

David Ortega Alarcón

Caracterización biofísica de
MeCP2 como lector de marcas
epigenéticas en DNA e histonas.
Estudio de su potencial como
diana farmacológica

Director/es

Velazquez Campoy, Adrian
Abian Franco, Olga María

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE MECP2 COMO
LECTOR DE MARCAS EPIGENÉTICAS EN DNA E
HISTONAS. ESTUDIO DE SU POTENCIAL COMO
DIANA FARMACOLÓGICA

Autor

David Ortega Alarcón

Director/es

Velazquez Campoy, Adrian
Abian Franco, Olga María

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2023

Caracterización biofísica de MeCP2 como lector de marcas epigenéticas en DNA e histonas.

**Estudio de su potencial como diana
farmacológica.**

Memoria presentada por **David Ortega Alarcón**, graduado en
Bioquímica, para optar al grado de Doctor en Ciencias.

Zaragoza 2023



Da. Olga Abián Franco, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid y Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, y

D. Adrián Velázquez Campoy, Doctor en Física por la Universidad de Granada y Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral “**Caracterización biofísica de MeCP2 como lector de marcas epigenéticas en DNA e histonas. Estudio de su potencial como diana farmacológica.**” ha sido realizada, bajo su dirección por el graduado DAVID ORTEGA ALARCÓN, en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad de Zaragoza.

ZARAGOZA, AGOSTO DE 2023.

Durante los cuatro años de realización de esta tesis (desde julio de 2018 hasta noviembre de 2022, ambos incluidos), el doctorando ha sido beneficiario de una subvención del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España destinada a la contratación de personal investigador predoctoral para la formación de doctores (BES-2017-080739) (BOE del 16/09/2017) .

AGRADECIMIENTOS

Un silenciamiento triple.

El primer nivel de regulación es el más sencillo y claro, y se basa en la capacidad de MeCP2 de unirse al DNA en secuencias CpG y no CpG con diferentes estados de metilación y oxidación, lo cual va a modular de forma directa la accesibilidad de las zonas promotoras a la maquinaria de transcripción. El segundo nivel de regulación es el reclutamiento por parte de MeCP2 de proteínas que actúan como activadores o represores de la transcripción. Su presencia en cada contexto molecular añadirá un nuevo efecto de regulación transcripcional. El tercer nivel de regulación es más amplio y condiciona a los otros dos, ya que se basa en la capacidad de MeCP2 de intervenir en la arquitectura de la cromatina, y remodelará las zonas del genoma que sean transcripcionalmente activas en cada tipo celular y momento del ciclo.

Contenidos

1.Introducción.	18
1.1 Epigenética. Visión general.	18
1.2 Modificación epigenética del DNA.	20
1.3 Modificación postraduccional de histonas.	27
1.4 Methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2).....	30
1.5 Síndrome de Rett.....	43
1.5.1 Historia y etiología: una enfermedad rara	43
1.6 Adenocarcinoma pancreático ductal.	52
2.Hipótesis y objetivos	63
3.Materiales y métodos	70
3.1 Plásmidos	70
3.2 Expresión y purificación de proteínas.....	71
3.3 Metilación química de histonas.....	76
3.4 Péptidos derivados de H3.....	77
3.5 Hibridación del DNA de doble hebra.....	78
3.6 Predicción de estructura	79
3.7 Dicroísmo circular.....	79
3.8 Espectroscopía de fluorescencia	80
3.7 Desnaturalización térmica o química seguida por fluorescencia	81
3.10 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	83
3.11 Estudio por fluorescencia de la desnaturalización química	84
3.12 Dispersión dinámica de luz (DLS).....	86

3.13 Calorimetría de titulación isoterma (ITC).....	86
3.14 Cribado de alto rendimiento y estudio de estabilización de mutantes	89
3.15 Quimiotecas	91
3.16 Cultivo celular en suspensión.....	91
3.17 Cultivo celular Lunet, HACAT, MiaPaCa-2, PANC-1.....	92
3.18 Cultivo ReNCells	93
3.19 Ensayos de citotoxicidad.....	94
3.17 Extracción de RNA y síntesis de DNAc.	95
3.18 Estudio de unión a promotores: Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).....	96
4.RESULTADOS.....	100
4.1 Caracterización estructural de las variantes de MeCP2.	100
4.2 Caracterización biofísica de la unión de MeCP2 al DNA y su implicación estructural.....	109
4.4 Caracterización biofísica de la unión de MeCP2 con histonas y efecto de la metilación en H3	131
140	
4.5 Efecto de las mutaciones causantes de RTT.	143
4.6 Cribado de alto rendimiento usando MeCP2 como diana.....	160
4.7 Selección de modelo celular para RTT.	165
4.8 Estudio funcional de compuestos estabilizadores (RAOs y DOAs)	170
4.8.1 Citotoxicidad de los compuestos estabilizadores	170
4.9 Selección de líneas celulares para el estudio funcional de inhibidores de MeCP2 ...	179
4.10 Comprobación de unión de los compuestos a la diana MeCP2 mediante ITC.	182
4.11 Ensayo funcional. Citotoxicidad diferencial en modelos celulares.....	182
5.Discusión.....	188
5.1 Estructura y estabilidad de MeCP2	188

5.2 Interacción con el dsDNA.....	192
5.3 Interacción de MeCP2 con histonas.....	200
5.4 Fisiopatología de las mutaciones causantes de RTT.....	205
5.5 Desarrollo de fármacos para RTT.....	208
5.6 Identificación de fármacos para PDAC.....	212
6.CONCLUSIONES.....	216
6.1 Contribución de los diferentes dominios en la estructura y estabilidad de la proteína.....	216
6.2 Interacción con dsDNA sin metilar, metilado e hidroximetilado. Contribución de los diferentes dominios.....	217
6.3 Interacción con las cuatro histonas canónicas H2A, H2B, H3 Y H4. Efecto de la trimetilación en lisina en diferentes posiciones de H3.....	218
6.4 Efectos de las mutaciones causantes de RTT R106W y R133C sobre la estructura y estabilidad de MeCP2, así como en la unión a dsDNA e histonas.....	219
6.5 Identificación de fármacos utilizando el complejo MeCP2-dsDNA como diana terapéutica.....	221
7.BIBLIOGRAFÍA.....	224
8.ANEXOS.....	247
8.1 Listado de tablas y figuras.....	247
8.2 Listado de abreviaturas.....	251

1. Introducción.

1.1 Epigenética. Visión general.

El término "epigenética" fue propuesto por C.H. Waddington en 1939, y se define como el estudio de los cambios en la función de los genes, que son mitótica y/o meióticamente heredables y no suponen un cambio en la secuencia del DNA. Aquello que Waddington describió como "paisaje epigenético" es el conjunto de mecanismos que separan el genotipo del fenotipo, originando la diversidad funcional en tipos celulares que comparten un genotipo, a lo largo del desarrollo de un organismo (A. D. Goldberg et al., 2007; Waddington, 2012; C. -t. Wu & Morris, 2001).

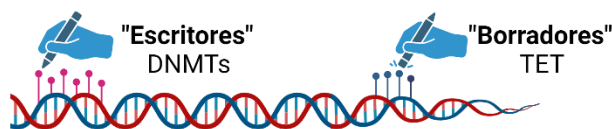
Los mecanismos principales de la epigenética (**Figura 1.1**) son la modificación del DNA, la modificación de las histonas, los *non-coding* o microRNA y, en general, los cambios en la arquitectura de la cromatina (remodelamiento, cambio de posición de nucleosoma...). Estos mecanismos son responsables de la iniciación y el mantenimiento del silenciamiento epigenético y la regulación del perfil de expresión génica, y son fundamentales para una serie de procesos celulares, que incluyen la diferenciación celular, la expresión génica, la inactivación del cromosoma X, la embriogénesis y la impronta genómica (Holliday & Pugh, 1975; Riggs, 1975).

Aunque estas modificaciones epigenéticas se establecen durante la etapa de desarrollo, el cambio del paisaje epigenético puede tener un impacto significativo en la función celular, lo que puede llevar a la desregulación de la expresión génica y, potencialmente, al desarrollo de "enfermedades epigenéticas".

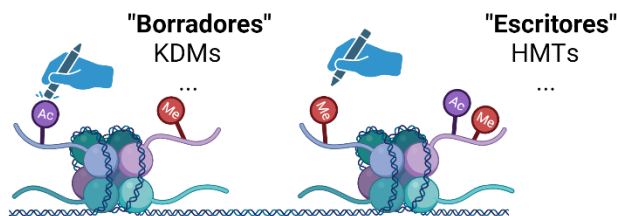
Mientras que la secuencia del DNA es relativamente estable a lo largo de la vida de un individuo, el epigenoma es dinámico, está fuertemente influenciado por procesos del ambiente y del desarrollo (Shi et al., 2017) y su reversibilidad ha abierto una nueva vía terapéutica (Zachariah et al., 2012).

Hay tres elementos principales en todos los procesos epigenéticos. En primer lugar, están los elementos “escritores”, que generan estas modificaciones en el DNA, las histonas... En segundo lugar, están los “borradores”, encargados de eliminar estas marcas y, finalmente, los “lectores”: aquellas proteínas encargadas de interpretar estas modificaciones y generar una respuesta funcional (Torres & Fujimori, 2015, Feinberg et al., 2016).

Modificación de bases nitrogenadas



Modificación postraduccional de histonas



Cambios en la arquitectura y accesibilidad de la cromatina



Figura 1.1. Regulación epigenética de la expresión génica. Mecanismos de metilación del DNA, modificación de histonas y cambio de la arquitectura global de la cromatina mediante los “escritores”, “borradores” y “lectores” de marcas epigenéticas.

1.2 Modificación epigenética del DNA.

1.2.1 Metilación de la citosina: relevancia biológica.

La modificación de las bases nitrogenadas del DNA es uno de los principales mecanismos de regulación de la expresión tanto en animales como en plantas. La modificación más habitual y más estudiada es la metilación de citosina (5-mC), es decir, la adición de un grupo metilo en el carbono 5' del anillo de pirimidina de esta base nitrogenada. La metilación del DNA es esencial para silenciar elementos retrovirales, regular la expresión de genes que dependen del tejido donde se expresan, la impronta genómica, o la inactivación del cromosoma X (Moore et al., 2013). Debido a su importancia y su abundancia, se considera la quinta base nitrogenada. Más del 4% de las citosinas en el genoma humano están metiladas (Breiling & Lyko, 2015) y dependiendo de su posición, contexto y localización dentro de un gen, puede ganar importancia. La mayoría de la metilación del DNA ocurre en citosinas que preceden a guaninas (CpG). Estos dinucleótidos tienden a aparecer agrupados en zonas repetitivas del genoma llamadas “Islas CpG”, que son zonas muy conservadas y están fuertemente metiladas (Bird et al., 1985) y que contienen los promotores de genes constitutivos necesarios para la viabilidad celular (Illingworth et al., 2010; Saxonov et al., 2006).

La metilación de la citosina afecta a la accesibilidad de proteínas o complejos regulatorios al DNA, y afecta a la arquitectura de la cromatina. Se asocia con represión transcripcional cuando se encuentra en zonas promotoras o *enhancers* (Charlet et al., 2016), aunque la metilación en el cuerpo del gen tiene efecto activador o represor dependiendo del contexto molecular. (Buck-Koehntop & Defossez, 2013; Spruijt & Vermeulen, 2014).

1.2.2 Metilación de la citosina: un proceso dinámico.

El nivel de metilación de citosina a lo largo del desarrollo en sitios concretos varía de una forma bastante controlada, de forma que todos los elementos

implicados en la aparición y eliminación de esta marca están perfectamente orquestados.

Agentes “escritores” de la metilación del DNA.

Las metiltransferasas de DNA (DNMTs) son la familia de enzimas encargadas de transferir los grupos metilo usando S-adenil-metionina (SAM) como cosustrato. Esta familia está compuesta por tres miembros: DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. Las tres tienen un dominio regulador N-terminal y un dominio catalítico C-terminal, pero cada una de ellas tiene funciones y patrones de expresión diferentes (Xie et al., 1999; Yen et al., 1992).

DNMT3A y DNMT3B son las llamadas DNMT *de novo*, ya que son capaces de introducir el grupo metilo en DNA desnudo (sin metilación previa). Son muy similares a nivel funcional y estructural. Sus diferencias se encuentran en sus patrones de expresión: DNMT3A se expresa en prácticamente todos los tejidos por igual; DNMT3B apenas se expresa en tejidos diferenciados, excepto en testículos, tiroides y médula ósea (Xie et al., 1999).

DNMT1 es la “DNMT de mantenimiento”. Es el miembro de la familia más estudiado, y se une preferencialmente a DNA hemimetilado (Pradhan et al., 1999; Ramsahoye et al., 2000). Su función es conservar los patrones de metilación durante la replicación del DNA. (Hermann et al., 2004). También tiene la capacidad de reparar la metilación del DNA (Mortusewicz et al., 2005).

Agentes “borradores” de la metilación del DNA.

En contraposición a la acción de las DNMTs, la desmetilación de citosina puede ocurrir de manera pasiva o activa. La desmetilación pasiva ocurre en células en división, cuando la actividad de DNMT1 no es suficiente para mantener los niveles de metilación durante el proceso de replicación del DNA y se reduce la cantidad total de citosinas metiladas, de forma que esta metilación desaparece con las sucesivas replications, por efecto de dilución.

La desmetilación activa es un proceso enzimático que puede darse en cualquier parte del ciclo celular, que comienza con la 5-mC como sustrato y acaba en una citosina sin modificar, pasando por varios puntos intermedios (Mayer et al., 2000; Oswald et al., 2000; Paroush et al., 1990; F. Zhang et al., 2007). En células de mamíferos no se conoce ninguna enzima capaz de procesar el enlace covalente del grupo metilo al anillo pirimidínico de la citosina, de forma que las vías de desmetilación (que aún no están del todo descritas, Bhutani et al., 2011) incluyen una desaminación o una oxidación, seguida de una reparación del DNA por el sistema de reparación por escisión de bases (BER) que elimina la base modificada y la reemplaza por una citosina.

La 5-mC se puede modificar en dos sitios diferentes: el grupo metilo, y el grupo amina. La desaminación es realizada por el complejo AID/APOBEC (*activation-induced cytidine deaminase/apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex*), que genera un grupo carbonilo. Esto convierte la 5-mC en una timina, produciendo un mal emparejamiento de bases (G/T), induciendo una reparación por el sistema BER mediada por la Timina DNA glicosilasa (TDG) (Rai et al., 2008).

Otra vía es la mediada por las enzimas de la familia TET (*ten-eleven translocation*), que incluye la TET1, TET2 y TET3. Esta familia de enzimas añade un grupo hidroxilo al grupo metilo de la 5-mC, formando 5-hidroxi metilcitosina (5-hmC) usando α -cetoglutarato como co-sustrato (Ito et al., 2010; Tahiliani et al., 2009). Una vez se forma la 5-hmC, hay dos mecanismos posibles para recuperar la citosina inicial (**Figura 1.2**):

Por una parte, está la oxidación repetida de la base nitrogenada, formando progresivamente 5-formilcitosina (5-fC) y finalmente 5-carboxilcitosina (5-caC) (Ito et al., 2011). Estas dos últimas formas oxidadas (5-fC y 5-caC) son reconocidas por la TDG, comenzando un proceso de reparación por escisión de bases, sustituyendo la base modificada por una citosina sin modificar (X. Wu & Zhang, 2017). La otra opción partiendo de la 5-hmC es la desaminación, por el

mismo mecanismo AID/APOBEC explicado anteriormente, formando 5-hidroximetiluracilo (5-hmU) como producto (Guo et al., 2011).

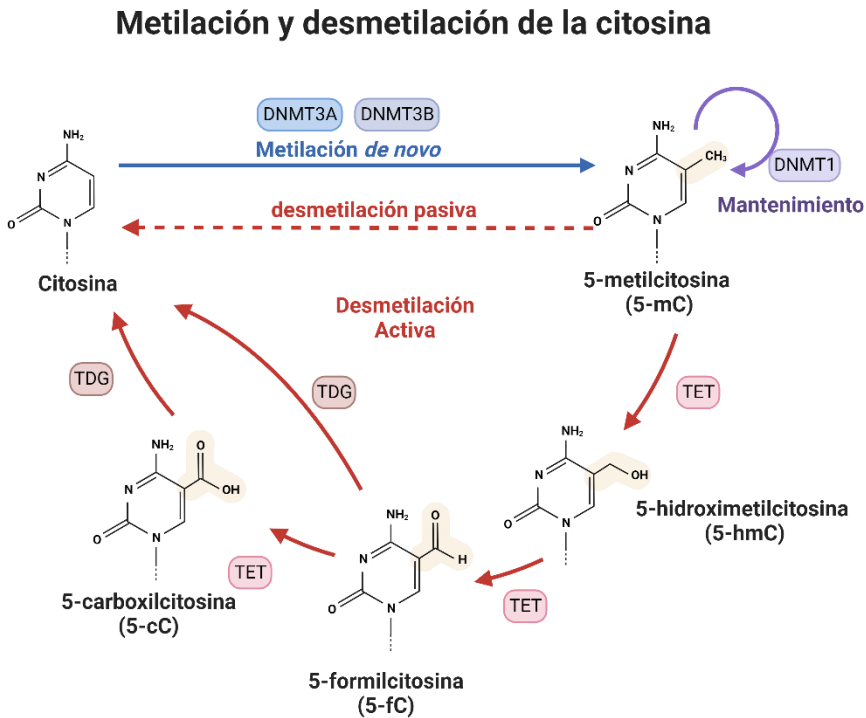


Figura 1.2. Vías de metilación y desmetilación del DNA. Vía de metilación, desmetilación activa y pasiva y agentes escritores y borradores de la metilación de citosina (X. Wu & Zhang, 2017).

1.2.3 Intermediarios oxidados de la citosina: 5-hmC como nueva marca epigenética.

Estas bases que se producen por la vía oxidativa mediada por TET no son únicamente intermediarios en la desmetilación del DNA, sino que también tienen entidad de marca epigenética de manera individual. Las últimas mencionadas (5-fC, 5-caC, and 5-hmU) influyen en la regulación de transcripción, el remodelamiento de la cromatina, y el reclutamiento de los complejos de reparación del DNA en animales (Fong et al., 2013; Yue et al.,

2016) aunque su relevancia biológica es aún incierta. (Raiber et al., 2012; C.-X. Song et al., 2013).

Por su parte, la 5-hmC se está estableciendo en la comunidad científica como una señal estable que modula la unión de moléculas que van a influir en la expresión génica. Los niveles de hidroximetilación varían mucho entre tejidos (Ito et al., 2010; W. Li & Liu, 2011) y en diferentes etapas del desarrollo, encontrándose en sus niveles más altos en el cerebro y otros tejidos del sistema nervioso central (Globisch et al., 2010; Kinney et al., 2011; Kriaucionis & Heintz, 2009; Michaeli et al., 2013).

Esta marca está especialmente enriquecida en cuerpos de genes, en promotores y en sitios de unión de factores de transcripción ((Hahn et al., 2013; Mellén et al., 2012; Szulwach, Li, Li, Song, Han, et al., 2011), y tiene un papel importante en la regulación de la pluripotencia de las células madre, el desarrollo y envejecimiento celular, así como la carcinogénesis (Liutkevičiūtė et al., 2009)). Tiene un efecto crítico en el neurodesarrollo (Szulwach, Li, Li, Song, Wu, et al., 2011) y la hematopoiesis (Albano et al., 2011; Chou et al., 2011; Weissmann et al., 2012) y la alteración de los niveles de 5-hmC se asocia con problemas a nivel neurológico, así como de maduración y proliferación de células sanguíneas.

El nivel de 5-hmC aumenta durante la diferenciación neuronal, y se encuentran niveles constantes de esta marca en el cuerpo de genes activos específicos de este tipo celular (Hahn et al., 2013). Además, parece tener importancia en el *splicing* alternativo (Khare et al., 2012)

1.2.4 Lectores de marcas epigenéticas.

Para ejercer sus efectos, la gran cantidad de modificaciones epigenéticas posibles requieren ser reconocidas por otras proteínas, que se conocen como "lectores" del epigenoma. Existen diversos dominios proteicos que actúan como lectores epigenéticos debido a su capacidad de identificar y unirse a las

modificaciones covalentes presentes en el DNA y las histonas. En este caso, nos centraremos en los dominios proteicos que pueden reconocer el DNA metilado o hidroximetilado, o histonas modificadas mediante procesos de metilación.

Familia MBD.

Dentro de los lectores epigenéticos, cabe destacar las proteínas que contienen un dominio de unión a metililo (MBP, *methyl-binding proteins*). Estas proteínas se unen al DNA metilado y reclutan complejos remodeladores de la cromatina, lo que puede resultar en la represión o activación de genes. Se han identificado varias familias de proteínas MBP, incluyendo la familia de dominio de unión a metil-CpG (MBD), las proteínas del dominio SRA y las proteínas de dedos de zinc (Moore et al., 2013).

Las proteínas de la familia MBD contienen un dominio de unión al DNA y otros dominios de interacción proteína-proteína. Estas proteínas actúan como nodos de conexión entre diferentes marcas epigenéticas y las moléculas efectoras, reclutando factores de transcripción para alterar el estado transcripcional del DNA. Se han identificado once proteínas que contienen un dominio MBD, incluyendo MeCP2, MBDs 1-6, SETDB1/2 y BAZ2A/B (**Figura 1.3**).

El dominio MBD tiene entre 70-80 aminoácidos, y es capaz de unirse a dinucleótidos CpG metilados de forma simétrica (Nan et al., 1993; Ohki et al., 2001) y cada miembro de esta familia de proteínas contiene otros dominios de los cuales dependerá su función específica. Un dominio recurrente en este tipo de proteínas es el TRD (dominio de represión transcripcional) que media la interacción con diferentes *partners* biológicos (Boeke et al., 2000; Wade et al., 1999). MBD5 y MBD6 no se unen a residuos de 5-mC (Laget et al., 2010). Se sabe que MBD5 se une a histonas metiladas y ambas se asocian a procesos de desubiquitinación de histonas (Baymaz et al., 2014).

