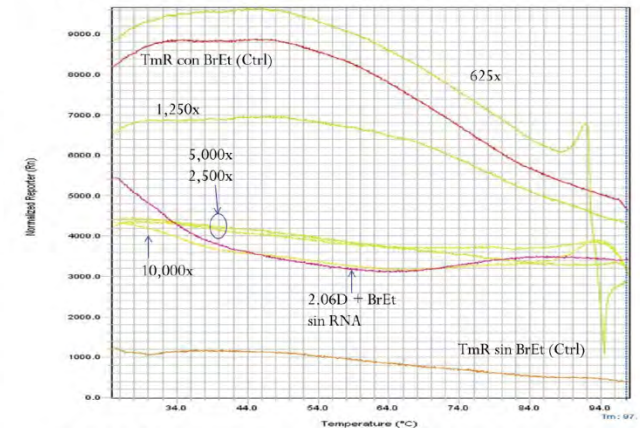
Resultados y discusión

El ensayo de alto rendimiento (HT) diseñado para monitorear la actividad de RNasa P basado en un sustrato fluorescente arrojó resultados favorables, tanto en la estandarización como en la selección de fragmentos.

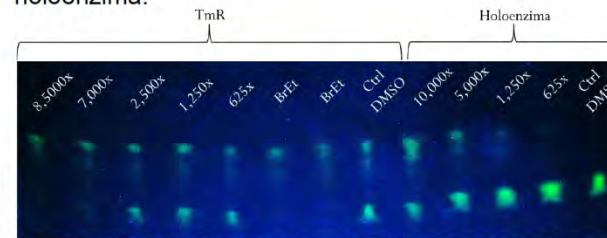
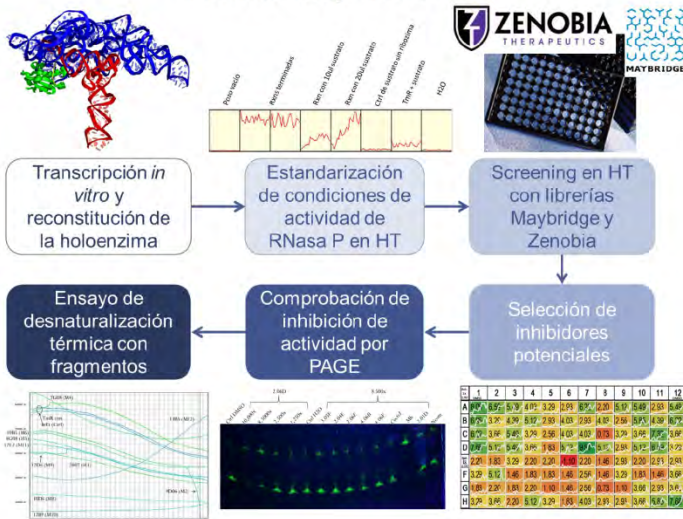


De 1,350 compuestos, se seleccionaron 12 de la biblioteca Maybridge y 6 de Zenobia con el ensayo en alto rendimiento. Se muestra el tren de selección del fragmento 1,2,4-bencentril (2.06D, Zenobia) en la figura 1. Dicho fragmento mostró el mejor efecto inhibidor en geles (Fig. 2) en concentraciones alrededor de 7,000x, tanto sobre la subunidad catalítica de RNA como sobre la holoenzima.

En un ensayo de desnaturalización térmica se encontró que de los 12, al menos 5 fragmentos, entre ellos el 1,2,4-bencentril, parecen tener un efecto de desplazamiento del bromuro de etidio a concentraciones mayores a 2,500x, ya que la fluorescencia de los ácidos nucleicos decrece (Fig. 3). Por una revisión bibliográfica de este fragmento, se encontró que induce daño oxidativo sobre DNA (Zhang, 1995, 1998; Chung, 2002).



Materiales y métodos



Conclusiones y perspectivas

El ensayo de alto rendimiento para actividad de RNasa P es útil para la identificación de compuestos inhibidores. Se encontraron fragmentos con actividad negativa sobre la ribozima que se unen al RNA. Se caracterizará detalladamente la afinidad y la capacidad inhibidora de las moléculas seleccionadas para su posible refinamiento posterior.