La proteína de unión a metil-CpG 2 (MeCP2) fue la primera en descubrirse y contiene un núcleo MBD de 70 aminoácidos junto con un dominio de represión

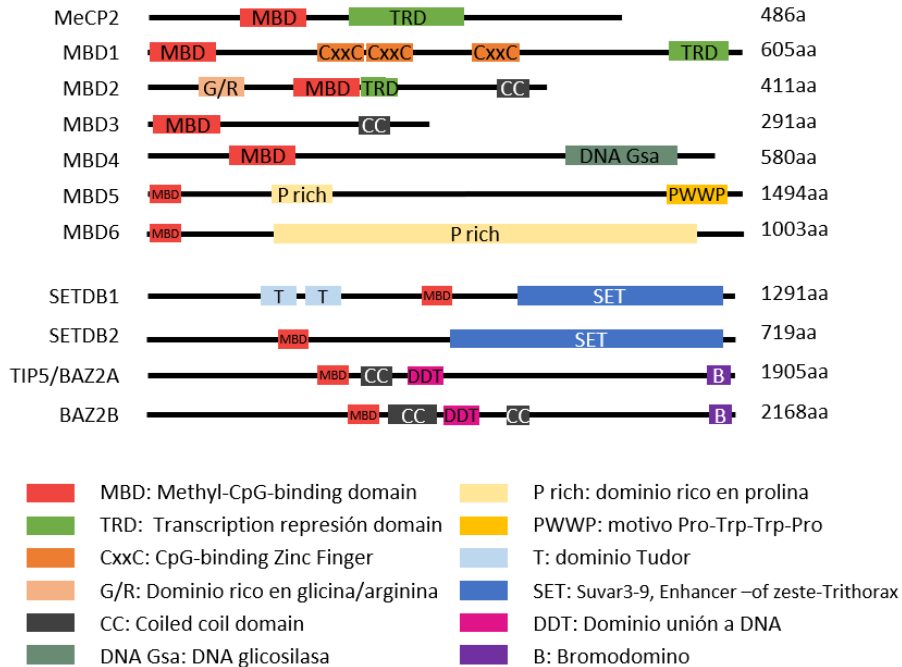


Figura 1.3. Familia MBD y otras proteínas que contienen dominio MBD. El resto de dominios funcionales principales están destacados (Du et al., 2015).

transcripcional (TRD). Aunque MeCP2 funciona como un represor transcripcional, informes recientes han revelado propiedades adicionales de MeCP2, incluyendo una compactación avanzada de la cromatina) no metilada, interacción con regiones metiladas y no metiladas del DNA y, lo más importante, función tanto como represor como activador de ciertos genes (Hansen et al., 2010).

Además de las proteínas MBD, otras proteínas como SETDB1, SETB2, BAZ2A y BAZ2B también contienen un dominio MBD, y actúan como lector epigenético de marcas histónicas, uniéndose a histonas metiladas y acetiladas. Estas proteínas funcionan como histona metiltransferasas y contribuyen al remodelado de la cromatina (Du et al., 2015).

Otras proteínas que reconocen la metilación del DNA son UHRF1, ZBTB33/Kaiso, ZBTB4, ZBTB38 y ZFP57. Estas proteínas desempeñan diversos roles en la regulación transcripcional y el mantenimiento del patrón de

metilación durante la replicación del DNA (Avvakumov et al., 2008; Quenneville et al., 2011).

Desde que se ha comenzado a considerar la 5-hmC como marca epigenética, se han descubierto proteínas que aparecen en zonas de cromatina hidroximetilada, como pueden ser MBD3, MeCP2 y UHRF1. Se han identificado varias proteínas que muestran una preferencia por 5-hmC o 5-fC, y se espera descubrir más funciones para estas modificaciones en el futuro.

Estas proteínas parecen mostrar especificidad por el tipo de modificación y los *partners* específicos a los que se unen pueden cambiar con, por ejemplo, la diferenciación (Spruijt et al., 2013). Es probable que se descubran funciones nuevas para estas modificaciones del DNA en el futuro (Frauer et al., 2011; Mellén et al., 2012; Yildirim et al., 2011). Más recientemente, se descubrió que Kaiso se une a 5-hmC mientras que Zbtb4 co-inmunoprecipita con zonas hidroximetiladas. Sin embargo, los dominios de unión a 5-hmC, así como la función biológica, no han sido determinadas del todo (Spruijt et al., 2013).

1.3 Modificación postraduccional de histonas.

El nucleosoma es la unidad básica de cromatina, incluyendo cerca de 150 pares de bases de DNA enrollados sobre un octámero de histonas, que se forma con dos dímeros H2A-H2B y un tetrámero H3-H4 (Jenuwein & Allis, 2001). Mientras que el *core* de las histonas es esencialmente globular, las colas histónicas, situadas en los extremos de la secuencia de aminoácidos (tanto el N- como el C-terminal) están desorganizadas y pueden sufrir modificaciones postraduccionales, como la acetilación, fosforilación, metilación, SUMOilación o ubiquitinación (Strahl & Allis, 2000). Estas modificaciones van a generar cambios en la estructura y carga de las histonas, que a su vez van a producir variaciones en la unión de las mismas al DNA, el nivel de compactación de la cromatina, y de esta manera van a regular la expresión génica, participando en una gran variedad de procesos celulares (Kouzarides, 2007).

1.3.1 Metilación de histonas.

Una de las modificaciones postraduccionales de histonas más importante es la metilación, que suele ocurrir en los residuos de lisina (K) de las colas de las histonas H3 y H4 (Greer & Shi, 2012). Los residuos de lisina de la H3 (K4, K9, K27, K36, K79) o de la H4 (K20) que pueden ser mono-, di- o trimetilados (me1, me2 y me3 respectivamente), resultando en marcas epigenéticas con efecto inductor o represor de la expresión génica. El número de grupos metilo añadidos, así como su posición en cada histona y en la zona de la cromatina que se encuentre, determina el efecto resultante (Macrae et al., 2023).

Las modificaciones en H3K4, H3K36 y H3K79 se encuentran en zonas de la cromatina con transcripción activa, mientras que las modificaciones en las posiciones H3K9, H3K27 y H4K20 se consideran marcas de represión transcripcional, y se encuentran en zonas silenciadas y con cromatina con alto nivel de condensación (Black et al., 2012).

Estas modificaciones no son mutuamente excluyentes, pudiendo coexistir en zonas concretas de la cromatina y generando un efecto combinatorio, en la llamada cromatina bivalente, que permite una regulación muy controlada y precisa de la expresión génica durante el desarrollo (Bernstein et al., 2006; Kinkley et al., 2016; Macrae et al., 2023; Zheng et al., 2016).

Agentes “escritores”, “borradores” y “lectores” de la metilación histonas.

La adición de grupos metilo en los residuos de lisina de las histonas está catalizada por un conjunto de enzimas redundantes, que son denominados genéricamente como metiltransferasas de histonas (HMT) o metiltransferasas de lisina (KMT). En un inicio se consideraba que la metilación de histonas era una marca irreversible que solo desaparecía por falta de mantenimiento. Con el tiempo, se han identificado y categorizado más de 30 proteínas humanas capaces de eliminar la metilación en los residuos de lisina de las histonas, englobadas en dos familias: dependientes de FAD y dioxigenasas. Hay marcas,

Tabla 1.1 Agentes escritores, borradores y lectores de la metilación de histonas y sus funciones (Hyun et al., 2017).

Posición	Escritores	Borradores	Lectores: Funciones
H3K4	SET1A/KMT2E SET1B/KMT2F MLL1/KMT2A MLL2/KMT2B MLL3/KMT2C MLL4/KMT2D SMYD1/KMT3D SMYD2/KMT3C SET7/9/KMT7 PRDM9/KMT8B	LSD1/KDM1A LSD2/KDM1B NO66/MAPJD JARID1A/KDM5A JARID1B/KDM5B JARID1C/KDM5C JARID1D/KDM5D	CHD1 : Remodelador de cromatina BPTF : subunidad complejo NURF TAF3 : subunidad complejo TFIID Sgf29 : Relaciona H3K4me2/3 y H3ac ING4 : restricción del ciclo celular en G/M CFP1 : une CpG sin metilar PHF2/KDM7C : Sensor de oxígeno en normoxia SPIN1 : Senescencia y apoptosis PHF23 : Autofagia PYGO2 : renovación de células de mama progenitoras mamarias.
H3K9	SUV39H/KMT1A–B G9a/KMT1C GLP/KMT1D SETDB1/KMT1E Familia PRDM	JHDM2A/KDM3A JHDM2B/KDM3B JHDM2C/KDM3C JHDM3A/KDM4A JHDM3B/KDM4B JHDM3C/KDM4C JHDM3D/KDM4D PHF8/KDM7B X PHF2/KDM7C	HP1α/β : formación heterocromatina HP1γ : elongación en la transcripción UHRF1 : metilación del DNA
H3K27	EZH1/KMT6B EZH2/KMT6A	UTX/KDM6A UTY/KDM6C JMJD3/KDM6B KIAA1718/KDM7A PHF8/KDM7B	CBX7 : Reducción transcripción del gen diana del complejo PRC EED : ampliar la metilación en H3K27 BAHD1 : formación heterocromatina NSD2 : elongación en la transcripción
H3K36	SETD2/KMT3A NSD1/KMT3B NSD2/KMT3G NSD3/KMT3F SMYD2/KMT3C ASH1L/KMT2H SETD3 SETMAR	JHDM1A/KDM2A JHDM1B/KDM2B JHDM3A/KDM4A JHDM3B/KDM4B JHDM3C/KDM4C JHDM3D/KDM4D	DNMT3A : Metilación DNA LEDGF : reparación DNA NBS1 : reparación DNA Ku70 : reparación DNA MRG15 : Splicing RNA ZMYND11 : Splicing RNA
H3K79	DOT1L/KMT4		TP53BP1 : respuesta al daño en DNA
H4K20	SET8/KMT5A SUV4-20H1/KMT5B SUV4-20H2/KMT5C	PHF8/KDM7B PHF2/KDM7C LSD1n	TP53BP1 : respuesta al daño en DNA L3MBTL1 : compactación cromatina ORC1 : replicación DNA ORCA : replicación DNA Pdp1 : localización de H4K20 metiltransferasa

como la metilación en H3K79, para la que no se han encontrado demetilinas capaces de procesarlas. Los lectores de metilación de histona son muy variados y están agrupados en al menos trece subfamilias (Hyun et al., 2017; Yap & Zhou, 2010).

Todos los agentes implicados en la metilación de histonas (**Tabla 1.1**) muestran una gran especificidad de sustrato y actividad, a nivel de tipo de histona, de posición de la lisina, y de número de grupos metilo (me1, me2 o me3) en el sustrato y en el producto (Vavouri & Lehner, 2012). Además, esta especificidad puede ser modificada dependiendo del complejo enzimático del que formen parte. De esta manera se pueden crear un gran número de modificaciones diferentes, con un efecto concreto, que aparecen en zonas concretas de la cromatina, y están involucradas en procesos diferentes en lo que se denomina el “código de histonas” (Jenuwein & Allis, 2001).

1.4 Methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2).

MeCP2 es una proteína nuclear que fue descrita en 1992. Fue la primera proteína identificada capaz de unirse específicamente a dinucleótidos CpG metilados (Lewis JD. 1992). Es una proteína altamente conservada en animales, sobre todo en mamíferos. Se expresa de forma ubicua (Sharifi & Yasui, 2021; C. Song et al., 2014), aunque hay grandes variaciones dependiendo del tejido, tipo celular y momento del desarrollo, siendo más abundante en el cerebro, con un papel crucial en el desarrollo neuronal (Skene et al., 2010).

MeCP2 está codificada en un gen de 78kb que se encuentra en el cromosoma Xq28, de forma que puede estar afectado por la inactivación del cromosoma X. El gen tiene cuatro exones, y por *splicing* alternativo puede dar lugar a dos isoformas: E1 (con los exones 1, 3 y 4) y E2 (con los exones 2, 3 y 4). La diferencia entre ambas isoformas son 12 aminoácidos en el extremo N-terminal que aparecen únicamente en la forma E1 (Mnatzakanian et al., 2004). Tienen patrones de expresión diferentes según tipo celular y tisular, y tienen ciertas

diferencias en cuanto a estabilidad y capacidad de unión a cromatina (Martínez de Paz et al., 2019).

1.4.1 Estructura y dominios de MeCP2.

MeCP2 es una proteína básica, de 498-486 aminoácidos (dependiendo de la isoforma) con un peso molecular de 53 kDa y un punto isoeléctrico de casi 10. Es una proteína intrínsecamente desordenada (IDP), es decir, no tiene estructura secundaria en parte de su secuencia (Hite et al., 2012; Uversky et al., 2005); concretamente, el 60% de la proteína es desordenada. El resto se reparte en 35% lámina- β y 5% de hélice- α . La estructura de la proteína no se ha podido resolver en su totalidad debido a este desorden, ya sea por difracción de rayos X o RMN (Hansen et al., 2010).

Este desorden intrínseco le confiere una flexibilidad que le permite interactuar con un gran número de moléculas (Uversky et al., 2005). En ocasiones las zonas desorganizadas de las IDP pueden adoptar una estructura definida al unirse a una molécula, de forma que el cambio conformacional le permita interactuar con nuevos *partners*, funcionando como una forma de regulación espaciotemporal de eventos que sirve para controlar vías de señalización.

MeCP2 es una proteína modular, dividida en 5 dominios funcionales: N-terminal domain, NTD; *methyl binding domain*, MBD; *intervening domain*, ID; *transcriptional repressor domain*, TRD; and C-terminal domain, CTD, que a su vez se puede subdividir en CTD α y CTD β (**Figura 1.4**).

El MBD es el único dominio cuya estructura ha sido descrita, ya sea de forma libre, o en complejo con el DNA (Wakefield et al., 1999), de forma que sabemos que está formado por 3 láminas beta antiparalelas, con una hélice en el extremo C-terminal. Junto al TRD, que es capaz de reclutar complejos de represión por sí solo y tiene un posible dominio de dimerización, son los elementos comunes al resto de proteínas de la familia.

Flanqueando el MBD hay dos dominios completamente desordenados: NTD e ID, también llamados HMGD1 y HMGD2 (*High Mobility Group-Like Domain*), respectivamente. El dominio ID contiene un dominio AT-hook que puede modular la interacción con el DNA, promoviendo una interacción de alta afinidad independiente del estado de metilación de la citosina (Ghosh, Nikitina, et al., 2010; Hite et al., 2009).

La región C-terminal se divide en CTD α y CTD β , y es necesaria para la compactación de cromatina. CTD β tiene dos motivos dentro de su secuencia: un motivo rico en histidinas (siete consecutivas) y un motivo rico en prolina, que contiene un sitio de unión a proteínas WW (Nikitina et al., 2007).

MeCP2 contiene un dominio de unión a RNA, posiblemente ubicado entre el TRD y el inicio del CTD (Hudson & Ortlund, 2014). Se ha demostrado que los motivos de repetición RG (arginina-glicina) son módulos de unión a RNA establecidos (Thandapani et al., 2013). Estos motivos tienen preferencia por las estructuras de G-cuádruple o RNA de doble cadena rico en GC, donde los residuos de arginina forman enlaces de hidrógeno con las (Järvelin et al., 2016). MeCP2 ha sido identificado como un importante RBP (proteína de unión a RNA) en estudios a gran escala (He et al., 2016; Trendel et al., 2019). Recientemente, se descubrió un motivo de unión a RNA no canónico rico en lisina dentro del TRD de MeCP2 (Castello et al., 2016). Estos dominios de unión a RNA no canónicos carecen de homología de secuencia con los dominios de unión a RNA conocidos y están caracterizados por residuos básicos (R y K) y residuos que promueven el desorden (R, G, P, S y Q en MeCP2). Estos dominios no canónicos también están enriquecidos en interacciones con DNA y proteínas, lo que sugiere una competencia entre la unión a RNA y otras interacciones moleculares en estas regiones (Chong et al., 2018).

En los extremos de MeCP2 (NTD y CTD) hay motivos PEST (prolina-glutamato-serina-treonina) que son susceptibles de ser modificados postraduccionalmente. Se han descrito algunas modificaciones, pero su efecto

en la estructura y función de la proteína no ha sido dilucidado del todo (Ausió et al., 2014a; Ward et al., 2004).

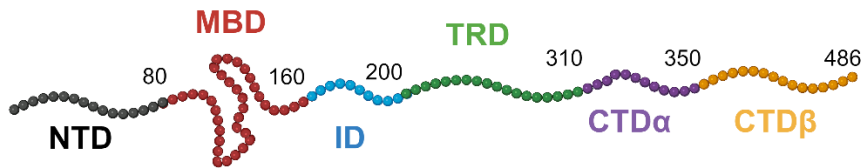


Figura 1.4. Dominios funcionales de la proteína MeCP2.

1.4.2 Función de la proteína MeCP2.

Inicialmente se consideraba que MeCP2 era un represor transcripcional con función en supervivencia y desarrollo de neuronas, sinaptogénesis, maduración y plasticidad neuronal, por la presencia del dominio de unión a CpG metilado, y el TRD (Nan et al., 1997). Sin embargo, posteriormente se han ido atribuyendo funciones más complejas, conforme se ha visto su implicación en diferentes vías de señalización, donde provoca diferentes efectos en la expresión de genes, dependiendo del gen que regula y los *partners* moleculares a los que está asociada.

En el contexto de la cromatina va a realizar un control de la regulación a tres niveles: El primer nivel de regulación es el más sencillo y claro, y se basa en la capacidad de MeCP2 de unirse al DNA en secuencias CpG y no CpG con diferentes estados de metilación y oxidación, lo cual va a modular de forma directa la accesibilidad de las zonas promotoras a la maquinaria de transcripción (Fraga, 2003; Mellén et al., 2012; Nan et al., 1997). El segundo nivel de regulación es el reclutamiento por parte de MeCP2 de proteínas que actúan como activadores o represores de la transcripción. Su presencia en cada contexto molecular añadirá un nuevo efecto de regulación transcripcional (Ebert et al., 2013; Lombardi et al., 2015). El tercer nivel de regulación es más amplio y condiciona a los otros dos, ya que se basa en la capacidad de MeCP2 de intervenir en la arquitectura de la cromatina, y remodelará las zonas del genoma

que sean transcripcionalmente activas en cada tipo celular y momento del ciclo (Agarwal et al., 2007; Nan et al., 1998) (**Figura 1.5**).

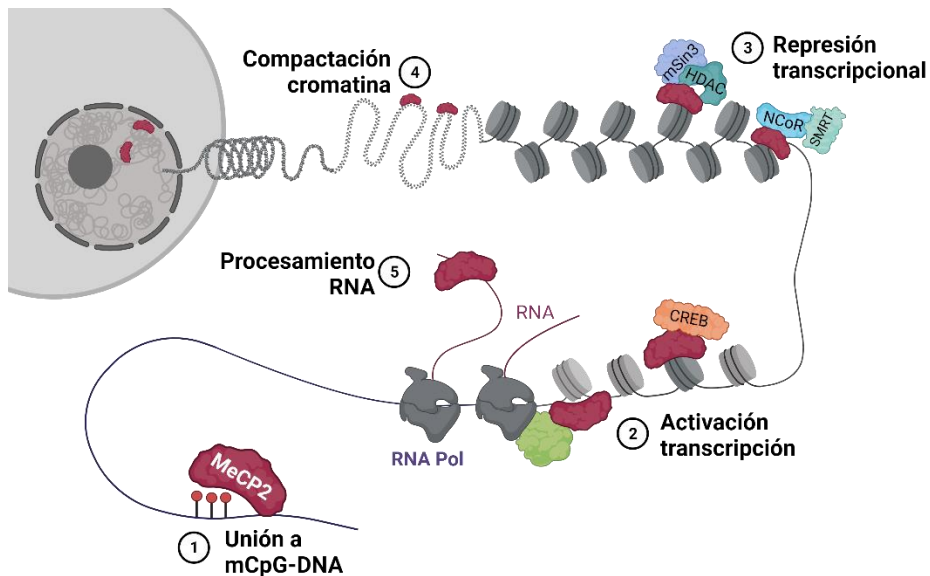


Figura 1.5. Funciones de MeCP2 según su unión a diferentes ligandos moleculares.

Además, MeCP2 actúa como una proteína de unión a RNA, participando en procesos como el *splicing* alternativo, maduración y desarrollo de micro RNA y RNA largo no codificante, participando de esta forma en una regulación a nivel traduccional.

Tanto la sobreexpresión como la expresión deficiente o las mutaciones del gen que codifica la proteína conducen a trastornos neurológicos (del Gaudio et al., 2006; Van Esch et al., 2005a). Además, MeCP2 puede actuar como represor o activador transcripcional, dependiendo del contexto funcional y estructural, es decir, los cofactores interactuantes asociados, las modificaciones postraduccionales y marcas epigenéticas de la cromatina en el entorno (Ben-Shachar et al., 2009; Chahrour et al., 2008; Ego et al., 2005; P. L. Jones et al., 1998a; Lewis et al., 1992; Matsumura et al., 2010; Nan et al., 1998; Yasui et al., 2007). Alrededor de 1300 genes están desregulados transcripcionalmente (regulados al alza o a la baja) cuando MeCP2 es disfuncional (Chahrour et al., 2008). MeCP2 puede regular genes específicos o mostrar funciones a nivel de

cromatina similares a las histonas en todo el genoma. Por lo tanto, MeCP2 podría no actuar necesariamente como un factor de transcripción clásico, sino como un regulador de ajuste fino de la transcripción génica. Los primeros intentos de identificar los genes diana de MeCP2 estaban sesgados, ya que originalmente se pensaba que tenía un papel represor. Ejemplos de genes directamente y específicamente regulados a la baja por MeCP2 son el factor neurotrófico derivado del cerebro (Bdnf), el receptor de glutamato 2 (GluR2) y la quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CamK2d), así como proteínas implicadas en la guía de axones y la formación de sinapsis (Gabel et al., 2015). En estado basal, MeCP2 se une al promotor de GluR2; la actividad neuronal aumenta los niveles de MeCP2, lo que resulta en una mayor inhibición de la transcripción de GluR2 y la reducción de la excitabilidad neuronal (Qiu et al., 2012).

La deficiencia de MeCP2 provoca cambios globales en la estructura de la cromatina neuronal, un aumento de la acetilación de histonas y de los niveles de histona H1, y una transcripción elevada de elementos repetitivos espurios. Por lo tanto, MeCP2 puede actuar, no como un represor transcripcional específico de un gen en las neuronas, sino para amortiguar el ruido transcripcional en todo el genoma de una manera dependiente de la metilación del DNA (Skene et al., 2010). El papel represor de la proteína está asociado con la unión de MBD a mCpG y con su asociación con correpresores (por ejemplo, Sin3A, ATRX y HDACs), mientras que el papel activador es independiente de la unión de MBD y está asociado con el desplazamiento de correpresores (por ejemplo, HP1 γ) y la consiguiente relajación conformacional de la cromatina (Brink et al., 2013).

Unión al DNA mediante el reconocimiento directo de la metilación.

Como ya hemos visto, MeCP2 fue identificada como una proteína que reconoce dinucleótidos mCpG, siendo el MBD la porción mínima que puede realizar esa unión selectiva. *In vivo*, MeCP2 aparece distribuida a lo largo del DNA, enriqueciéndose en zonas con mayor densidad de metilación. Sin embargo, la disposición global de MeCP2 no es explicable simplemente con la presencia de

mCpG. Incluso, encontramos MeCP2 asociada a la cromatina en células que no expresan DNMTs, lo cual indica que hay otros mecanismos de unión implicados. Uno de estos mecanismos puede ser la presencia de regiones enriquecidas en A/T, en secuencias concretas de DNA, como es el caso de los promotores de genes regulados por MeCP2, como *Bdnf* o *Dlx6* (Klose et al., 2005; Skene et al., 2010).

MeCP2 potencialmente puede interactuar con el DNA a través de diferentes dominios: MBD, ID, TRD y CTD. Esto no es sorprendente ya que MeCP2 tiene tres regiones *AT-hook* distribuidas por los dominios NTD, ID y TRD. Sin embargo, no se conocen las interacciones específicas de los dominios fuera del MBD con cromatina, y no se ha detectado una capacidad de discriminar estado de metilación en esas zonas, ni hay información a nivel estructural.

Con los datos existentes hasta la fecha, hay cierta controversia entre los estudios *in vitro* y a nivel celular/*in vivo*. La capacidad de discriminación del MBD *in vitro* parece estar determinada por la fuerza iónica. Al tratarse de una interacción guiada por factores electrostáticos (MeCP2 es una proteína muy básica): con baja fuerza iónica el MBD se une ligeramente mejor a mCpG (Fraga, 2003), mientras que en condiciones de alta fuerza iónica la afinidad por CpG no metilado disminuye, obteniendo una diferencia de afinidades biológicamente relevante (>100 veces mayor) (Khrapunov et al., 2014).

In vivo vemos una clara tendencia a la unión en mCpG, reforzada por la presencia de otros motivos, como los tramos ricos en A/T y se ve afectada por modificaciones en la accesibilidad de la cromatina. La unión a zonas no metiladas es marginal. Hay también unión a mCpG en zonas intragénicas, que parece tener un papel en el *splicing* alternativo de los genes (Maunakea et al., 2013).

Se ha demostrado que la unión dependiente de la metilación está influida por la longitud del DNA (Ghosh RP. 2010b; Thambirajah AA. 2012). Además, aunque la forma libre de MeCP2 es monomérica en solución, la unión dimérica puede

ocurrir *in vivo* en presencia de una alta densidad de metilación, repeticiones A/T cercanas y alta fuerza iónica. Esta discrepancia entre los ensayos *in vitro/in vivo* se debe principalmente a la dificultad de reproducir el entorno nuclear nativo y al uso de dominios aislados (esencialmente, MBD) en muchos de los experimentos *in vitro*.

La capacidad de MeCP2 de reconocer la marca 5-hmC también genera controversia en la literatura. Algunos grupos han reportado una menor afinidad de MeCP2 por el DNA hidroximetilado, en comparación con el metilado (Spruijt et al., 2013), mientras que en otros estudios se ve una unión de alta afinidad similar por los dos tipos de DNA modificado (Mellén et al., 2012).

In vivo la cosa se complica, ya que las técnicas de secuenciación no siempre diferencian el estado de oxidación del grupo metilo, lo cual oscurece las conclusiones que se puedan haber sacado antes de considerar la 5-hmC como marca independiente. El desarrollo de tecnologías que permiten distinguir la 5-mC de 5-hmC a nivel de genoma han llegado más tarde (Yu et al., 2012) y los estudios parecen indicar que MeCP2 actúa como lector de 5-hmC, ganando importancia durante el desarrollo del sistema nervioso central (Kriaucionis & Heintz, 2009). El aumento de la 5-hmC en la diferenciación neuronal, el desarrollo cerebral y el envejecimiento (Münzel et al., 2011; Szulwach, Li, Li, Song, Wu, et al., 2011; Tahiliani et al., 2009) es paralelo al aumento de la unión de MeCP2 a lo largo de la cromatina (Skene et al., 2010). Esta marca aparece en genes transcripcionalmente activos, lo cual se puede explicar por una parte por ser intermediario en el proceso de eliminar la metilación (que se asocia a represión transcripcional). Los ensayos en ratones parecen indicar que se une a zonas hidroximetiladas y actúa como una unión entre histonas, generando una conformación de cromatina accesible a la maquinaria de transcripción (Chahrour et al., 2008; Ghosh, Horowitz-Scherer, et al., 2010).

Esta discriminación entre metilación e hidroximetilación mediada por MeCP2 tendría un papel fundamental en el *splicing* alternativo en neuronas, donde hay

un enriquecimiento de la marca 5-hmC en zonas límite exón-intrón, mientras que la marca 5-mC aparece en esas zonas en otros tipos celulares, indicando un papel de regulación del *splicing* alternativo mediado por MeCP2 como lector de 5-hmC en el cerebro, (Khare et al., 2012; R. Li et al., 2016; Wen et al., 2014) que va en la misma línea del enriquecimiento de MeCP2 en límites exón-intrón y en zonas con 5-hmC en genes neuronales activos durante el desarrollo postnatal (Kinde et al., 2015; R. Li et al., 2016).

Se han identificado dos patrones de unión de MeCP2 a la cromatina en el cerebro: una población en cromatina muy compactada (transcripcionalmente inactiva), y otra población en zonas activas y accesibles, en la que también se encuentran los mayores niveles de hidroximetilación (Thambirajah et al., 2012).

El patrón de expresión génica de cada tipo celular entonces se podría explicar por una estructuración de la cromatina que es reflejo, entre otros factores, del equilibrio entre metilación e hidroximetilación, compactación y no-compactación, mediado por MeCP2 y otras proteínas de la familia MBD.

Además de la (hidroxi)metilación en contextos de nucleótido CpG la integración de análisis de distribución genómica de MeCP2, con expresión génica, y patrones de metilación, ha revelado que MeCP2 reconoce también la metilación en contextos no- CpG, concretamente mCpH (donde H = A, C o T) (L. Chen et al., 2015)- Es un motivo que también aparece progresivamente durante la maduración de las neuronas (Guo et al., 2014; Lister et al., 2013), al igual que aumenta la abundancia de MeCP2 en la diferenciación neuronal y al incrementarse la formación de sinapsis. (Lister et al., 2013; Shahbazian et al., 2002; Skene et al., 2010) Los genes con mayor contenido en mCpH después del nacimiento se muestran malregulados en modelos con MeCP2 disfuncional, indicando que la unión de MeCP2 a estas zonas es crucial para su regulación, siendo el dinucleótido mCpA por el que más afinidad presenta MeCP2 (Gabel et al., 2015; Guo et al., 2014; Shahbazian et al., 2002).

La metilación o hidroximetilación en contexto CpA (mCpA) o su forma hidroximetilada (hmCpA) pueden representar una nueva marca epigenética para la cromatina que implica "escritores" y "lectores" potencialmente novedosos. Tanto 5-mC como mA se han considerado recientemente como la quinta y sexta bases del DNA, debido a su importante vínculo con el control epigenético (Heyn & Esteller, 2015).

Unión a proteínas: activadores o represores de la transcripción.

El segundo nivel de regulación transcripcional mediado por MeCP2 se lleva a cabo mediante reclutamiento de otros reguladores transcripcionales a zonas como las islas CpG metiladas (Bird, 2011). La mayoría de las islas CpG se localizan en regiones intra- e intergénicas y están asociadas a la regulación de la expresión génica. Menos del 3% de las islas CpG se localizan en promotores; en su estado no metilado reclutan enzimas que marcan las regiones promotoras de la cromatina para un estado activo (por ejemplo, histona H3K4me3), o reclutan complejos correpresores que establecen una marca represiva para el silenciamiento génico cuando están en su estado metilado (Maunakea et al., 2013).

Se han identificado muchos *partners* proteicos de MeCP2 que están asociados a diferentes vías y mecanismos de señalización (Ausió et al., 2014b; Bedogni et al., 2014; Guy et al., 2011). Los tres dominios NTD, TRD y CTD participan en interacciones estables con cofactores proteicos cuando MeCP2 se une al DNA, variando según el contexto funcional (activador/represor) de MeCP2.

MeCP2 recluta proteínas asociadas a la heterocromatina y complejos correpresores (por ejemplo, HP1, Sin3A, helicasa dependiente de ATP, ATRX, HDACs, NCoR/SMRT, c-Ski, Brahma, metiltransferasa de histona H3K9). Por ejemplo, HP1 se une a la cromatina y tiende puentes entre las histonas H3K9 metiladas y otras proteínas de unión a la cromatina, promoviendo la formación de heterocromatina (Thambirajah et al., 2012). Otro ejemplo lo proporciona NCoR/SMRT, un *partner* crítico en la función represora de MeCP2, y que está

alterado en patologías asociadas a MeCP2, como el síndrome de Rett (RTT) (Ebert et al., 2013); y forma complejos con múltiples proteínas (por ejemplo, HDAC3) que resultan en la desacetilación de histonas y la represión génica. Sin embargo, MeCP2 también interactúa con activadores de la transcripción como CREB1 (Chahrour et al., 2008; Lombardi et al., 2015).

Participación en la arquitectura global de la cromatina: unión a nucleosomas.

Los niveles de MeCP2 en las neuronas de mamíferos comienzan a aumentar tras el nacimiento y se aproximan a los de la histona H1 en el cerebro de ratones adultos. En ratones *knockouts* para MeCP2, la ausencia de MeCP2 provoca un aumento de H1 hasta alcanzar niveles similares a los observados en células no neuronales (Skene et al., 2010). La correlación negativa en los niveles de MeCP2 y la histona H1, junto con su unión competitiva a los nucleosomas, sugiere una compleja interacción en la regulación de la expresión génica que implica mecanismos compensatorios entre MeCP2 y H1 (Ghosh, Horowitz-Scherer, et al., 2010). También indica que existe una función de MeCP2 en todo el genoma con un papel arquitectónico similar al de la histona H1, a pesar de la ausencia total de similitud estructural entre estas dos proteínas. Resulta interesante destacar que MeCP2 reconoce específicamente 5-mC o 5-hmC rodeadas de zonas A/T, mientras que el objetivo de H1 es la secuencia AAATT. La interacción global de MeCP2 con la cromatina da lugar a su remodelación y reorganización, la formación de heterocromatina y el silenciamiento (Agarwal et al., 2007; Dhasarathy & Wade, 2008; Kernohan et al., 2014; Klein et al., 2007; Nan et al., 1998).

Al igual que la histona H1, MeCP2 es un factor de compactación de la cromatina por sí mismo, sin necesidad de co-represores adicionales o enzimáticas, y de una manera independiente de la metilación (Georgel et al., 2003). La falta de MeCP2 da lugar a una estructura de cromatina desorganizada asociada a respuestas neuronales inadecuadas a los estímulos, lo que conduce a un deterioro de la plasticidad sináptica. Esto implica una actividad represora global

e inespecífica, alternativa al papel represor específico y directo asociado a las regiones reguladoras promotoras metiladas. Por lo tanto, además de regular la expresión de genes específicos, MeCP2 puede actuar globalmente como un componente similar a la histona H1 que lleva a la cromatina a una organización altamente especializada (Cohen et al., 2011; Skene et al., 2010).

MeCP2 organiza la estructura de la cromatina a través de asociaciones homo- y heterólogas mediadas en gran medida por ID y TRD (A. Becker et al., 2013). Un hallazgo contraintuitivo es que MeCP2 se asocia con regiones de la cromatina altamente accesibles a la nucleasa microcócica, a pesar de su capacidad de compactación de la cromatina, lo cual sería explicado por la unión a zonas hidroximetiladas y activas. Cabe destacar que la longitud de repetición del nucleosoma en las neuronas (correspondiente a la longitud media en nucleótidos entre los centros de dos nucleosomas adyacentes) cambia de 200 pb en las primeras etapas embrionarias a 160 pb en el cerebro adulto, en paralelo con el aumento de los niveles de MeCP2 y la disminución de los niveles de histona H1.

Para ejercer este efecto de compactación de nucleosomas, que está probado y aceptado, parece obvio que MeCP2 debe unirse a algún elemento del octámero de histonas, ya sea de forma directa o a través de intermediarios. En este sentido, hay evidencia de que MeCP2 se asocia a modificadores epigenéticos de histonas, como deacetilasas HDAC1, HDAC2, (Hendrich & Bird, 1998; P. L. Jones et al., 1998b) así como SUV39H1 y DNMT3 (Fuks, 2003; Fuks et al., 2003) , con actividad histona metiltransferasa responsable de la metilación en H3K9. En ensayos celulares, MeCP2 coimmunoprecipita junto a las histonas H2A y H3, mostrando además variaciones dependientes del estado de metilación de H3 en las lisinas K4, K9 y K27, desapareciendo cualquier tipo de unión (directa o indirecta) al utilizar H3K37me3 como coimmunoprecipitante (Thambirajah et al., 2012). Esto parece indicar cierta capacidad de lectura del estado de metilación de la H3, aunque no esclarece si esta discriminación es una actividad intrínseca de MeCP2 o la lleva a cabo a través de algún intermediario en la unión.

Regulación dependiente de RNA.

Como proteína de unión a RNA, también se han atribuido funciones de procesamiento, maduración, y *splicing* alternativo

***Splicing* alternativo.**

Se ha propuesto que MeCP2 desempeña un papel en el *splicing* del RNA, a través de la unión directa a RNA y al factor de *splicing* YB-1. También se ha observado que la depleción de MeCP2 en líneas celulares humanas conduce a eventos anormales de *splicing* alternativo sin variar los niveles expresión total de las proteínas. Se han observado cambios en el *splicing* alternativo de genes, incluyendo DLX5, Fgf2-5, Fut8 y Nf1 en modelos de ratón de RTT (Mecp2308/Y). Esto último, junto con los informes de la unión de MeCP2 con la proteína de unión a RNA YB-1) apoyan el papel de MeCP2 en el *splicing* de RNA (Young et al., 2005).

Además, MeCP2 une otros factores de *splicing* en contextos diferentes, sobre todo a través del CTD, y en menor proporción, el TRD (Buschdorf & Stratling, 2004; Long et al., 2011; Maxwell et al., 2013). Cada vez gana más importancia la función de MeCP2 en este *splicing* alternativo, sobre todo al estudiar el global de proteínas a las que se une MeCP2, viendo que la mayoría están implicadas en procesamiento y *splicing* de RNA (Cheng et al., 2017).

Regulación de miRNA.

Los microRNA son RNA no codificantes que desempeñan un papel clave en la regulación de la expresión génica. Se trata de moléculas de RNA monocatenario cortas (22 nucleótidos de longitud, Lee et al., 1993).

Los microRNA están implicados en el silenciamiento de genes. Un estudio reciente describió el papel de MeCP2 en la regulación de la expresión de microRNA (miRNA) en el cerebro prenatal. Se ha informado de que miR-132 y miR-212 se unen a 3' UTR de MeCP2 y disminuyen la traducción del transcrito (Wada et al., 2009). MeCP2 parece regular el procesamiento de

miRNA interactuando con DGCR8 para detener la formación del complejo Drosha-DGCR8 y detener así la transcripción y la traducción (Cheng et al., 2014). A pesar de ello, el papel de MeCP2 en la regulación de microRNA no ha llevado a un consenso.

1.4.3 Enfermedades relacionadas con MeCP2.

Al ser un regulador transcripcional a nivel global, debe ejercer una actividad muy controlada para que los procesos celulares funcionen correctamente. Tanto la falta de función como la sobreexpresión, conducen a patología, de forma que la ventana de actividad de MeCP2 para un correcto funcionamiento celular es muy estrecha. La mayoría de enfermedades producidas por una disfunción de MeCP2 son de naturaleza neurológica, aunque una desregulación de su expresión lleva a enfermedades hereditarias o autoinmunes. Algunas de las enfermedades relacionadas con mutaciones en el gen MECP2 son el Síndrome de Rett (RTT), síndrome de Angelman, retraso mental ligado al cromosoma X o encefalopatía neonatal severa. La desregulación de MECP2 resulta en enfermedades como el síndrome de duplicación de MECP2; trastornos del espectro alcohólico fetal o la enfermedad de Huntington. Además de estas enfermedades, MeCP2 interviene en otros procesos que tienen asociado un cambio epigenético, como es el caso de varios tipos de cáncer (de mama, colorrectal, pulmón, próstata, mieloma, carcinoma ductal, o cáncer cervical) artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, o la enfermedad de Hirschsprung (Ezeonwuka & Rastegar, 2014). En esta tesis se van a tratar dos de las enfermedades ya mencionadas: el síndrome de Rett, y el adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC).

1.5 Síndrome de Rett.

1.5.1 Historia y etiología: una enfermedad rara

En 1966, el médico alemán Andreas Rett describió por primera vez el síndrome de Rett (RTT), un trastorno similar al autismo que afecta principalmente a

mujeres (Rett, 1966). Tiene una prevalencia de 1 de cada 10,000-20,000 nacimientos (Hagberg, 1985; Hagberg et al., 1983), y también se presentan casos esporádicos en hombres (Reichow et al., 2015). RTT es considerado la segunda causa más común de discapacidad intelectual en mujeres. En 1999 se descubrió que el RTT es causado por mutaciones *de novo* en el gen MECP2 (Amir et al., 1999) que confirmó la hipótesis previa de que el síndrome tenía una causa genética subyacente ligada al cromosoma X (Hagberg et al., 1983).

1.5.2 Sintomatología, diagnóstico y evolución

Las pacientes RTT tienen un desarrollo intrauterino y un desarrollo psicomotor sin fenotipo especial aparente tras el nacimiento, hasta que la sintomatología clínica aparece entre el sexto y decimoctavo mes de vida posnatal, y se divide en cuatro fases: 1) estancamiento, 2) período de regresión activa (generalmente alrededor de 1 a 4 años de vida), 3) fase de meseta o pseudoequilibrada (desde la infancia hasta principios de los veinte años), y 4) etapa tardía de deterioro motor (Chahrour & Zoghbi, 2007).

En la primera etapa, las pacientes RTT tienen dificultades para alcanzar hitos del desarrollo en áreas como el lenguaje, la coordinación motora y la interacción social. También puede haber una reducción en el contacto visual y, en algunos casos, se presenta microcefalia (Neul et al., 2014). Durante la fase de regresión activa de RTT, las niñas experimentan una pérdida significativa de habilidades adquiridas. Se deterioran los procesos cognitivos, el lenguaje hablado y las habilidades motoras. También se observan movimientos estereotípicos de las manos, características similares al autismo, anomalías respiratorias y posibles convulsiones. Es la etapa donde suele ocurrir el diagnóstico, guiado por sintomatología y confirmado por secuenciación genética (Hagberg, 2002).

Por lo general, alrededor de los 5 años, el deterioro se estabiliza y las pacientes entran en una fase de “meseta”, que puede durar toda la vida. En esta fase, las convulsiones son comunes y van acompañadas de defectos en la coordinación motora y trastornos del sueño (Hagberg, 2002).

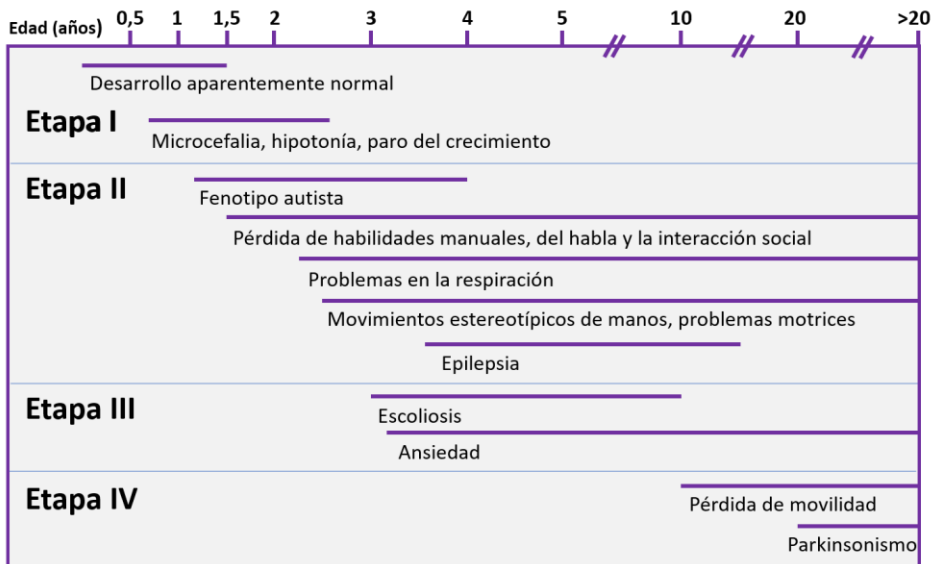


Figura 1.6. Etapas del síndrome de Rett y sintomatología (Zahorakova, 2013).

Es común que las pacientes con sintomatología más leve sean diagnosticadas de autismo en esta etapa (Kaufmann et al., 2012). Sin embargo, aunque el RTT comparte características de listas de criterios para el diagnóstico Trastornos del Espectro Autista (TEA), ya no se considera parte dicho espectro, sino que está considerado un trastorno asociado (American Psychiatric Association, 2013).

No todas las pacientes RTT experimentan la etapa 4, que se caracteriza por la pérdida completa de la capacidad para caminar y una discapacidad física general. Aunque las pacientes con RTT tienen una esperanza de vida significativa en comparación con otros trastornos del neurodesarrollo, se han reportado casos de muertes repentinas. Sin embargo, con atención clínica adecuada, se pueden prevenir estos desenlaces. Aunque el RTT se clasifica en etapas según la edad y los síntomas, existe una gran variabilidad entre las pacientes, desde una discapacidad intelectual leve hasta una deficiencia mental y física más grave (Chahrour & Zoghbi, 2007).

1.5.3 Causa del Síndrome de Rett

Más del 95% de las pacientes diagnosticadas con RTT presentan mutaciones en el gen MECP2 (Krishnaraj et al., 2017). En el pasado, se asociaron los casos atípicos de RTT a mutaciones en diferentes genes, siendo destacables las mutaciones en CDKL5 (Mari et al., 2005), FOXP1 (Ariani et al., 2008), TC4, JMJD1C y (Krishnaraj et al., 2017; Lucariello et al., 2016). Sin embargo, un pequeño porcentaje de niñas diagnosticadas con RTT no presenta una modificación genética conocida asociada a su fenotipo (Gold & Christodoulou, 2015; Xiang, 2000).

La gran mayoría de pacientes tienen una mutación en heterocigosis. Tanto los casos en homocigosis o en el caso de varones, suele aparecer una encefalopatía congénita con letalidad temprana. Sin embargo, hay pacientes RTT con cromosomas XY o XXY, que presentan diferente grado de mosaicismo somático y variedad en sintomatología (J. Armstrong et al., 2001; Salomão Schwartzman et al., 1999).

Como el gen MECP2 se encuentra ubicado en la banda 28 del brazo largo del cromosoma X (Xq28) (Sirianni et al., 1998), sufre el efecto de la inactivación del cromosoma X (XCI) durante el desarrollo para compensar la presencia de dos copias parentales (Constância et al., 1998). Esto provoca un mosaicismo que es común en el RTT, resultado de la inactivación aleatoria de una copia de MECP2 en cada célula, que puede ser la copia WT o la mutada (Xinhua Bao et al., 2008). Aunque la inactivación sesgada del cromosoma X puede favorecer la inactivación del gen mutado en ratones (Young & Zoghbi, 2004), la mayoría de las pacientes presentan un XCI aleatorio (Shahbazian et al., 2002). Por lo tanto, el mosaicismo y los diferentes tipos de mutaciones contribuyen a una amplia gama de gravedad clínica (Naidu et al., 2003) y fenotipos distintos dentro del trastorno (Leonard et al., 2017; Xinhua Bao et al., 2008), lo que influye en el diagnóstico, el pronóstico y el desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas (Gadalla et al., 2011).

1.5.4 Fisiopatología del síndrome de Rett. Efecto de las mutaciones sobre la estructura y función de MeCP2.

Según la Base de Datos de Rett (Rett DataBase), se han mapeado más de 4,600 mutaciones en el locus MECP2 en pacientes con RTT (Krishnaraj et al., 2017). Tanto el tipo de mutación como su ubicación en la proteína influyen en el fenotipo clínico del RTT. En general, las deleciones grandes y las mutaciones sin sentido son más graves que las mutaciones de cambio de sentido, mientras que las mutaciones más cercanas a la región N-terminal generan un fenotipo más severo que las cercanas a la región C-terminal (Naidu et al., 2003). Además, las mutaciones ubicadas específicamente en el MBD o en el TRD también producen fenotipos graves, al interferir con unión de MeCP2 a sus *partners* principales (Good et al., 2021).

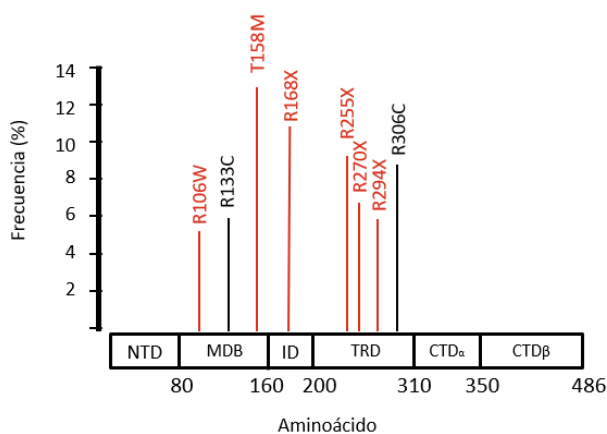


Figura 1.6. Mutaciones causantes de síndrome de Rett. Se representa la frecuencia (eje vertical), de las mutaciones con sintomatología leve (negro) y severa (rojo) en la posición de la proteína donde se ubican.

Aunque se han mapeado muchas mutaciones en el gen MECP2, solo se han identificado ocho mutaciones recurrentes (de sentido erróneo: R106W, R133C, T158M, R306C; y sin sentido: R168X, R255X, R270X, R294X) y son las que producen más del 60% de los casos documentados de RTT, agrupándose en el MBD (25%) y en el TRD (34%) (Krishnaraj et al., 2017). Las mutaciones sin sentido R270X, R255X y R168X son clínicamente más severas que la R294X

(Bebbington et al., 2008; Neul et al., 2008), tal como indica su mayor proximidad a la región N-terminal.

Para evaluar la gravedad sintomatológica existen sistemas de puntuación que correlacionan mutaciones concretas con el nivel de discapacidad asociado, siendo las más graves aquellas que afectan a la habilidad de hablar, andar y la habilidad manual (Bebbington et al., 2008; Monrós et al., 2001).

Las mutaciones en MeCP2 pueden afectar a sus niveles de expresión, la estabilidad estructural y biológica, la unión al DNA o a proteínas y la regulación mediante modificaciones postraduccionales. Además, algunas de estas características pueden estar influidas mutuamente o tener consecuencias adicionales. Por ejemplo, una mutación que altere la estructura de la proteína, puede tener efecto no solo en la estabilidad de la misma, sino también en su capacidad de interacción con elementos celulares, que a su vez hará que se vea afectado el tráfico intracelular de la proteína, y capacidad de ejercer su función biológica.

En RTT, el 20% de las mutaciones (y el 50% de las mutaciones de cambio de sentido) se localizan en el (MBD). Tres de estas mutaciones representan el 16% de las mutaciones asociadas a RTT: T158M (8.8%), R133C (4.2%) y R106W (2.8%). Algunas de las mutaciones más frecuentes causan efectos desestabilizadores y afectan a la unión de la proteína al DNA (Ghosh et al., 2008; Goffin et al., 2012; K. L. Ho et al., 2008a; Kucukkal et al., 2015; Yusufzai, 2000).

R133C y R106W son mutaciones estructuralmente disruptivas con poco efecto sobre la estabilidad del MBD y debilitan la unión de la proteína al DNA (K. L. Ho et al., 2008a). Sin embargo, la gravedad de los fenotipos asociados con estas mutaciones es diferente (leve para R133C y grave para R106W), lo que indica que su impacto sobre la afinidad por el DNA sigue algún mecanismo más complejo o afectar las interacciones con otros socios de unión. La mutación

T158M parece tener efectos sobre la expresión y estabilidad de la proteína, así como su capacidad de unir DNA metilado, aunque un aumento en su expresión es capaz de revertir los síntomas (Lamonica et al., 2017).

Además de estas tres posiciones, hay un aminoácido clave, situado en el TRD. La mutación R306C, impide la interacción de MeCP2 con el complejo NCoR y eliminando el efecto de silenciamiento mediado por este complejo, y afecta a la fosforilación en posición T308, pero no afecta a la unión de Sin3A (Cronk et al., 2016). Por otro lado, la mutación T308A provoca una unión constitutiva al complejo NCoR, eliminando la regulación en su actividad regulatoria. Curiosamente, ambas mutaciones con efecto opuesto provocan un fenotipo RTT parecido, indicando que la interacción con NCoR es crítica para el buen funcionamiento de MeCP2 (Ebert et al., 2013).

MeCP2 se expresa en una amplia variedad de células y tejidos, pero su papel fundamental se destaca en la función neuronal normal durante el desarrollo cerebral posterior al nacimiento (Lyst & Bird, 2015). Estudios en ratones han demostrado que la pérdida selectiva de MeCP2 en células neuronales reproduce la mayoría de los síntomas perjudiciales del trastorno. Además, restaurar genéticamente los niveles de MeCP2 en el cerebro adulto revierte la mayoría de los síntomas en ratones MECP2 nulos (Guy et al., 2007).

Los estudios realizados en cerebros *postmortem* de pacientes con RTT han revelado características morfológicas típicas, como la reducción del volumen cerebral, especialmente en la corteza frontal y las regiones temporales, y la presencia de alteraciones estructurales, como neuronas anormales y compactas, menor ramificación dendrítica y disminución de la densidad de espinas (D. Armstrong et al., 1995; Carter et al., 2008; SteRNAs et al., 2007).

Además, se ha sugerido que MeCP2 desempeña un papel en etapas tempranas del desarrollo y la neurogénesis, y se ha observado que su deficiencia puede

tener consecuencias antes de la aparición de los síntomas (Fehr et al., 2010, 2011; Neul et al., 2008).

Además, se ha encontrado que MeCP2 está involucrada en la regulación de genes clave en las vías antioxidantes y de eliminación de radicales, lo que sugiere una posible relación con los síntomas relacionados con el estrés oxidativo y el sistema nervioso autónomo en el RTT (Filosa et al., 2015).

1.5.5 Tratamiento del Síndrome de Rett: terapias actuales y futuras perspectivas.

Hay dos características principales RTT que lo convierten en un buen candidato para ser el primer desorden neurológico tratable o curable: en primer lugar, tiene una causa monogénica, que no causa muerte celular ni degeneración (D. D. Armstrong, 2002; R. Z. Chen et al., 2001). En segundo lugar, en modelo de ratón, los síntomas y la esperanza de vida se mejoran al restaurar los niveles de MeCP2. A pesar de esto, aún no hay una cura, y la mayoría de estudios preclínicos y terapias utilizadas intentan paliar los síntomas más críticos para mejorar la calidad de vida.

Hay dos estrategias principales a la hora de abordar el tratamiento. Por una parte, se encuentran las terapias génicas que intentan vehicular un gen MECP2 sano, o activar la copia WT del cromosoma X inactivado, o usar compuestos que evadan las mutaciones sin sentido evadiendo el codón STOP. Por otra parte, estarían las estrategias que usan como diana los efectos aguas abajo de la desregulación producida por la proteína MeCP2 aberrante.

Cada una de estas estrategias tiene inconvenientes. Para las terapias génicas, en primer lugar, es necesario encontrar un vector que atraviese la barrera hematoencefálica y genere una expresión prolongada en el tiempo del gen introducido (Vashi & Justice, 2019). Uno de los problemas de usar el gen de MeCP2 como diana es la sobrecompensación, ya que una dosis de MeCP2 demasiado elevada lleva a problemas del neurodesarrollo, como malformación

del tubo neural, o los síntomas asociados al síndrome de duplicación de MECP2 (Petazzi et al., 2014; Van Esch et al., 2005b). Cabe destacar que este año ha comenzado el primer ensayo clínico de terapia génica dirigida a pacientes RTT, utilizando un vector de expresión de MeCP2 autorregulado, usando un vector viral con inyección intracerebroventricular (Prasad, 2022; Taysha Gene Therapies, n.d.).

Dirigir el tratamiento a las rutas reguladas por MeCP2 es a día de hoy la forma más factible de tratar el RTT. Hay aproximadamente 70 fármacos en ensayos clínicos y preclínicos que utilizan fármacos reposicionados o nuevos con el fin de tratar síntomas o moléculas diana que se superponen con otros desórdenes (Gogliotti & Niswender, 2019; Gomathi et al., 2020).

Las estrategias de señalización de factores de crecimiento buscan aumentar los niveles de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), una de las dianas principales de MeCP2, esencial para la maduración neuronal adecuada. Se están explorando alternativas al uso de BDNF, como compuestos sintéticos o la administración de factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) (Vashi & Justice, 2019). En este sentido cabe destacar el ensayo usando “Trofinetide”, el primer fármaco aprobado por la FDA para RTT, que consiste en un tripéptido sintético que ha demostrado mejorar los síntomas, a pesar de no tener un mecanismo de acción definido (Harris, 2023; Neul et al., 2023). Además de estos, se ha visto que los genes *fbp5* y *dlx6* están subexpresados, mientras que las proteínas GAMT, IGF2, MPP1 y FXYP, están sobreexpresados en RTT, y tienen un efecto patológico, de forma que podrían ser dianas terapéuticas (Ehrhart et al., 2016). También se han explorado formas de contrarrestar la desestabilización del citoesqueleto en neuronas con mutaciones RTT, principalmente promoviendo vías de acetilación de tubulina, mejorando así la estabilidad del citoesqueleto y el tráfico intracelular (Lebrun et al., 2021).

Otro enfoque diferente a los anteriores es la recuperación de la actividad de MeCP2 mediante el uso de chaperonas farmacológicas (K. L. Ho et al., 2008a).

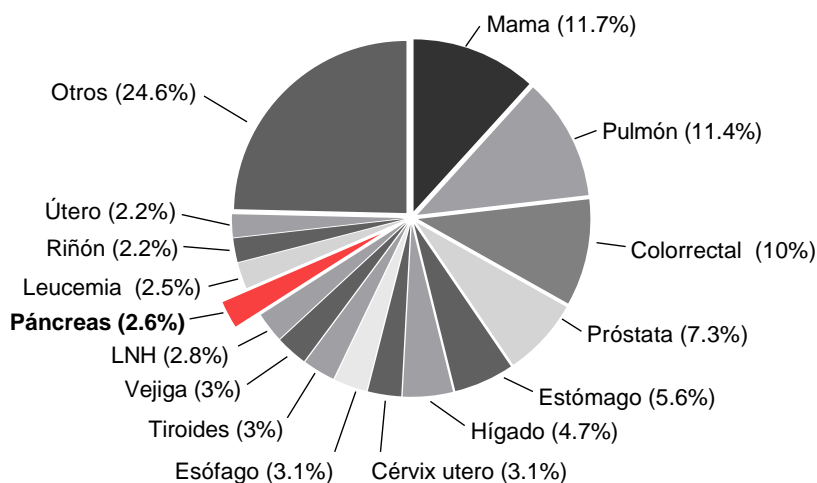
El objetivo de estas chaperonas sería, recuperar la actividad de la proteína aberrante mediante fármacos que sean capaces de unirse a una configuración nativa, desplazando el equilibrio conformacional de las variantes mutadas (cuya estructura induce una reducción de la estabilidad y un deterioro en la unión a *partners* biológicos) hacia una configuración más similar a la nativa (estructural y funcionalmente). Estas chaperonas no solo estabilizarían la conformación nativa de la proteína defectuosa, sino que pueden conferir protección contra la agregación, la degradación y el tráfico inadecuado. Esta estrategia se ha empleado con éxito para la p53 (Pozzo-Miller et al., 2015) y la fenilalanina hidroxilasa (Conde-Giménez et al., 2022).

1.6 Adenocarcinoma pancreático ductal.

El cáncer de páncreas es el 12º cáncer más frecuente en todo el mundo y la 7ª causa de muerte por cáncer en los países industrializados según el GLOBOCAN (*global cancer observatory*, gco.iarc.fr) de la Organización Mundial de la Salud (**Figura 1.7**). A menudo se diagnostica en fases tardías debido a la ausencia de síntomas tempranos, lo que da lugar a opciones de tratamiento limitadas y a un mal pronóstico. La ausencia de biomarcadores para su detección precoz contribuye a su elevada tasa de mortalidad. Se prevé que en 2030 se convierta en la segunda causa de muerte relacionada con el cáncer, superando al cáncer de mama, próstata y colorrectal. La enfermedad se inicia y progresa debido a cambios genéticos, epigenéticos, moleculares y morfológicos en las células ductales pancreáticas (Rahib et al., 2014).

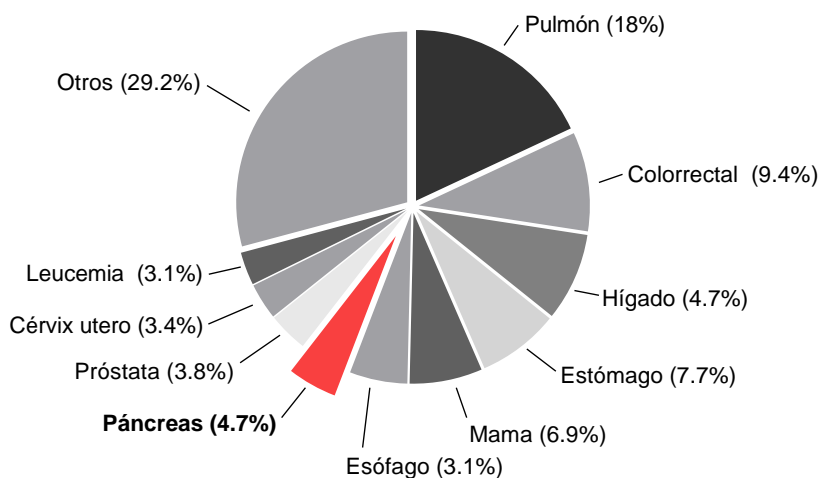
El desarrollo del cáncer de páncreas implica la progresión de la hiperplasia a la displasia y finalmente al estado maligno (Hruban et al., 2001). El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es el tipo más común de cáncer de páncreas, representando el 95% de los casos. Se origina en las glándulas exocrinas del páncreas, pero, en determinadas condiciones, las células acinares pueden sufrir una transformación denominada metaplasia acinar-ductal. El PDAC es muy metastásico y suele haberse extendido al hígado y a los ganglios linfáticos en el momento del diagnóstico (Ramakrishnan, 2017).

Incidencia GLOBOCAN 2020



Total: 19 292 789

Mortalidad GLOBOCAN 2020



Total: 9 958 133

Figura 1.7. Incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer (GLOBOCAN, de la Organización mundial de la Salud (gco.iarc.fr). Destacado el cáncer de páncreas.

Según datos epidemiológicos, menos del 20% de los casos sobreviven un año y la tasa de supervivencia a cinco años se mantiene en torno al 5-7%. La resección quirúrgica con márgenes claros es la única opción potencialmente curativa del cáncer de páncreas. Debido al diagnóstico tardío, menos del 20% de los pacientes tienen tumores que puedan ser extirpados quirúrgicamente en el momento del diagnóstico (Sohn et al., 2000).

Los síntomas asociados al PDAC, como la pérdida de peso y masa muscular, el dolor y la ictericia, son inespecíficos y suelen manifestarse en etapas avanzadas de la enfermedad. Estos síntomas pueden estar relacionados con cambios metabólicos sistémicos, señales patógenas producidas por el tumor, alteraciones en la función pancreática y la cercanía física entre el páncreas y el intestino (Kordes et al., 2021).

Existen varias lesiones precursoras del PDAC, como la neoplasia pancreática intraepitelial (PanIN), la neoplasia quística mucinosa (MCN), las neoplasias tubulopapilares intraductales (ITPN) y las neoplasias mucinosas papilares intraductales (IPMN). Estas lesiones precancerosas pueden clasificarse en bajo o alto grado. Entre ellas, las PanIN son las más comunes como precursoras del cáncer de páncreas (Basturk et al., 2015).

Las mutaciones genéticas que aparecen en casos de PDAC son muy diversas y afectan a las vías moleculares centrales, incluyendo la reparación del DNA, el procesamiento del RNA y la regulación del ciclo celular y la cromatina, siendo *kras*, *smad4*, *tp53* y *cdkn2a* los cuatro genes más frecuentemente alterados en PDAC (Ryan et al., 2014). El gen *kras* es el más frecuentemente mutado en PDAC (95%) y juega un papel central en el crecimiento y supervivencia de las células cancerosas de PDAC (Bryant et al., 2014). En un análisis genómico y transcriptómico se identificaron hasta 32 genes mutados de forma recurrente y definió cuatro subtipos con diferencias en la evolución a nivel molecular de la enfermedad: tumor escamoso, progenitor, inmunogénico, y tumores endocrinos exocrinos aberrantemente diferenciados (denominados ADEX) (Waddell et al.,

2015). Otros estudios demostraron alteraciones genéticas frecuentes en vías de señalización clave, como la señalización Notch, la remodelación de la cromatina, la reparación del DNA, el ciclo celular, el procesamiento del RNA, la señalización WNT y TGF- β , y la activación de KRAS. A pesar de este conocimiento, las opciones terapéuticas son limitadas, ya que solo el 1% de los pacientes reciben un tratamiento adecuado a los resultados de secuenciación (Lowery et al., 2017).

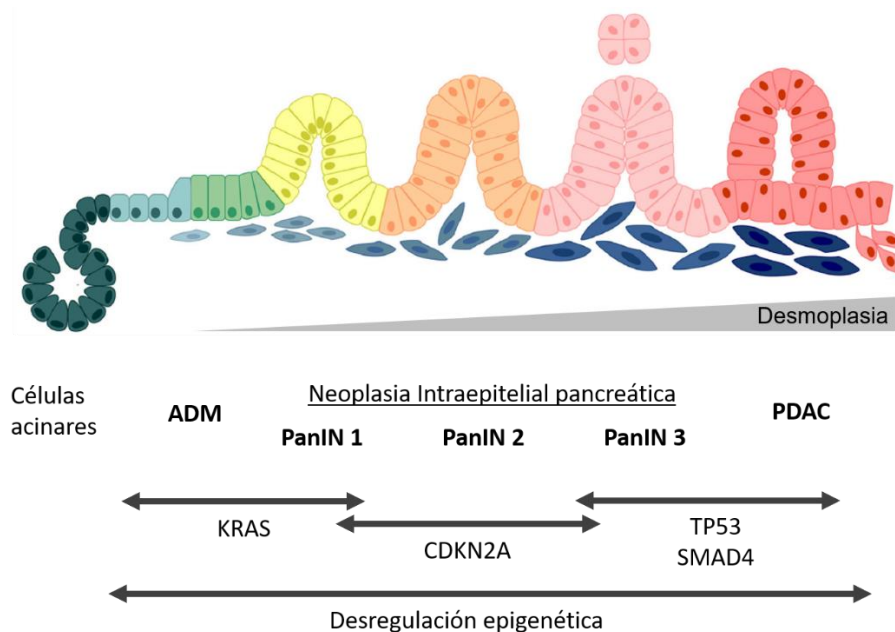


Figura 1.9. Fases del desarrollo de PDAC. Desde células acinares normales, pasando por metaplasia acinar-ductal (ADM) y neoplasia intraepitelial (PanIN) hasta el adenocarcinoma pancreático ductal. Variaciones (epi)genéticas asociadas más habituales. Adaptado de (Orth et al., 2019).

Además, la amplia heterogeneidad de las mutaciones genéticas y el denso microambiente estromal hacen del PDAC uno de los cánceres más resistentes a los fármacos. Aunque las modificaciones genéticas están bien definidas en el PDAC, sólo recientemente se ha reconocido el papel de las regulaciones epigenéticas, que aseguran una respuesta dinámica a los estímulos ambientales. Permiten cambios reversibles en la expresión génica que son responsables del inicio y la progresión tumoral, y de la huida de la vigilancia inmunológica o la resistencia a fármacos. Por otra parte, su reversibilidad ofrece una oportunidad

para su tratamiento farmacológico. Únicamente una comprensión profunda de los paisajes epigenéticos que impulsan el PDAC, sus interacciones con los cambios genéticos, y las influencias del sistema inmune allanará el camino para el descubrimiento de nuevos marcadores y guiará el desarrollo de terapias combinadas para el tratamiento personalizado (McGranahan & Swanton, 2017).

1.6.1 Paisaje epigenético de PDAC.

Se han observado alteraciones en el paisaje epigenético en lesiones tempranas asociadas a PDAC. Hay una sobreexpresión de DNMT1 en el 80% de los carcinomas pancreáticos, que produce una hipermetilación de promotores de genes supresores tumorales clave como *p16*, *penk* y *rassf1* y *cdkn2a*, y está relacionada con la potencialidad de los tumores. En un estudio más amplio se vio que casi 100 genes son silenciados recurrentemente por metilación del DNA, incluyendo *zpf82*, *papr6* y *dnajc15*. Además, varios estudios sobre PDAC han informado de un aumento de la 5-hmC tanto a nivel global como en genes potenciadores de oncogenes clave como *myc*, *kras*, *vegfa* y *brd4*. Por lo tanto, se cree que la 5-hmC juega un importante papel regulador en la patogénesis y progresión del PDAC. La pérdida de 5hmC debido a una expresión reducida de TET2 puede resultar en un PDAC de tipo escamoso, y mejorar la estabilidad de TET2 restablece los niveles de 5-hmC y GATA6 y revierte el fenotipo al subtipo clásico que muestra respuestas al tratamiento más favorables. Se ha observado también una hipometilación general que, además de la inestabilidad que genera, produce una sobreexpresión de los genes *serpinb5*, *cldn4*, *sfn*, *lcn2*, *tff2* y *s100p*, que a su vez provocan alteraciones en la progresión del ciclo celular, la proliferación, la diferenciación o la adhesión (Ciernikova et al., 2020).

Los estudios en muestras de autopsias humanas han mostrado alteraciones globales en las histonas comparando estado de metástasis con los tumores primarios, lo que sugiere que las alteraciones epigenéticas pueden desempeñar un papel en su evolución. Estas alteraciones epigenéticas también se han observado en lesiones precancerosas PanIN e IPMN. Los análisis integrados de estos datos sugieren que probablemente existan 2 subtipos transcripcionales

distintos de PDAC, denominados clásico y basal, con un fenotipo basal enriquecido en metástasis y correlacionado con un peor pronóstico. Los tumores clásicos están enriquecidos en programas transcriptómicos de linaje epitelial y pancreático, mientras que los tumores basales están enriquecidos para la transición epitelial a mesenquimal, la progresión del ciclo celular y la señalización del TGF- β (Wood et al., 2022).

Las HDACs pueden mediar la tumorigénesis y su actividad se asocia con malos resultados en pacientes con PDAC. Los datos de ChIP-seq revelan el aumento de los niveles de la marca H3K27me3 y la pérdida de H3K4me3 en genes específicos están asociados con la metaplasia acinar-ductal, un proceso crucial en el desarrollo y progresión del PDAC (Benitz et al., 2019). La ausencia de KDM6A, una enzima desmetilasa de H3K27me3, en un modelo de ratón de PDAC induce una forma agresiva y metastásica similar al subtipo escamoso, que se relaciona con la activación de *enhancers* marcados por H3K27ac y que regulan genes como *$\Delta np63$* , *myc* y *runx3* (Andricovich et al., 2018). EZH2, componente clave del complejo represor PRC2, es responsable de la generación de H3K27me3. Se ha observado una sobreexpresión de EZH2 en el núcleo de células de PDAC y en el 68% de los casos de PDAC, y la reducción de EZH2 disminuye la proliferación celular y favorece un subtipo de PDAC más sensible a la quimioterapia y menos agresivo, posiblemente mediante el aumento de la expresión de GATA6 (Patil et al., 2020).

1.6.2 Epigenética de la transición epitelio-mesenquimal en PDAC.

La transición epitelio-mesenquimal (EMT) es un proceso clínicamente relevante que regula la diseminación de las células tumorales a órganos distantes. En el caso PDAC, la metástasis temprana se debe a cambios dinámicos en la expresión génica que permiten a las células tumorales adquirir propiedades mesenquimales similares a las de los fibroblastos, lo que resulta en una mayor capacidad migratoria, invasión y resistencia a la terapia. La disminución de la expresión del gen CDH1, que codifica la glicoproteína E-

cadherina, es una de las causas principales de estos cambios y se observa en el 42-60% de los tumores PDAC. Esto implica una desdiferenciación de las células epiteliales y la pérdida de las uniones intercelulares, lo que aumenta la invasividad tumoral y el potencial metastásico. Se ha observado que la hipermetilación de la región promotora del gen CDH1 y su interacción con los factores de transcripción Slug, Snail y Twist1, que son inductores de la EMT, explican la disminución de su expresión. Además, los factores de transcripción FOXA1/2, que actúan como antagonistas de la EMT, también pueden ser silenciados mediante mecanismos epigenéticos, como la hipermetilación de sus promotores (Ciernikova et al., 2020).

1.6.3 Implicación de MeCP2 en PDAC.

En los últimos años, muchos estudios han relacionado a MeCP2 con diferentes tipos de cáncer, apareciendo sobreexpresada en muchos casos, identificándose como oncogen en casos de cáncer de mama, colon, estómago, hígado, próstata, pulmón, y riñón (revisado en Nejati-Koshki et al., 2023).

La sobreexpresión de MeCP2 en contexto de cáncer induce la expresión de factores de crecimiento reguladas por las vías de MAPK y PI3K/RAS, ya que MeCP2 actúa como sustituto de RAS activado y el silenciamiento del gen MECP2 produce una reducción de propagación de las células cancerosas (Neupane et al., 2016).

Hay poca información sobre el caso concreto de PDAC, donde no se ha descrito una sobreexpresión de MeCP2 (Vincent et al., 2011) pero se ha demostrado que MeCP2 tiene un efecto importante en la EMT. Hay un aumento mediado por MeCP2 de marcadores mesenquimales como vimentina, snail y n-cadherina, mientras disminuye marcadores epiteliales como E-Cadherina y ZO-1 induciendo así EMT. Este cambio parece ser el resultado de una retroalimentación positiva en la que MeCP2 se une al promotor de furina en complejo con SMAD3, aumentando su expresión. En este caso la furina actúa

como un activador de TGF- β 1, induciendo la fosforilación de SMAD2/3. En este estudio, el *knockdown* de MeCP2 reduce la capacidad proliferativa, invasión y migración de células tumorales xenografiadas en ratón (Wang et al., 2020).

1.6.4 Terapias para PDAC en la actualidad.

La alta tasa de mortalidad del PDAC se debe al diagnóstico tardío y a la resistencia a la quimioterapia. La cirugía es la opción principal para los tumores resectables, pero solo el 10-20% se diagnostica en etapas tempranas (Y. Zhang et al., 2018). Para los casos irresectables, se administra monoquimioterapia o terapia combinada, pero se ha observado resistencia, especialmente en gemcitabina, el fármaco de primera línea. La resistencia puede ser innata o adquirida, como los cambios genéticos o epigenéticos en las células tumorales, que disminuyen la eficacia del tratamiento. Estas modificaciones pueden generar el microambiente tumoral denso, (TME por sus siglas en inglés) (W. J. Ho et al., 2020), compuesto por diferentes tipos de células y citocinas como interleucina-1, interleucina-6 y factor de crecimiento transformante-beta. Además, existe una red de vasos sanguíneos en una matriz extracelular rica, representando el 90% del volumen total del tumor (Amrutkar & Gladhaug, 2017; Gu et al., 2021; Perera & Bardeesy, 2015). Esta envoltura en tejido conectivo hiperplásico distorsiona la estructura pancreática, causando hiperplasia fibrosa y presionando los vasos sanguíneos locales, lo que lleva a la hipoxia (Gu et al., 2021; Liang et al., 2017). Los desafíos asociados con el tratamiento del PDAC en la actualidad han llevado a que las terapias evolucionen para ser más personalizadas para el paciente. El desarrollo de la medicina personalizada implica adaptar el régimen de tratamiento de un paciente para que se ajuste mejor a las características de su malignidad y puede ofrecer una nueva vía de tratamiento para los pacientes (Golan et al., 2014).

Actualmente, la quimioterapia es la forma principal de tratamiento para los tumores de PDAC irresectables. La gemcitabina es un fármaco utilizado en monoterapia o terapia combinada, junto con capecitabina o paclitaxel unido a

albúmina en nanopartículas (nab-paclitaxel), para tratar diferentes etapas del PDAC, incluyendo casos localmente avanzados, metastásicos y como terapia adyuvante en casos resectables. Sin embargo, el uso de gemcitabina como monoterapia muestra resultados desalentadores en términos de supervivencia sin progresión y supervivencia global (Sally et al., 2022). Otros fármacos como la capecitabina (Schellens, 2007), el nab-paclitaxel (De Vita et al., 2016) y la combinación de FOLFIRINOX (5-fluorouracil, ácido folínico, oxaliplatino e irinotecan) (Deyme et al., 2019) también se utilizan en el tratamiento del PDAC. Hay avances en aquellos casos de PDAC con mutaciones muy concretas conocidas, como es el caso de las neoplasias mutadas en los genes BRCA1/2, que son sensibles a inhibidores de PARP (*poly(ADP-ribose) polymerase*) (Hu & Guo, 2020). Sin embargo, las mutaciones más frecuentes en el PDAC, como las de CDKN2A, TP53 y SMAD4, no son actualmente abordables debido a las numerosas mutaciones puntuales, asociadas a los PDAC (S. Jones et al., 2008).

Las inmunoterapias que se están desarrollando se basan en la modulación del sistema inmune para mejorar la respuesta contra el cáncer (Bagchi et al., 2021), pero los inhibidores de puntos de control inmunológicos tienen éxito limitado en el PDAC debido al microambiente tumoral y las células mieloides que suprimen las células T (Faghfuri et al., 2015; Panni et al., 2019). PD-L1 se sobreexpresa en PDAC y su bloqueo solo tiene una eficacia mínima debido a la naturaleza no inmunogénica del tumor y la alta carga tumoral (Feng et al., 2017). Se están explorando terapias combinadas para mejorar la eficacia de los inhibidores de puntos de control inmunológicos en PDAC utilizando otras dianas como cFOXP3 (X. Wang et al., 2017) y CCL5 en terapias combinadas (X. Wang et al., 2020) con gran potencial terapéutico.

Otros ensayos clínicos investigan la efectividad de inmunoterapias basadas en anticuerpos monoclonales en monoterapia, usando pares de anticuerpos (Maron et al., 2019; Michaels et al., 2018), o en combinación junto a quimioterapia convencional.

Como las modificaciones epigenéticas desempeñan un papel clave en el desarrollo PDAC y en la transición del tumor a la metástasis, se han generado estrategias basadas en la regulación epigenética, como los inhibidores de las metiltransferasa de DNA (DNMTi) o los inhibidores de las desacetilasas de histona (HDACi).

Los DNMTi, como la azacitidina y la decitabina, se incorporan al DNA durante la replicación, consiguiendo una reducción de la metilación global. Estos inhibidores han mostrado beneficios clínicos en pacientes con síndromes mielodisplásicos (MDS) y leucemia mieloide aguda (AML). (Stomper et al., 2021). En el PDAC, el tratamiento con azacitidina ha demostrado reducir la tumorigenicidad y mejorar la inhibición del crecimiento cuando se combina con gemcitabina (H. Becker et al., 2020).

Los HDACi restauran el equilibrio de acetilación de las histonas y han mostrado efectos antitumorales prometedores en el PDAC. Sin embargo, su eficacia clínica ha sido limitada y se han asociado con toxicidades hematológicas y gastrointestinales. Se están realizando estudios clínicos para evaluar la eficacia de los HDACi en combinación con otros agentes terapéuticos en el tratamiento del PDAC (Maietta et al., 2022).

En general, las terapias epigenéticas parecen prometedoras en el tratamiento del PDAC. Sin embargo, se necesita más investigación clínica para determinar su eficacia y establecer las combinaciones óptimas con otros agentes terapéuticos.

Teniendo en cuenta las alteraciones epigenéticas que ocurren en PDAC, el papel que tiene MeCP2 como lector de esas marcas y en el desarrollo de PDAC, así como la efectividad en la modulación del epigenoma, utilizar MeCP2 como diana terapéutica podría ser útil como parte del arsenal terapéutico contra este tipo de cáncer.

2. Hipótesis y objetivos

MeCP2 es una proteína multifuncional que desempeña un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del correcto funcionamiento del sistema nervioso y en otros tejidos es relevante en patogénesis. A pesar de que se ha estudiado en profundidad, aún se desconocen muchos aspectos relacionados con su función y sus mecanismos moleculares fisiológicos y patológicos, debido a su naturaleza como proteína intrínsecamente desordenada (IDP), que dificulta los estudios estructurales y le permite interactuar con una gran variedad de *partners* biológicos mediante reordenamientos conformacionales. Debido a su función en la arquitectura de cromatina como *linker* de nucleosomas, las histonas pueden ser potenciales *partners* biológicos no estudiados hasta el momento. Como lector epigenético, hay evidencias de que podría leer no solo la metilación del DNA, sino también otras marcas como la hidroximetilación del DNA y la metilación de histonas. Ya que está implicada en diversas patologías, MeCP2 se postula como una posible diana farmacológica.

Los objetivos de esta tesis doctoral son:

- 1- Caracterizar biofísicamente la estructura y estabilidad de MeCP2, y la contribución de los diferentes dominios (MBD, dominios desordenados flanqueantes, y dominios distales) a la estabilidad global de la proteína.
- 2- Caracterizar biofísicamente la interacción entre MeCP2 y el dsDNA. Elucidar las diferencias entre la interacción con el dsDNA sin metilar, metilado y/o hidroximetilado, y determinar la contribución de los diferentes dominios de la proteína en esta interacción.
- 3- Evaluar la capacidad de MeCP2 para interactuar con alguna de las histonas que conforman los nucleosomas, y si actúa como lector epigenético de la modificación postraduccional por trimetilación de H3. Determinar la contribución de los diferentes dominios en este proceso.

4- Estudiar los efectos deletéreos de mutaciones clínicamente relevantes asociadas al síndrome de Rett, en cuanto a la estructura de la proteína o la interacción con sus *partners*.

5- Identificar compuestos capaces de modular la actividad de MeCP2 con el fin de proponer candidatos a potenciales fármacos aplicables en síndrome de Rett y adenocarcinoma pancreático ductal.

De estos objetivos principales derivan objetivos secundarios. Del primer objetivo, “Caracterizar biofísicamente la estructura y estabilidad de MeCP2, y la

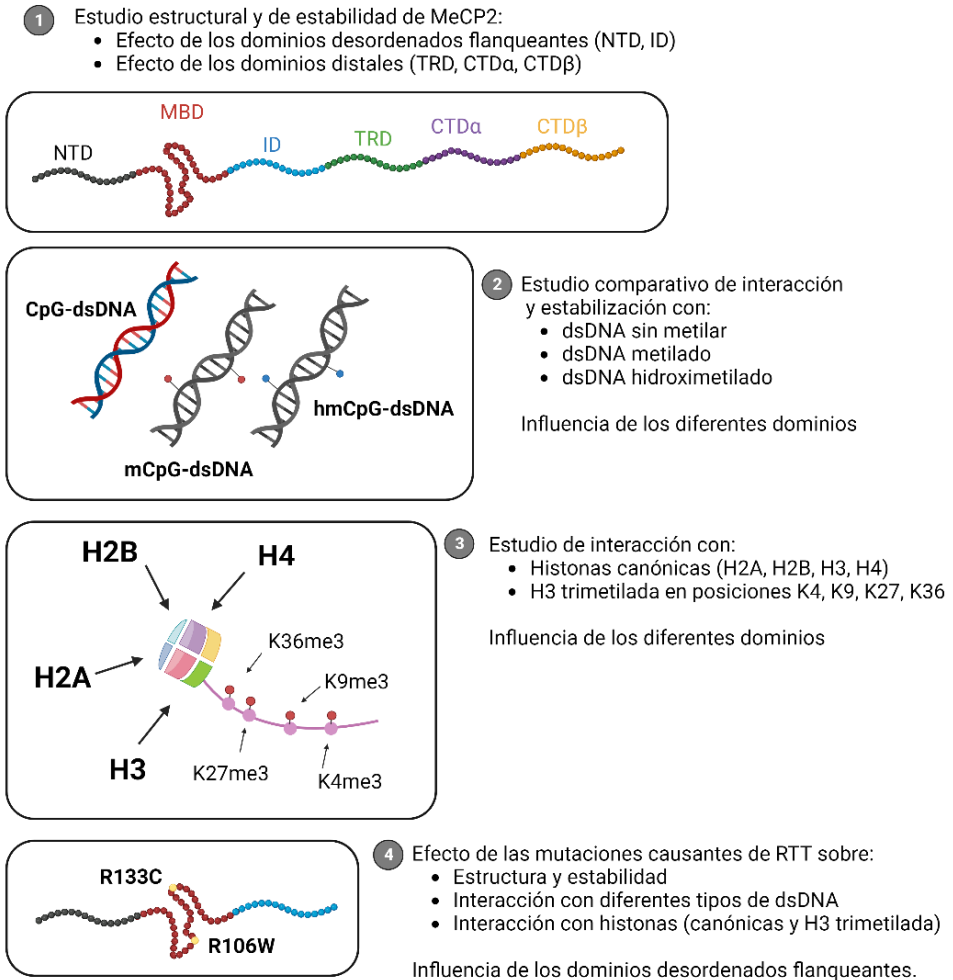


Figura 2.1 Representación esquemática de los objetivos 1- 4.

contribución de los diferentes dominios (MBD, dominios desordenados flanqueantes, y dominios distales) a la estabilidad global de la proteína” derivan los siguientes objetivos secundarios:

- Purificar mediante cromatografía de afinidad variantes truncadas de MeCP2 recombinante en *E. coli*, conteniendo los diferentes dominios funcionales.
- Obtener datos de estructura de cada variante mediante dicroísmo circular y medidas de fluorescencia; y medida de estabilidad mediante calorimetría diferencial de barrido y estudio fluorimétrico de desnaturalizaciones térmicas y químicas de las variantes.

Del segundo objetivo, “Caracterizar biofísicamente la interacción entre MeCP2 y el dsDNA. Elucidar las diferencias entre la interacción con el dsDNA sin metilar, metilado y/o hidroximetilado, y determinar la contribución de los diferentes dominios de la proteína en esta interacción” derivan los siguientes objetivos secundarios:

- Evaluar y comparar el efecto estabilizador causado por la unión a cada una de estas variantes de dsDNA (sin metilar, metilado o hidroximetilado) sobre las diferentes variantes truncadas de MeCP2 mediante desnaturalizaciones térmicas o químicas seguidas por fluorescencia, y calorimetría diferencial de barrido.
- Determinar los parámetros termodinámicos de interacción para cada una de estas variantes de dsDNA (sin metilar, metilado o hidroximetilado) con las variantes truncadas de MeCP2, mediante calorimetría de titulación isoterma.
- Estudiar el efecto estructural de la formación del complejo dsDNA:MeCP2 mediante dispersión dinámica de luz y dicroísmo circular.

Del tercer objetivo, “Determinar si MeCP2 es capaz de interaccionar con alguna de las histonas que conforman los nucleosomas, y si actúa como lector epigenético de la modificación postraduccional por trimetilación de H3. Determinar la contribución de los diferentes dominios en este proceso” derivan los siguientes objetivos secundarios:

- Purificar mediante cromatografía de intercambio iónico las cuatro histonas canónicas (H2A, H2B, H3, H4) recombinantes en *E. coli*.
- Diseñar y purificar mediante cromatografía de intercambio iónico los mutantes de H3 intermediarios para la trimetilación química: H3K4C, H3K9C, H3K27C, H3K36C recombinantes en *E. coli*.
- Optimizar el protocolo de metilación química para la generación de las variantes de H3 trimetilada: H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3, H3K36me3.
- Estudiar el efecto estructural de las mutaciones generadas y la trimetilación química sobre la H3 mediante dicroísmo circular.
- Obtener evidencias de la interacción de MeCP2 con las diferentes histonas canónicas y con las variantes trimetiladas de H3, y comparar los resultados mediante dicroísmo circular y calorimetría de titulación isoterma.
- Diseñar péptidos representativos de la cola de la histona H3 sin metilar y trimetilada y estudiar su interacción con MeCP2.
- Estudiar la formación de complejos ternarios MeCP2:dsDNA:H3 mediante calorimetría de titulación isoterma.

Del cuarto objetivo, “Estudiar los efectos deletéreos de mutaciones clínicamente relevantes para Síndrome de Rett, en cuanto a la estructura de la proteína o la interacción con sus partners” derivan los siguientes objetivos secundarios:

- Purificar constructos de MeCP2 recombinantes (MBD y NTD-MBD-ID) con las mutaciones relevantes de síndrome de Rett (R106W y R133C) en *E. coli* mediante cromatografía de afinidad.
- Caracterizar los efectos estructurales y sobre la estabilidad de la proteína mediante dicroísmo circular y el estudio fluorimétrico de la desnaturalización térmica.
- Determinar el efecto deletéreo de las mutaciones causantes de síndrome de Rett en la interacción de MeCP2 con el dsDNA sin metilar, metilado e

hidroximetilado, mediante la caracterización biofísica de la interacción por calorimetría de titulación isoterma.

- Determinar el efecto deletéreo de las mutaciones causantes de síndrome de Rett en la interacción de MeCP2 con las cuatro histonas canónicas por calorimetría de titulación isoterma.
- Determinar el efecto deletéreo de las mutaciones causantes de síndrome de Rett en la capacidad de MeCP2 de leer la marca epigenética de trimetilación de H3 mediante el estudio de la interacción de las variantes mutantes del MBD con las variantes trimetiladas de H3 por calorimetría de titulación isoterma.

Del quinto objetivo, “Identificar compuestos capaces de modular la actividad de MeCP2, con el fin de proponer candidatos a profármacos aplicables en Síndrome de Rett y adenocarcinoma pancreático ductal” derivan los siguientes objetivos secundarios:

- Llevar a cabo un cribado de alto rendimiento basado en TSA (*thermal shift assay*) para identificar compuestos capaces estabilizar o inhibir la formación del complejo MeCP2:dsDNA.
- Determinar el efecto de los compuestos estabilizadores del complejo (RAO y DOA) con las variantes de MeCP2 con mutaciones relevantes asociadas al síndrome de Rett.
- Seleccionar un modelo celular adecuado para los siguientes ensayos y estudiar la citotoxicidad de los compuestos en esas y otras líneas celulares no relacionadas.
- Para las líneas celulares linfoblastoides derivadas de pacientes: determinar el porcentaje de expresión de MeCP2 mutante y estudiar el efecto del tratamiento de los compuestos seleccionados sobre la unión de MeCP2 a los promotores de genes diana mediante ChIP (inmunoprecipitación de cromatina),
- Para las líneas celulares de precursores neuronales: definir diferencias entre la línea WT y la mutante (R133C) en las que nos vamos a centrar para los

siguientes estudios. Estudiar el efecto del tratamiento con los compuestos seleccionados en la unión de MeCP2 a los promotores seleccionados mediante ChIP, y su efecto sobre la expresión de dichos genes mediante RT-qPCR.

- Determinar la capacidad de unión de los compuestos inhibidores del complejo MeCP2:dsDNA a la proteína libre mediante calorimetría de titulación isoterma.
- Estudiar la toxicidad diferencial de los compuestos seleccionados en líneas celulares pancreáticas tumorales y no tumorales.

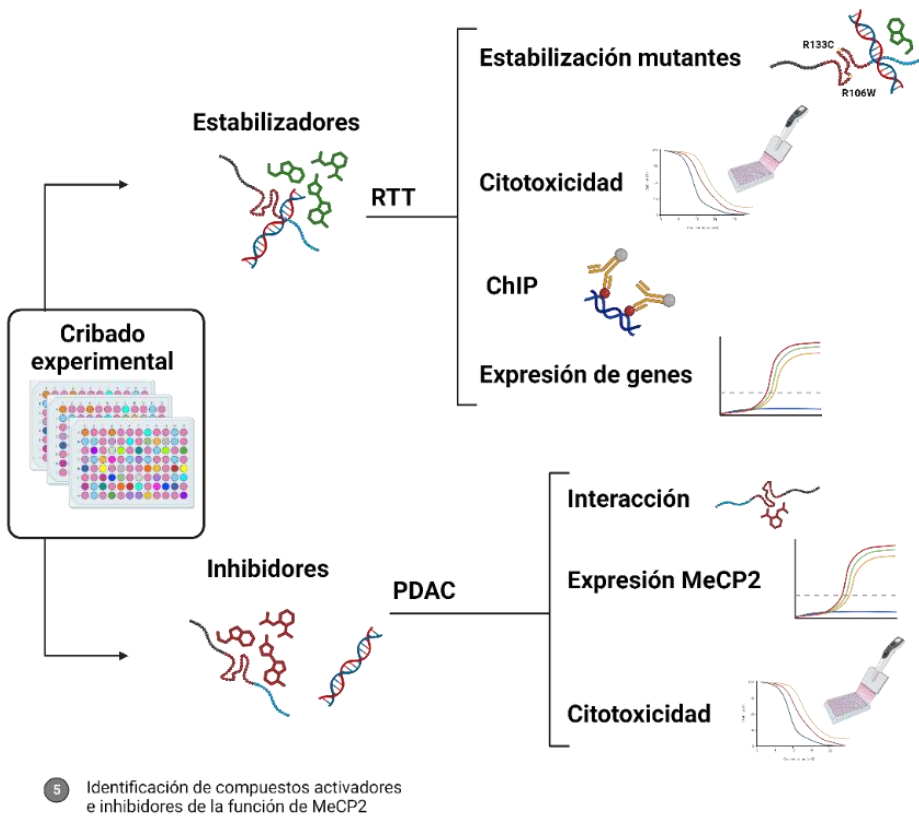


Figura 2.2 Representación esquemática del objetivo 5.

3. Materiales y métodos

3.1 Plásmidos

3.1.1 Construcciones MeCP2

Para obtener las diferentes construcciones de la proteína MeCP2 (isoforma E2), las diferentes secuencias fueron introducidas en un vector pET30b por GenScript (New Jersey, EEUU). Se comenzó con un plásmido correspondiente a la secuencia de la proteína completa (NTD-MBD-ID-TRD-CTD α -CTD β), con una cola de histidinas en el extremo N-terminal, seguido de una secuencia de corte para la Precision Protease.

Las construcciones truncadas (NTD-MBD-ID-TRD-CTD α , NTD-MBD-ID-TRD, NTD-MBD-ID, NTD-MBD), se obtuvieron añadiendo codones STOP en los lugares correspondientes.

Los plásmidos pET30b que contienen las secuencias para el MBD o el ID aislados fueron sintetizados *de novo* por GenScript, igualmente con una cola de histidinas en el extremo N-terminal, seguido de una secuencia de corte para la Precision Protease.

Las mutaciones asociadas al síndrome de Rett (R106W y R133C) fueron insertadas en los plásmidos que contenían las secuencias codificantes del MBD y la construcción NTD-MBD-ID mediante mutagénesis dirigida, por Mutagenex (Suwanee, EEUU).

3.1.2 Histonas y derivados

Los plásmidos pET11a que contienen las secuencias para las histonas H2A, H2B, H3, H4 y el mutante H3-K27C fueron amablemente cedidos por el Dr. Juan Ausió.

El plásmido pET11a con la secuencia de la histona H3K4C fue sintetizado y clonado por GenScript. Las secuencias para las histonas H3K9C y H3K36C se produjeron por mutagénesis dirigida por GenScript.

3.2 Expresión y purificación de proteínas

3.2.1 Transformación de bacterias competentes y expresión de proteína recombinante.

Los plásmidos que contienen las secuencias que codifican para todas las proteínas utilizadas en esta tesis fueron introducidos en bacterias *E. coli* BL21 (DE3) *Star* para su expresión. El protocolo para la transformación mediante choque térmico es el siguiente:

- 1- Añadir 100 ng de DNA plasmídico a una alícuota de 100 μ L de bacterias competentes
- 2- Incubar en hielo durante 30 minutos
- 3- **Choque térmico:** incubar a 42 °C durante 1 minuto
- 4- Incubar en hielo durante 2 minutos
- 5- Añadir 500 μ L de medio LB (20 g/L). Incubar en agitación (200 rpm) durante 2 h a 37 °C
- 6- Sembrar las células en una placa de LB/Agar con el antibiótico de selección (kanamicina 50 mg/mL para el plásmido pET30b; ampicilina 100 mg/mL para el plásmido pET11a)
- 7- Incubar durante la noche (O/N) a 37 °C
- 8- **Precultivo:** Las colonias transformadas se llevan a un matraz con 300 mL de medio LB con el antibiótico de selección. Incubar a 37 °C O/N (agitador orbital Barnstead Lab-Line MaxQ5000) a 180 rpm.

- 9- **Cultivo:** Inocular el cultivo diluyendo en él el precultivo con una relación 1:30.
- 10- **Incubar** en las mismas condiciones hasta que se alcance una OD₆₀₀ de 0.6-0.8 unidades de absorbancia en el caso de las construcciones de MeCP2, y 0.4-0.5 unidades de absorbancia en el caso de las histonas (espectrofotómetro Amersham Biosciences Ultrospec 6300 Pro).
- 11- **Inducción:** Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, la inducción de la expresión proteica se llevará a cabo con la adición de isopropil-β-D-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG, Sigma Aldrich) a una concentración de 1 mM. El tiempo y temperatura de inducción óptimos varía según las proteínas: Para todas las construcciones de MeCP2 la inducción se lleva a cabo a 18 °C O/N, mientras que la producción de histonas se induce a 37 °C durante 4h. Todo ello en agitación (180 rpm).
- 12- Recoger el pellet celular, centrifugando a temperatura ambiente durante 10 minutos a 10000 rpm (centrífuga Beckman Coulter Avanti J-26 XP, rotor JA-10) y transvasar a un tubo Falcon de 50 mL.
- 13- Congelar el pellet a -20 °C hasta su uso.

3.2.2 Purificación de construcciones de MeCP2

El pellet celular descongelado debe resuspenderse en *Binding Buffer* (fosfato de sodio 50 mM pH 7.4, 300 mM cloruro de sodio). Tras añadir 30 mg de lisozima, benzonasa (20 U/mL, Merck-Millipore) y un cóctel de inhibidores de proteasas (concentraciones finales: PMSF 100 μM, Sigma Aldrich; benzamidina 1 mM, Sigma Aldrich; and leupeptina 5 μM, Peptide Institute INC), las células deben lisarse por sonicación (Sonics Vibra-Cell Ultrasonic Liquid Processor). Después hay que centrifugar 3-4 veces a 20000 rpm a 4 °C durante 15 minutos (centrífuga Beckman Coulter Avanti J-26 XP, rotor JA-20) para eliminar los restos celulares.

El sobrenadante de esta centrifugación debe ser pasado por un filtro de 0.45 μm de tamaño de poro, para eliminar impurezas grandes, antes de llevar a cabo la cromatografía de afinidad por metal inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés) usando una columna HiTrap TALON (GE-Healthcare Life Sciences) equilibrada previamente usando Binding *Buffer*. Una vez la muestra ha sido cargada se llevan a cabo dos lavados en tampón con alta concentración de sal (fosfato de sodio 50 mM pH 7.4, 800 mM cloruro de sodio) para eliminar la contaminación por DNA, antes de llevar a cabo un gradiente de imidazol 10-150 mM para eluir la proteína pura. El proceso se lleva a cabo en un sistema ÄKTA FPLC Amersham Bioscience, y los datos fueron monitorizados utilizando el software de control del equipo UNICORN (GE-Healthcare Life Sciences).

La pureza de las fracciones eluidas se comprueba mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE). Las fracciones que contienen la proteína de interés se mezclan, y se lleva a cabo un cambio de tampón para eliminar el imidazol mediante diálisis. La proteína en el nuevo tampón (Tris 50 mM pH7) es cuantificada (ver apartado “3.2.4 Cuantificación de proteínas.”) y se digiere entonces utilizando Prescission Protease empleando una razón de 1:40, incubando O/N a 4 °C, para eliminar la cola de histidinas. El correcto corte se comprueba de nuevo utilizando electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, y se procede a un segundo paso de cromatografía para eliminar la cola de histidina y cualquier resto no procesado, así como la proteasa.

Para ello se equilibran dos columnas en serie: una columna de afinidad HiTrap TALON (GE-Healthcare Life Sciences) que capturará las colas de histidina y cualquier resto no procesado, y una columna de afinidad GST TALON (GE-Healthcare Life Sciences) que capturará la proteasa gracias a que la enzima está marcada con una etiqueta de GST, de forma que la proteína pura sale en el *flow-through*.

La ultrafiltración a través de membrana de tamaño de poro de 3 o 10 kDa (Millipore Amicon *centrifugal filter*) permite concentrar la proteína, así como cambiar el tampón cuando es necesario.

3.2.3 Purificación de histonas.

El protocolo de purificación de histonas se lleva a cabo a partir del pellet total, en condiciones desnaturalizantes, ya que en un proceso en condiciones nativas las histonas agregan formando cuerpos de inclusión tras la sonicación, obteniendo una mínima fracción en el sobrenadante.

El protocolo de purificación está adaptado del artículo de Klinker et al. (2014). Brevemente, al pellet celular obtenido a partir de 6 L de cultivo se le añaden 10 mL del tampón SA10X (400 mM acetato de sodio pH 5.2, 10 mM EDTA pH 8, 100 mM D/L metionina), 18 g de urea en polvo, 0.58 mg de cloruro de sodio, y agua hasta un volumen de 50 mL, añadiendo β -mercaptoetanol a una concentración final de 5 mM.

Una vez el pellet está completamente disuelto, se sonica en hielo hasta que la consistencia es completamente líquida y se centrifuga a 20000 rpm a 4 °C durante 30 minutos (centrífuga Beckman Coulter Avanti J-26 XP, rotor JA-20) para eliminar los restos celulares.

El sobrenadante de esta centrifugación debe ser pasado por un filtro de 0.45 μ m de tamaño de poro, para eliminar impurezas grandes, antes de llevar a cabo la cromatografía de intercambio iónico. Para ello se inyecta la muestra en dos columnas colocadas en serie equilibradas previamente usando tampón SAU200 (40 mM acetato de sodio pH 5.2, 6 M urea, 1 mM EDTA pH 8, 5 mM β -mercaptoetanol, 10 mM D/L metionina, 200 mM cloruro de sodio).

Debe colocarse la columna de intercambio aniónico (resina Q, GE-Healthcare Life Sciences) sobre la columna de intercambio catiónico (resina SP, GE-Healthcare Life Sciences), y trabajar todo el proceso a un flujo de 2 mL/min.

Después de inyectar la muestra, se retira la columna de intercambio aniónico (Q), y se hace un lavado de la columna de intercambio catiónico (SP) con un 10% del tampón de elución SAU (40 mM acetato de sodio pH 5.2, 6 M urea, 1 mM EDTA pH 8, 5 mM β -mercaptoetanol, 10 mM D/L metionina, 1 M cloruro de sodio) hasta que el valor de absorbancia a 280 nm medido vuelva al valor basal. La proteína se eluye mediante un gradiente de cloruro de sodio 100-1000 mM. La pureza de las fracciones eluidas se comprueba mediante electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE). Las fracciones que contienen la proteína de interés se mezclan, y se lleva a cabo el replegado de la proteína dializando frente a agua destilada.

3.2.4 Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de la concentración final de las proteínas purificadas se llevó a cabo mediante la medida de absorbancia ultravioleta a una longitud de onda de 280 nm, utilizando los coeficientes de extinción calculados mediante *ProtParam Tool* Expasy (<https://web.expasy.org/protparam>) a partir de su secuencia de aminoácidos. Los coeficientes de extinción están recogidos en la **tabla 3.1**. La potencial contaminación por DNA fue comprobada cada vez mediante el cociente de absorbancias a 260 y 280 nm.

La relación entre la absorción a 280 nm y el coeficiente de extinción está definido por la ecuación de Lambert-Beer (Luong et al., 2011; Swinehart, 1962):

$$A = \epsilon_{280} \times C \times l \quad (1)$$

donde A representa el valor de la absorbancia medida a una longitud de onda específica (en este caso, 280 nm), siendo ϵ_{280} el coeficiente de extinción molar de la proteína a 280 nm ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l es la longitud del paso óptico de la muestra (cm) y C es la concentración de proteína (M). Las mediciones de absorbancia a 280 nm se realizaron en un espectrofotómetro/fluorímetro DS-11 Series (DeNovix).

Tabla 3.1 Parámetros de las construcciones proteicas.

	Proteína	ϵ_{280} ($M^{-1}\cdot cm^{-1}$)	MW (Da)	
MeCP2	MBD	11460	9927	
	NTD-MBD	11460	17757	
	NTD-MBD-ID	11460	22420	
	NTD-MBD-ID-TRD	11460	33615	
	NTD-MBD-ID-TRD-CTD α	11460	39161	
	NTD-MBD-ID-TRD-CTD α -CTD β (proteína completa)	13075	53264	
	MBD (R106W)	16960	9957	
	MBD (R133C)	11460	9874	
	NTD-MBD-ID (R106W)	16960	22450	
	NTD-MBD-ID (R133C)	11460	22367	
	ID	0	4468	
	Histonas	H2A	4050	13960
		H2B	6070	13740
H3		4040	15273	
H4		5400	11236	
H3 K4C / K9C / K27C / K36C		4040	15330	
H3 K4me3 / K9me3 / K27me3 / K36me3		4040	15417	

3.3 Metilación química de histonas

La histona H3 trimetilada en las posiciones deseadas (K4, K9, K27 y K36) fue obtenida a partir de histonas dobles mutantes intermediarias del proceso: en primer lugar, hay que cambiar la cisteína presente en la proteína WT por una alanina (C111A) y en segundo lugar reemplazar la lisina en cada una de las posiciones indicadas por una cisteína. De esta forma podremos hacer una

reacción de alquilación sobre esa cisteína, obteniendo un análogo de la lisina trimetilada. Los plásmidos utilizados y los protocolos de transformación, expresión y purificación han sido detallados previamente.

El protocolo de trimetilación química fue adaptado del artículo de Simon et al. (2007), siendo brevemente:

- Disolver las histonas liofilizadas (5-10 mg) en 980 μL de tampón de alquilación (1 M HEPES 1 M pH 7.8, 4 M cloruro de guanidinio, 10 mM D/L metionina 10mM) y añadir 20 μL de ditioneitol (DTT) 1 M.
- Incubar a 37 °C durante 1 h.
- Añadir 100 mg de bromuro de (2-bromoetil)trimetilamonio (SIGMA #117196) y dejar que se disuelva durante la incubación de 2.5 h a 50 °C.
- Añadir 10 μL de DTT 1M.
- Incubar otras 2.5 h a 50 °C.
- Detener la reacción con 50 μL de β -mercaptoetanol 14.2 M.
- Separar las proteínas metiladas de los reactivos en una columna PD10 equilibrada en H₂O/ β -mercaptoetanol 3mM.

La correcta trimetilación se comprobó mediante la determinación de la masa exacta por MALDI-TOF, llevada a cabo por el Servicio de Proteómica de los Servicios Científico-Técnicos (SCT) del CIBA (Centro de Investigación Biomédica de Aragón, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud – Universidad de Zaragoza).

3.4 Péptidos derivados de H3

Los péptidos derivados de H3 se adquirieron a NZYTech (Lisboa, Portugal). Corresponden a la región de la cola de la histona H3 en torno a K27 con

secuencia TKAARKSAPAT, donde la K27 trimetilada es la segunda lisina. El extremo N-terminal está acetilado y el C-terminal está amidado para reducir las cargas electrostáticas, imitando lo que puede ocurrir en la estructura de la proteína.

3.5 Hibridación del DNA de doble hebra

Los oligonucleótidos de DNA correspondientes al promotor IV del gen de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) de ratón fueron producidos y purificados por IDT Technologies. Se obtuvieron en forma de oligonucleótidos de hebra simple de 45 bases, y fueron hibridados para obtener oligonucleótidos de doble hebra de 45 pares de bases (dsDNA) para los ensayos de interacción con MeCP2. Se utilizaron oligonucleótidos purificados mediante HPLC, mientras que para el cribado de alto rendimiento se utilizó DNA purificado por *desalting*.

Se utilizaron tres pares diferentes de oligonucleótidos, con la misma secuencia, pero con diferente modificación en la cisteína central: sin metilación, metilados o hidroximetilados, cuya secuencia se detalla en la tabla 3.2.

Los oligonucleótidos se disolvieron en agua destilada para obtener una concentración final de 0.5 mM, comprobado mediante absorbancia UV (espectrofotómetro DS-11 Series). Se mezclaron los pares de oligonucleótidos con una proporción equimolar y se hibridaron utilizando un termociclador Stratagene Mx3005P qPCR *real-time thermal cycler* (Agilent Technologies). El perfil térmico de la hibridación consiste en: 1- equilibrado a 25 °C durante 30 segundos, 2- aumento rápido de temperatura hasta 99 °C, 3- equilibrado a 99°C durante 30 segundos, y 4- enfriamiento progresivo hasta 25 °C a una velocidad de 1 °C/180 s.

La concentración final de oligonucleótido de doble hebra se calculó a partir de las concentraciones medidas por absorbancia UV a 260 nm de los oligonucleótidos de hebra simple según la ecuación 2:

$$\frac{1}{[\text{dsDNA}]} = \frac{1}{[\text{ssDNA}]_{\text{forw}}} + \frac{1}{[\text{ssDNA}]_{\text{rev}}} \quad (2)$$

donde [dsDNA] es la concentración final del DNA de doble cadena después de mezclar cantidades equimolares de los oligonucleótidos “forward” (for) y “reverse” (rev) disponibles en concentraciones *stock* [ssDNA]_{for} y [ssDNA]_{rev}, respectivamente.

3.6 Predicción de estructura

La predicción de la estructura secundaria de *MeCP2* se realizó mediante el servidor de predicción de la estructura secundaria de proteínas PSIPRED (bio.tools/psipred) introduciendo la secuencia aminoacídica de MeCP2. Los modelos de las estructuras tridimensionales de MeCP2 completa, el dominio MBD en solución y H3 en solución se obtuvieron del repositorio AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk>).

3.7 Dicroísmo circular

El dicroísmo circular (DC) es una técnica espectroscópica basada en la absorción diferencial de luz polarizada circularmente a izquierda y derecha. La espectroscopía DC se utiliza para estudiar moléculas quirales de todo tipo y tamaño. Una de las aplicaciones más importantes del DC es analizar la estructura secundaria u otras propiedades específicas (por ejemplo, microambiente de los residuos aromáticos) de la conformación de macromoléculas, concretamente proteínas. La señal de DC nos permite determinar cómo cambia la estructura secundaria de las proteínas con las condiciones ambientales o al interactuar con otras moléculas.

Los espectros de DC se registraron en un espectrómetro Chirascan (*Applied Photophysics*) termostatzado, utilizando una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de longitud de paso óptico (Hellma) con un ancho de banda de 1 nm, una resolución espectral de 0.5 nm y un tiempo de respuesta de 5 s. La temperatura se controló mediante una unidad Peltier y se monitorizó utilizando una sonda de

temperatura. La concentración de proteína se fijó en 7 μM para todas las proteínas. En el caso de espectros de combinación de proteínas, se utilizaron cantidades equimolares de ambas. Para la seguridad de los componentes ópticos y la calidad del escaneo se purgó el oxígeno del espectrómetro mediante un flujo de nitrógeno durante 20 minutos previos a las medidas.

Los espectros experimentales se corrigieron según la línea base (sustracción de la señal del tampón) y se normalizaron según la concentración para calcular la elipticidad media por residuo $[\Theta]$ (mdeg $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$) según la ecuación 3:

$$[\Theta] = \frac{\theta}{10 c l N} \quad (3)$$

donde Θ es la elipticidad cruda medida (mdeg), c es la concentración de proteína usada (M), l es la longitud del paso óptico (cm) y N es el número de residuos de aminoácidos de la proteína. En los espectros con diferentes especies, se muestra la señal en valores de elipticidad Θ (mdeg).

3.8 Espectroscopía de fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica ampliamente extendida en los estudios estructurales de proteínas. El triptófano (Trp) es un aminoácido aromático que absorbe radiación de longitud de onda de 280 nm. Presenta buenas propiedades intrínsecas de fluorescencia que están extremadamente influenciadas por su entorno, lo que nos permite seguir los cambios en la estructura de las proteínas o el efecto de su interacción con otras biomoléculas monitorizando la emisión de fluorescencia del triptófano. Las técnicas de espectroscopía de fluorescencia son muy adecuadas para seguir el plegamiento o desplegamiento de proteínas, o el equilibrio de interacción de proteínas. La fluorescencia del triptófano se reduce cuando se expone al disolvente: normalmente suele experimentar una reducción de intensidad y un desplazamiento de la longitud de onda del máximo del espectro hacia longitudes de onda mayores (*red-shift*). Esta técnica tiene una limitación evidente: debe

haber al menos un residuo de triptófano en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Y si hay demasiados residuos triptófanos la interpretación de los resultados puede ser problemática.

Los espectros de fluorescencia se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Varian) utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud de paso (Hellma). Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron de 300 a 400 nm utilizando una longitud de onda de excitación de 290 nm (para evitar excitar residuos de tirosina) y un ancho de banda de 5 nm. La concentración de proteína se fijó en 5 μM .

3.7 Desnaturalización térmica o química seguida por fluorescencia

Los estudios de desplegamiento térmico se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse (Varian) utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud de paso (Hellma Analytics, Müllheim, Germany). La temperatura se controló mediante una unidad Peltier y se monitorizó con una sonda de temperatura. Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron de 300 a 400 nm utilizando una longitud de onda de excitación de 290 nm y un ancho de banda de 5 nm. La concentración de proteína se fijó en 5 μM .

Los ensayos de estabilidad térmica se realizaron a una velocidad de aumento de temperatura de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y a la longitud de onda de máximo cambio espectral (determinada previamente). Los experimentos de desplegamiento térmico se analizaron considerando un modelo de desplegamiento de dos estados (una única transición), proporcionando la temperatura de desplegamiento, T_m , y la entalpía de desplegamiento, $\Delta H(T_m)$. El efecto estabilizador ejercido por la interacción con DNA de doble hebra (dsDNA) se evaluó realizando desnaturalizaciones térmicas de las diferentes proteínas (a 5 μM) en presencia de DNA metilado, no metilado o hidroximetilado (a 10 μM) en las mismas condiciones.

Los datos y espectros experimentales se analizaron modelo de desplegamiento en dos estados:

$$F = \frac{(A_N + B_N T) + (A_U + B_U T) \exp\left(-\frac{\Delta G(T)}{RT}\right)}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta G(T)}{RT}\right)} \quad (4)$$

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_m) \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) + \Delta C_P \left(T - T_m - T \ln \frac{T}{T_m}\right)$$

o tres estados para la proteína completa en presencia de dsDNA hidroximetilado:

$$F = \frac{(A_N + B_N T) + (A_I + B_I T) \exp\left(-\frac{\Delta G_1(T)}{RT}\right) + (A_U + B_U T) \exp\left(-\frac{\Delta G_1(T) + \Delta G_2(T)}{RT}\right)}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta G_1(T)}{RT}\right) + \exp\left(-\frac{\Delta G_1(T) + \Delta G_2(T)}{RT}\right)} \quad (5)$$

$$\Delta G_i(T) = \Delta H_i(T_{m,i}) \left(1 - \frac{T}{T_{m,i}}\right) + \Delta C_{P,i} \left(T - T_{m,i} - T \ln \frac{T}{T_{m,i}}\right)$$

donde F es la señal de fluorescencia, R es la constante de gases ideales, T es la temperatura, T_{mi} es la temperatura de desplegamiento de la transición i, $\Delta H_i(T_{mi})$ es la entalpía de desplegamiento de la transición i, $\Delta C_{P,i}$ es la capacidad calorífica de desplegamiento de la transición i, y ΔG_i es la energía de estabilización de Gibbs de la transición i.

La intensidad de fluorescencia medida a cada temperatura (T) es una media de las contribuciones intrínsecas de cada especie conformacional de la proteína, como una suma ponderada en función de su fracción molar en cada temperatura. Los parámetros ajustables A_N , B_N , A_I , B_I , A_U , y B_U definen la señal de fluorescencia intrínseca de los diferentes estados conformacionales relevantes (N: nativo, I: intermedio, U: desplegado) y su dependencia lineal con la temperatura.

3.10 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La estabilidad térmica de las construcciones de MeCP2 (MBD y NTD-MBD-ID) se evaluó mediante el desplegamiento térmico controlado por calorimetría diferencial de barrido (DSC) de alta precisión. La capacidad calorífica molar parcial de la proteína en solución se midió en función de la temperatura en un Auto-PEAQ-DSC (MicroCal, Malvern-Panalytical, Malvern, Reino Unido). Los experimentos se realizaron con una solución de proteína a una concentración de 20 y 40 μM en tampón 50 mM Tris pH 7.0, y con un barrido de 15 a 95°C a una velocidad de barrido de 60 °C/h. Cuando fue necesario, el dsDNA sin metilar, metilado o hidroximetilado se añadió a una concentración final de 20 μM .

El primer enfoque en el análisis experimental DSC consistió en aplicar un análisis de datos genérico en ausencia de modelo para discriminar entre diferentes posibilidades: desplegamiento en dos estados, desplegamiento con número de estados mayor de dos, y desplegamiento de proteína oligomérica. A partir del termograma (capacidad calorífica molar de exceso de la proteína en función de la temperatura, ΔC_P vs. T) se estimaron la entalpía calorimétrica de desplegamiento, ΔH_{cal} , la temperatura de desplegamiento, T_m , y la capacidad calorífica máxima de desplegamiento, $C_{P,\text{max}}$, a partir de las cuales fue posible calcular la entalpía de van 't Hoff, ΔH_{vH} :

$$\Delta H_{\text{vH}} = \frac{4RT_m^2 C_{P,\text{max}}}{\Delta H_{\text{cal}}} \quad (6)$$

De la relación $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}}$ pueden surgir diferentes posibilidades: 1) si $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}} = 1$, el termograma reflejaría una única transición y la proteína se despliega según un modelo de dos estados (es decir, la proteína contiene un único dominio energético que se despliega cooperativamente); 2) si $\Delta H_{\text{vH}}/\Delta H_{\text{cal}} < 1$, el termograma reflejaría, al menos, dos transiciones (parcialmente) solapadas y la proteína se despliega según un modelo que no es de dos estados

(es decir, la proteína contiene, al menos, dos dominios que se despliegan de forma independiente no cooperativa); y 3) si $\Delta H_{vH}/\Delta H_{cal} > 1$, el termograma reflejaría una transición de desplegamiento acoplada a la disociación de subunidades (es decir, la proteína es oligomérica y se despliega en monómeros aislados según un proceso de elevada cooperatividad).

Una vez seleccionado el modelo de desplegamiento adecuado según el test de van't Hoff, el termograma se analizó mediante un análisis de ajuste de regresión no lineal considerando un conjunto de n transiciones independientes, cada una caracterizada por una temperatura de transición $T_{m,i}$, una entalpía de desplegamiento $\Delta H_i(T_{m,i})$, y una capacidad calorífica de desplegamiento $\Delta C_{P,i}$:

$$\langle \Delta C_P(T) \rangle = \sum_{i=1}^n \frac{K_i(T)}{(1+K_i(T))^2} \frac{\Delta H_i(T)^2}{RT^2}$$

$$K_i(T) = \exp(-\Delta G_i(T)/RT) \quad (7)$$

$$\Delta G_i(T) = \Delta H_i(T_{m,i}) \left(1 - \frac{T}{T_{m,i}}\right) + \Delta C_{P,i} \left(T - T_{m,i} - T \ln \frac{T}{T_{m,i}}\right)$$

donde K_i , ΔH_i y ΔG_i son la constante de equilibrio conformacional, la entalpía de desplegamiento, y la energía de estabilización de Gibbs de la transición conformacional i , respectivamente, R es la constante de los gases ideales, y T es la temperatura absoluta.

3.11 Estudio por fluorescencia de la desnaturalización química

La estabilidad química de MeCP2 MBD y NTD-MBD-ID se evaluó mediante espectroscopía de fluorescencia, utilizando urea ultrapura (urea cristalina de grado farmacéutico, PanReac, Alemania) como desnaturalizante caotrópico. La emisión de fluorescencia intrínseca del triptófano único en MeCP2 (W104) se monitorizó en un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse termostatzado (Varian-Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.) utilizando una concentración de proteína de 5 μ M, en una cubeta de cuarzo de 1 cm de longitud de paso (Hellma Analytics, Müllheim, Alemania).

Los experimentos se realizaron en 50 mM Tris pH 7.0, a 20 °C, con temperatura controlada por una unidad Peltier. Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron de 300 a 500 nm, utilizando una longitud de onda de excitación de 290 nm y un ancho de banda de 5 nm, a diferentes concentraciones de urea ([D] = 0-7 M, con incrementos de 0.25 M). Las muestras se equilibraron durante la noche a temperatura ambiente antes de las mediciones.

Considerar únicamente los estados nativo y desplegado de la proteína (modelo de dos estados) fue suficiente para reproducir las curvas de desnaturalización, y la inclusión de estados intermedios adicionales parcialmente desplegados fue perjudicial para la bondad del ajuste. Para el análisis cuantitativo se empleó la energía media de emisión espectral media $\langle E \rangle$ en función de la concentración de desnaturalizante, obtenida según la ecuación:

$$\langle E \rangle = \frac{\sum_i I_i / \lambda_i}{\sum_i I_i} \quad (8)$$

donde I_i es la intensidad de emisión de fluorescencia en el espectro a una determinada longitud de onda λ_i . Así, $\langle E \rangle$ es el valor medio espectral del inverso de la longitud de onda (una cantidad proporcional a la energía – frecuencia – en el espectro). El ajuste se llevó a cabo mediante la ecuación:

$$\begin{aligned} I([D]) &= \frac{1}{1+K([D])} I_N([D]) + \frac{K([D])}{1+K([D])} I_U([D]) \\ K([D]) &= \exp(-\Delta G([D])/RT) \\ \Delta G([D]) &= \Delta G_w([D]) - m[D] \\ I_i([D]) &= A_i + B_i[D] \end{aligned} \quad (9)$$

donde K , ΔG , ΔG_w , y m son la constante de equilibrio, la energía de estabilización de Gibbs en presencia y ausencia de desnaturalizante, respectivamente, y la susceptibilidad de la proteína al desnaturalizante, para la transición conformacional. Se ha asumido el modelo de extrapolación lineal (LEM) al especificar el efecto de la concentración de desnaturalizante [D] sobre

la energía de estabilización, y se ha considerado lineal la dependencia de la intensidad de fluorescencia intrínseca de cada estado conformacional de la proteína con la concentración de desnaturalizante.

3.12 Dispersión dinámica de luz (DLS).

Las mediciones de dispersión dinámica de luz (DLS) se realizaron en un DynaPro Plate Reader III (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA) utilizando una placa de 384 pocillos (Aurora Microplates, Whitefish, MT). La solución *stock* de urea (8 M) se diluyó en serie para obtener concentraciones desde 7 M a 0 M (en decrementos de 1 M), antes de añadir la proteína hasta una concentración final de 20 μ M. Todas las soluciones se filtraron utilizando membranas de 0.2 μ m de tamaño de poro y las soluciones de proteína se centrifugaron en microtubos durante 2 minutos a velocidad máxima para evitar que la precipitación de urea o los agregados de proteínas interfirieran en las mediciones DLS. Para cada medición se realizaron 10 adquisiciones de 3 segundos, y el radio hidrodinámico aparente se estimó a partir del coeficiente de difusión experimental, obtenido por el ajuste de cumulantes de la función de autocorrelación traslacional, asumiendo un modelo de esfera de Rayleigh. Los experimentos se realizaron en tampón 50 mM Tris pH 7.0, a 20 °C.

3.13 Calorimetría de titulación isoterma (ITC)

La interacción entre las diferentes construcciones de MeCP2, el DNA (sin metilar, metilado e hidroximetilado), las histonas (trimetiladas o no), los péptidos derivados de ellas, y los compuestos identificados en el cribado de alto rendimiento se ha estudiado utilizando un calorímetro de titulación isotérmica Auto-iTC200 de alta sensibilidad (MicroCal, Malvern-Panalytical, Reino Unido). Los experimentos se realizaron en diferentes tampones: 50 mM Tris pH 7; 50 mM PIPES, pH 7; 50 mM fosfato, pH 7; y 50 mM HEPES, pH 7. La fuerza iónica se controló mediante la concentración de cloruro sódico (0-150mM). La solución de proteína en la célula calorimétrica a 3-5 μ M se tituló con ligando (DNA, histonas...) a 50 μ M en la jeringa de inyección. Se programó una secuencia de 19 inyecciones de 2 μ L de solución valorante espaciadas

uniformemente por 150 s con una velocidad de agitación de 750 rpm y una potencia térmica de referencia de 10 μ cal/s.

La constante de asociación, K_B , y la entalpía aparente de unión, $\Delta H_{B,obs}$, se estimaron mediante análisis de datos de regresión no lineal por mínimos cuadrados de los datos experimentales empleando un modelo de sitio de unión de ligando único (estequiometría 1:1 proteína:dsDNA) para MBD o ID interactuando con DNA, H2A, H2B, H3 (y versiones trimetiladas) y compuestos ADO, o un modelo de sitios de unión de dos ligandos (estequiometría 1:2 proteína:dsDNA) para NTD-MBD-ID o proteína completa interactuando con DNA o H3, empleando rutinas de ajuste definidas por el usuario implementadas en Origin (OriginLab, Northampton, MA):

$$\begin{aligned}
 [P]_{T,j} &= [P]_0 \left(1 - \frac{v_{inj}}{V_0}\right)^j, [L]_{T,j} = [L]_0 \left(1 - \left(1 - \frac{v_{inj}}{V_0}\right)^j\right) \\
 [PL_i]_j &= [P]_{T,j} \frac{K_{Bi}[L]_j}{1 + K_{Bi}[L]_j} \\
 [L]_{T,j} &= [L]_j + \sum_{i=1}^N [P]_{T,j} \frac{K_{Bi}[L]_j}{1 + K_{Bi}[L]_j} \\
 Q_j &= \frac{1}{v_{inj}[L]_0} \sum_{i=1}^N V_0 \Delta H_{B,obs,i} \left([PL_i]_j - [PL_i]_{j-1} \left(1 - \frac{v_{inj}}{V_0}\right) \right) + Q_d
 \end{aligned} \tag{10}$$

donde Q_j es el efecto calorífico normalizado por la concentración del ligando tras la inyección j , v_{inj} es el volumen de cada inyección, V_0 es el volumen de la célula, Q_d es el calor de inyección debido a cualquier fenómeno inespecífico (el llamado "calor de dilución", que contiene contribuciones de la mezcla de soluciones, la dilución del agente titulante, el equilibrado de temperaturas y concentraciones iónicas, etc.), P_iL es el complejo proteína:dsDNA en el que está ocupado el sitio de unión i , K_{Bi} es la constante de asociación para el complejo PL_i , $\Delta H_{B,obs,i}$ es la entalpía de unión para el complejo PL_i , $[P]_0$ es la concentración inicial de proteína en la célula, $[L]_0$ es la concentración de ligando en la jeringa, $[P]_{T,j}$ es la concentración total de proteína en la célula tras la inyección j , $[L]_{T,j}$ es la concentración total de ligando tras la inyección j , $[P]_j$ es la concentración de proteína libre tras la inyección j , y $[L]_j$ es la concentración

de ligando libre tras la inyección j . Estas ecuaciones son válidas para un único sitio de unión $N = 1$, y para dos sitios de unión $N = 2$. Una descripción detallada de estos modelos aplicados en ITC puede encontrarse en la bibliografía (Freire et al., 2009; Vega et al., 2015).

La constante de disociación K_d para cada sitio de unión se calculó como la inversa de K_B , y la energía Gibbs y la entropía de unión se calcularon aplicando relaciones estándar bien conocidas $-RT \ln K_B$, $\Delta G_B = \Delta H_B - T\Delta S_B$. La capacidad calorífica de unión, ΔC_{PB} , se determinó realizando titulaciones a diferentes temperaturas y estimando la derivada de la entalpía observada con la temperatura mediante regresión lineal en el gráfico de entalpía frente a temperatura.

La constante de unión K_B no se ve afectada por la posible ionización del tampón siempre que el pK_a del tampón esté próximo al pH experimental. Sin embargo, la entalpía de unión observada (y, por tanto, también la contribución entrópica) puede contener una contribución adicional procedente de la ionización del tampón. Por lo tanto, el tampón seleccionado podría afectar a la partición de la entalpía de Gibbs en sus contribuciones entálpica y entrópica. Las contribuciones extrínsecas del tampón (Claveria-Gimeno et al., 2019; Gómez & Freire, 1995a) pueden eliminarse estimando la entalpía de unión independiente del tampón, ΔH_B , según

$$\Delta H_{B,obs} = \Delta H_B + \Delta n_H \Delta H_{buffer} \quad (11)$$

donde Δn_H es el número de protones intercambiados entre el complejo proteína:dsDNA y la solución total al unirse el dsDNA, y ΔH_{buffer} es la entalpía de ionización del tampón seleccionado. Por lo tanto, se realizaron valoraciones en tampones con diferentes entalpías de ionización (Tris, 11.35 kcal/mol; PIPES, 2.67 kcal/mol; y fosfato, 0.86 kcal/mol, R. N. Goldberg et al., 2002) para estimar los parámetros termodinámicos independientes del tampón (ΔH and Δn_H) a partir de una regresión lineal utilizando la ecuación 10. Conociendo

la energía de Gibbs de unión y la entalpía de unión independiente del tampón, se puede calcular fácilmente la entropía de unión independiente del tampón. El parámetro Δn_H puede ser distinto de cero cuando la unión del ligando provoca cambios en la constante de disociación de protones de determinados residuos ionizables (en la proteína o en el ligando) como consecuencia de cambios en su microentorno al formarse el complejo.

3.14 Cribado de alto rendimiento y estudio de estabilización de mutantes

Para identificar ligandos capaces de estabilizar o inhibir la interacción del DNA con la proteína MeCP2, se llevó a cabo un cribado de alto rendimiento (HTS, *High Throughput Screening*) experimental basado en un ensayo de determinación del efecto estabilizador inducido por ligando frente a desnaturalización térmica (TSA, *Thermal Shift Assay*). Se llevaron a cabo dos procedimientos de cribado, uno con cada una de las construcciones proteicas: 1) la construcción con el MBD aislado, y 2) la construcción que contiene los dominios NTD-MBD-ID. Ambos cribados se llevaron a cabo en presencia de DNA de doble cadena (oligonucleótido conteniendo la secuencia del promotor IV del gen de BDNF), que fue adquirido en grado de pureza *desalting* de IDT Technologies e hibridado siguiendo el protocolo desarrollado previamente.

El TSA se realizó monitorizando la desnaturalización térmica del complejo MeCP2 (cada construcción) con dsDNA en presencia de la sonda fluorescente extrínseca SYPRO Orange (Invitrogen). Los experimentos de HTS se realizaron en un termociclador en tiempo real Stratagene Mx3005P qPCR (Agilent Technologies). Para ello, se dispensaron soluciones de proteína-dsDNA (50 μ L, concentraciones finales 10 μ M de MeCP2 y 10 μ M de DNA) en tampón 10 mM Tris, pH 7.0, y 5X SYPRO Orange en microplacas de 96 pocillos (96-Well PCR Plate, non skirted de 4titude). Los posibles ligandos (de las dos quimiotecas: Maybridge HitFinder Collection y Prestwick Chemical Library) disueltos en DMSO se añadieron a una concentración final de 400 μ M (Prestwick) o 160 μ M (HitFinder), y concentraciones finales de DMSO al 4%, a las microplacas que

contenían las soluciones de proteínas y se incubaron a 25 °C durante 30 minutos antes de cargarlas en el lector de microplacas.

En cada microplaca se realizaron experimentos de control intrínsecos en presencia y ausencia de DNA y en ausencia de ligandos, a la misma concentración de DMSO. La desnaturalización térmica se controló siguiendo el aumento de la intensidad de fluorescencia de la sonda SYPRO Orange asociado al desplegamiento de la proteína ($\lambda_{exc} = 492$ y $\lambda_{em} = 610$ nm, donde λ_{exc} es la longitud de onda de excitación y λ_{em} es la longitud de onda de emisión). Las curvas de desplegamiento se registraron de 25 a 95°C, a una velocidad de barrido de 1 °C/min. La temperatura de desplegamiento puede definirse como la temperatura de máxima pendiente en la curva de desplegamiento térmico (Velazquez-Campoy et al., 2016). Los "hits" estabilizadores se identificaron como aquellos compuestos que desplazaban la temperatura de máxima pendiente hacia temperaturas más altas, en comparación con los controles en presencia de proteína:dsDNA y DMSO, internos de cada microplaca. Aquellos compuestos que aumentaban los valores de T_m del complejo MeCP2:dsDNA por encima de 3 veces la SD de los valores de T_m determinados en los experimentos de control correspondientes (8 experimentos sin ligando añadido, con la misma concentración residual de DMSO, y realizados en la misma microplaca), es decir, $T_m(\text{hit}) > T_m(\text{control}) + 2 \times SD$, se consideraron potenciales positivos.

Los "hits" inhibidores se identificaron como los compuestos que desplazaban la temperatura de máxima pendiente hacia temperaturas más bajas que la de la proteína en ausencia de dsDNA, lejos de los valores de T_m del complejo.

Los compuestos identificados como estabilizadores se probaron posteriormente en presencia de MeCP2 con mutaciones asociadas a RTT para evaluar si ejercían el mismo efecto estabilizador sobre ellas utilizando las mismas condiciones experimentales.

3.15 Quimiotecas

Para el cribado molecular experimental se han empleado dos colecciones de compuestos químicos (quimiotecas) disponibles comercialmente: Prestwick Chemical Library (*Prestwick Chemical*) con 1120 fármacos aprobados por la *US Food and Drug Administration* (FDA) y *HitFinder* (*Maybridge*) con 10000 compuestos seleccionados por su alta diversidad química y farmacológica. Los compuestos se encuentran disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% a una concentración de 10 mM (Prestwick) o 4 mM (HitFinder).

3.16 Cultivo celular en suspensión

Las líneas celulares linfoblastoides derivadas de pacientes son propiedad del Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras. Fueron obtenidas a partir de muestras de sangre periférica de pacientes con síndrome de Rett con diferentes mutaciones, e individuos sanos. El análisis de las mutaciones fue caracterizado previamente por secuenciación directa del codón del gen *MECP2*.

Se aislaron células mononucleares sanguíneas (PBMCs) mediante la sedimentación con Ficol/Hypaque (Amershan) y se utilizó un protocolo estándar de infección de linfocitos B con el virus de Epstein-Barr para producir las líneas celulares linfoblastoides inmortalizadas.

En el estudio se utilizaron las líneas: HBL-26 proveniente de un donante sano, CNIO1, CNIO3 y CNIO10, provenientes de pacientes RTT con mutaciones de *MeCP2* R106W, T158M y R294X, respectivamente. El cultivo de estas líneas se llevó a cabo en medio completo compuesto por medio RPMI (Merck) suplementado con 10% SFB (suero fetal bovino), 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina a 37 °C bajo una atmósfera consistente en un 5% de CO₂. Las células crecieron en suspensión sin agitación.

El medio RPMI puede contener rojo fenol, un indicador de pH que vira el color del medio a consecuencia de los catabolitos que se generan durante el metabolismo celular y la acidificación del medio, lo cual sirve para controlar los cambios de medio necesarios para mantener la viabilidad de las células. Sin embargo, para realizar los ensayos de viabilidad conviene que no haya ninguna

sustancia en el medio que posea absorbancia en la región visible del espectro puesto que podría interferir en las medidas. En esos casos se usa RPMI sin rojo fenol. Para los pases y la expansión, hay que centrifugar el cultivo a 300 g durante 5 minutos para aspirar el sobrenadante, resuspender y diluir las células en el volumen deseado. Cuando fue necesario, las células se contaban diluyendo el cultivo con el reactivo Tripán Blue y contando las células usando una cámara de Neubauer.

Para comprobar el porcentaje de expresión de MeCP2 mutante (según el porcentaje de silenciamiento de cada cromosoma X), se purificó el RNA y se produjo DNAc (ver más adelante) y se secuenció en el Servicio de Genómica del Instituto Josep Carreras.

3.17 Cultivo celular Lunet, HACAT, MiaPaCa-2, PANC-1

Las líneas celulares epiteliales ductales pancreáticas MiaPaCa-2, PANC-1 (provenientes de tejido tumoral) y HPDE (con genotipo y fenotipo no tumoral) fueron cedidas por el grupo de la Dra. Meritxell Gironella, investigadora CIBERehd (IDIBAPS-Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona). La línea de queratinocitos HACAT fue cedida por el grupo del Dr. Pedro Baptista, investigador ARAID del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón. Se han empleado células Lunet, cedidas por Dr. V. Lohmann y Dr. R. Bartenschlager, investigadores de la Universidad de Heidelberg. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's modified Eagle's*; Gibco, Bélgica) suplementado con un 10% de SFB inactivado por calor (PAN-Biotech GmbH, Alemania), 1X aminoácidos no esenciales (Gibco), 100 UI/mL de penicilina (Gibco), 100 mg/mL de estreptomycin (Gibco) y 250 mg/mL de geneticina (G418; Gibco).

Las células Lunet, HACAT, MiaPaCa-2, PANC-1 utilizadas para la determinación de la citotoxicidad de los compuestos *in vitro*, se cultivaron en medio completo compuesto por DMEM (Merck) suplementado con 10% SFB, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomycin a 37 °C bajo una atmósfera

consistente en un 5% de CO₂. El medio DMEM puede contener rojo fenol, un indicador de pH que vira el color del medio a consecuencia de los catabolitos que se generan durante el metabolismo celular y la acidificación del medio, lo cual sirve para controlar los cambios de medio necesarios para mantener la viabilidad de las células. Sin embargo, para realizar los ensayos de viabilidad conviene que no haya ninguna sustancia en el medio que posea absorbancia en la región visible del espectro puesto que podría interferir en algunas medidas. En esos casos, se usa DMEM sin rojo fenol.

La línea HPDE (Human Pancreatic Duct Epithelium) se cultivó en medio KMSF (keratinocyte serum-free, Thermofisher #10724011) suplementado con el KERATINOCYTE SUP KIT (Thermofisher #37000015), a concentraciones finales de 200 ng/L de EGF (Epidermal Growth Factor), 30 mg/L de BPE (Bovine Pituitary Extract), y además con 1% penicilina/estreptomicina.

Para el subcultivo, las células se separaron utilizando tripsina, cuya acción es detenida añadiendo medio con suero fetal y se centrifugaron durante 5 minutos a 300 g (900 g para la línea HPDE). A continuación, se resuspendieron suavemente y se sembraron cada 3-5 días al alcanzar un 90% de confluencia.

3.18 Cultivo ReNCells

Las células ReNCells VM fueron cedidas por el grupo de la Dra. Sònia Guil, investigadora del Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras (Badalona). La línea celular mutante para MeCP2 (R133C) fue generada por el mismo grupo mediante CRISPR-Cas9.

El cultivo de ambas líneas celulares se llevó a cabo en placas tratadas con laminina (20 µg/mL, Sigma Aldrich), que se aspira suavemente antes de dispensar el medio conteniendo las células, para su correcta adhesión. El cultivo se realiza usando medio DMEM-F12 (L0093-500, Biowest, Nuaille, Francia), con 0.2% de heparina (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá), B-27 complete vitamins (17504-044, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y antibiótico/antimicótico (L0010-100, Biowest) a 37 °C con humedad máxima con una atmósfera de 5% de CO₂. Antes de cada uso, el medio debe completarse

con dos factores de crecimiento: FGF-2 (20 ng/mL, SRP4037) y EGF (20 ng/mL, SRP3027) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), para mantener el estado pluripotente y proliferativo de las células.

Para el subcultivo, las células se separaron con Accutase (SCR005, Sigma-Aldrich) y se centrifugaron durante 5 minutos a 300 g. A continuación, se resuspendieron suavemente y se sembraron tras el recuento celular. El medio se cambió cada dos días y el cultivo se realizaron pasajes cada 3-6 días cuando se alcanzaba el 90% de confluencia.

3.19 Ensayos de citotoxicidad.

La toxicidad de los compuestos ADO, DOA y RAO frente a los diferentes tipos celulares se determinó mediante el kit de viabilidad CellTiter 96 AQ One Solution Cell Proliferation Assay (Promega Corporation). Para ello, utilizando placas de 96 pocillos con todos los pocillos periféricos llenos de PBS para minimizar la evaporación, se sembraron 4000-6000 células/pocillo (según el tipo celular) excepto para HBL-26, para las que se sembraron 30000 células/pocillo en un volumen final de 100 μ L. Después de 24 h se añadieron diluciones seriadas de los compuestos (concentraciones entre 300 μ M y 0.7 nM, dependiendo el compuesto) en triplicados. Después de incubar con los compuestos durante 48 h en el incubador, se añadió 20 μ L del reactivo diluido 1:5 en medio del cultivo a cada pocillo. Después de una incubación de 90 minutos, el metabolismo celular se evaluó mediante la cuantificación de la conversión del sustrato añadido, midiendo la absorbancia a 490 nm.

La viabilidad celular se calculó utilizando como control positivo células sin tratar (sin añadir compuesto, con la misma proporción de DMSO), mientras que el control negativo (0% viabilidad) se obtiene del tratamiento con 1% DMSO.

Las curvas de citotoxicidad (representación del porcentaje de viabilidad frente a concentración de compuesto) se usaron para calcular los parámetros de toxicidad CC50 y CC95 mediante el ajuste con las funciones *Dose Response* y *Hill 1*, implementadas en el software GraphPad Prism 8. Las CC50 y CC95 se definen como la concentración de compuesto capaz de producir un 50% o 5%

de muerte celular. Para la representación resumida de los datos se ha utilizado la opción HeatMap del software GraphPad Prism.

3.17 Extracción de RNA y síntesis de DNAc.

Para los estudios de cambios en la expresión de genes tras el tratamiento de compuestos en las líneas celulares linfoblastoides (HBL-26 y CNIO10) y precursores neuronales ReNCells (WT y R133C), se sembraron $1.8 \cdot 10^6$ y $2 \cdot 10^6$ células, respectivamente para cada condición, en placas de 100 mm. Al día siguiente se trataron las células con los diferentes compuestos a las concentraciones determinadas según su CC95. Después de 48 h de tratamiento, se recogieron las células y se congelaron los pellets; para ello se trataron con Accutase las líneas de precursores neuronales para despegar las células y se recogió el pellet de celular por centrifugación (5 min, 300 g).

El ARN total se extrajo con el kit Maxwell RSC miRNA Tissue de Promega (AS1460, Promega, Madison, WI, EE.UU.), a partir de >1 millón de células aisladas, según el protocolo del fabricante. Para sintetizar DNA complementario (DNAc) monocatenario, se utilizó 1-3 μg de ARN total por reacción, utilizando el kit de transcripción inversa Revert Aid RT (#K1691, ThermoFisher Scientific) con una mezcla de hexámeros aleatorios y Oligo dTs RT-qPCR.

El DNAc sintetizado se diluyó hasta una concentración final de 4 ng/ μL , y 5 μL de las alícuotas se amplificaron con 6 μL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), y 416 nM de *primers* en un volumen final de 12 μL por reacción utilizando una placa de 384 pocillos. Todos los pares de *primers* se diseñaron con el programa Primer 3, abarcando diferentes exones cuando fue posible, y se validaron con un experimento de curva estándar. Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron por triplicado en el sistema de PCR en tiempo real Quant Studio™ 5 (ThermoFisher Scientific). Todos los datos se adquirieron y analizaron con el software de diseño y análisis Quant Studio v1.3.1 y se normalizaron con respecto a los niveles de PPIA como control interno. Los niveles relativos de ARN se calcularon mediante el método Ct comparativo ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Los ciclos de PCR se dividieron en: desnaturalización inicial a 95 °C

durante 5 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C (30 s) – 60 °C (30 s) – 72 °C (30 s). Los *primers* utilizados para el ensayo figuran en la **Tabla 3.2**.

3.18 Estudio de unión a promotores: Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Para los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en células linfoblastoides (HBL-26 y CNIO10) se sembraron $30 \cdot 10^6$ células para cada condición. Al día siguiente se trataron con el compuesto a la concentración fijada según la CC50 de los compuestos para estas líneas celulares.

El protocolo de inmunoprecipitación 48 h después del tratamiento con los compuestos, se llevó a cabo siguiendo un protocolo adaptado del artículo de Petazzi et al. (2013). Después de contar las células, se tomó una alícuota conteniendo $30 \cdot 10^6$ células y, tras lavar dos veces con PBS a 4 °C, se resuspendió en un volumen final de 30 mL (para mantener una densidad celular de 10^6 células/mL). Para llevar a cabo el entrecruzamiento de las proteínas unidas al DNA, se trató con formaldehído al 1% durante 8 minutos y la reacción se bloqueó añadiendo glicina a una concentración final de 0.125 M. Tras lavar dos veces con PBS frío, los pellets celulares se resuspendieron en tampón de lisis celular (5 mM HEPES, 85 mM cloruro de potasio, 0.5% NP-40, pH 8) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), y el lisado se homogeneizó mediante pipeteo suave para facilitar la rotura de la membrana celular. Para la inmunoprecipitación de cromatina de las líneas celulares de precursores neuronales se utilizó el truChIP Chromatin Shearing kit (Covaris PN520154) siguiendo las indicaciones del fabricante para llevar a cabo el entrecruzamiento, la ruptura celular y la ruptura de núcleos. A continuación, el sedimento nuclear se resuspendió en 1 mL de tampón de lisis Nuclei (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1% SDS, pH 8.1) en un tubo de sonicación (covaris milliTUBE 1ml AFA Fiber, Ref: 520130) y posteriormente se sometió a sonicación con el equipo Covaris M220 durante 25 min para las células linfoblastoides y 10 min para los precursores neuronales (Condiciones: Peak power 75/Duty Factor 10/Cycles Per Burst 200) para obtener fragmentos de cromatina con un tamaño de 150-

400 pb, lo que se comprobó mediante la purificación del DNA mediante columnas Nucleospin Gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel ref 740609.250) usando el tampón para muestras con alto contenido en SDS: NTB buffer (Macherey-Nagel ref 740595.150). Las muestras se diluyeron con tampón de dilución (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 165 mM cloruro sódico, 16.7 mM Tris pH 8.1).

Para cada muestra se realizaron tres inmunoprecipitaciones: una con anticuerpo anti-MeCP2 (m9317, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), otra con anticuerpo anti-H3 como control positivo (ab1791, abcam) y otra como control negativo con un anticuerpo IgG de ratón no relacionado (Merck Millipore, Burlington, MA, EE.UU.). Se tomaron 20-30 μ g de cromatina para cada inmunoprecipitación, que fueron pre-lavados utilizando esferas magnéticas (Dynabeads M-280 Sheep Anti-Rabbit IgG, Thermo Fisher, #11203D) al tiempo que las esferas para la inmunoprecipitación se incubaban O/N con cada uno de los anticuerpos. A continuación, los complejos esfera-anticuerpo se incubaron con cromatina previamente aclarada durante 2 h a 4 °C en agitación. Los inmunocomplejos se lavaron: dos veces con tampón de baja salinidad (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM cloruro sódico, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 0.5% desoxicolato sódico), dos veces con tampón de alta salinidad (50 mM Tris pH 8.0, 500 mM cloruro sódico, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 0.5% desoxicolato sódico), dos veces con tampón LiCl (50 mM Tris pH 8.0, 250 mM cloruro de litio, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 0.5% desoxicolato sódico) y dos veces con tampón TE (10 mM Tris pH 8.0, 0.25 mM EDTA). A continuación, la cromatina se eluyó de las esferas magnéticas añadiendo tampón de elución (100 mM bicarbonato sódico, 1% SDS) en dos pasos de 250 μ L y un lavado con otros 50 μ L de tampón de elución. Tras combinar los dos eluidos y ajustar la concentración de cloruro sódico a 200 mM a partir de un stock 5 M, se incubó O/N a 65 °C para deshacer el entrecruzamiento, tratando con proteinasa K a una concentración final de 20 μ g/mL durante 1 h. Por último, la extracción del DNA se llevó a cabo con PCA (fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1) y se precipitó con etanol en presencia de acetato de sodio y glicógeno. El pellet obtenido se lavó, secó y resuspendió en 30 μ L de agua bidestilada.

Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron por triplicado en el sistema de PCR en tiempo real Quant Studio™ 5 (ThermoFisher Scientific). Todos los datos se adquirieron y analizaron con el software de diseño y análisis Quant Studio v1.3.1. Los ciclos de PCR se dividieron en: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C (30 s) – 60 °C (30 s) –72 °C (30 s). El enriquecimiento en MeCP2 se expresa como el valor $2^{-\Delta C_t}$ normalizado frente al valor correspondiente del *Input* (muestra sin inmunoprecipitar). Los *primers* utilizados para el ensayo figuran en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2 Secuencias oligonucleótidos.

Gen	Sentido	Secuencia
<i>Oligonucleótidos ensayos biofísicos</i>		
BDNF prom IV	For Rev	GCCATGCCCTGGAAC*GGA ACTCTCCTAATAAAAAGATGTATCATT AAATGATACATCTTTTATTAGGAGAGTTCC*GTTCCAGGGCATGGC
C* puede estar modificada en forma de mC, hmC o sin modificar, de manera simétrica.		
<i>Primers para RT-qPCR</i>		
IGF2	For Rev	AGCTTCGCGGAGATGGTTTC CCAGCATCGACTTCCCCATT
BDNF	For Rev	TTCTGTAGTCGCCAAGGTGG GGTGGAACATTGTGCCTTTGC
PPIA	For Rev	ATGGTCAACCCCACCGTGT TCTGCTGTCTTTGGGACCTTG
NCAM	For Rev	TGGCTGTAGCTGTGATCAGG ACAGGTGCCTCCATTCTCAC
PGK	For Rev	CTGGGCAAGGATGTTCTGTT CACATGAAAGCGGAGGTTCT
<i>Primers para ChIP-qPCR</i>		
BDNF prom	For Rev	CTGGTAATTCGTGCACTAGAGT CACGAGAGGGCTCCACGGT
IGF2BP2 prom	For Rev	ACCCGCGAGTTATCCGTATT TTTTGGAGACCACTCCCTTC
IGF2 prom	For Rev	GTGTTTGGATCCCCAAAATG TTGGGGGATGAGAGAAGTTG

4. RESULTADOS.

4.1 Caracterización estructural de las variantes de MeCP2.

MeCP2 es un miembro de las llamadas proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP), tal y como se puede ver en la predicción de estructura secundaria por PSIPRED (**figura 4.1A**) y tridimensional, usando AlphaFold-2 (**figura 4.1B**) donde, de los seis dominios que la componen (NTD-MBD-ID-TRD-CTD α -CTD β), el único donde se puede predecir cierta estructura es el MBD, coincidiendo en ambas predicciones tres zonas con lámina- β y dos de α -hélice. Esto concuerda con las estructuras resueltas de la proteína (K. L. Ho et al., 2008b; Wakefield et al., 1999), ya sea en solución mediante RMN (código PDB 1QK9) o la estructura cristalográfica obtenida por difracción de rayos X (código PDB 3C2I). En el resto de dominios de la proteína se predicen, usando PSIPRED, zonas de la secuencia que son capaces de generar algo de estructura secundaria, pero esto no aparece en la predicción de estructura de AlphaFold-2.

Para analizar experimentalmente el efecto de cada uno de los diferentes dominios en la estructura y estabilidad del dominio MBD, que es el único dominio con un porcentaje de estructura secundaria significativo junto con TRD, y uno de los principales dominios funcionales, así como para ver cómo influyen en la unión de la proteína a diferentes *partners*, se diseñaron y purificaron diferentes constructos recombinantes en *E. coli*, partiendo del dominio MBD aislado y añadiendo progresivamente el resto de dominios a ambos lados, obteniendo seis variantes diferentes: MBD, NTD-MBD, NTD-MBD-ID, NTD-MBD-ID-TRD, NTD-MBD-ID-TRD-CTD α y NTD-MBD-ID-TRD-CTD α -CTD β .

Para caracterizar la estructura secundaria de nuestras diferentes variantes de MeCP2 se han llevado a cabo medidas de la señal de dicroísmo circular (DC). Los espectros de DC en la zona del ultravioleta lejano (Far-UV) del MBD

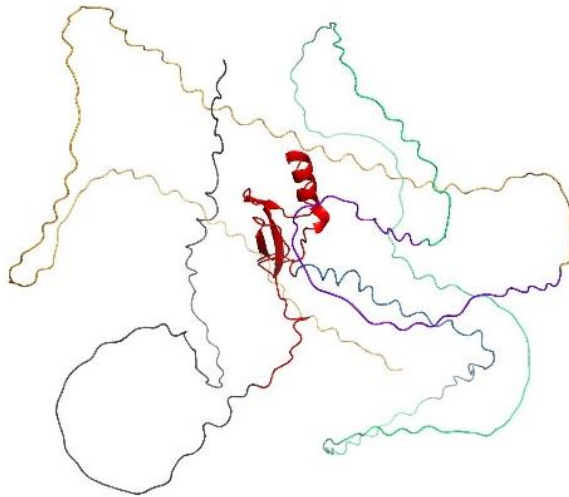
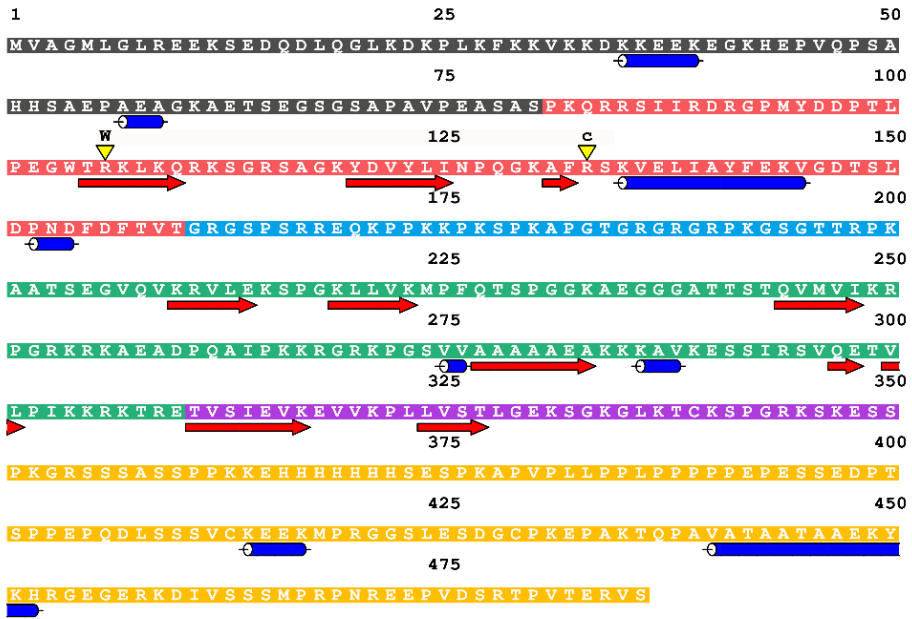


Figura 4.1. Predicción de estructura de MeCP2 indicando secuencia y separación de los diferentes dominios. Organización modular de MeCP2 indicando secuencia y separación de los diferentes dominios. Predicción de estructura SECUNDARIA de MeCP2 usando (A) PSIPRED y (B) AlphaFold2. Los diferentes dominios están marcados en diferentes colores: NTD (negro)-MBD (rojo)-ID (azul)-TRD (verde)-CTD α (morado)-CTD β (naranja). Marcados con un triángulo amarillo los sitios de mutación asociados con RTT (R106 y R133).

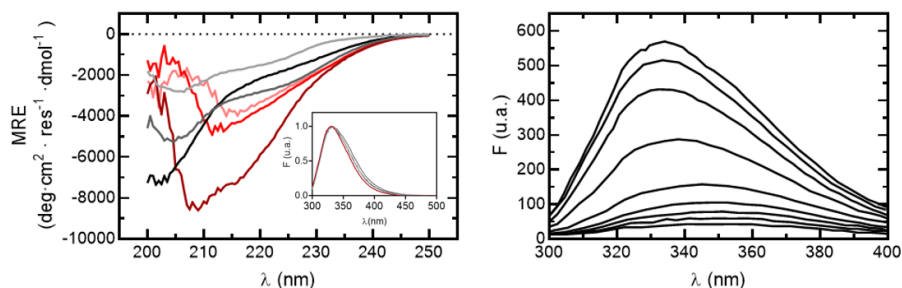


Figura 4.2. Señal de dicroísmo circular y fluorescencia intrínseca de las construcciones truncadas de MeCP2. A- Partiendo del MBD aislado (rojo oscuro) añadiendo progresivamente los dominios desordenados flanqueantes NTD (rojo), ID (rojo claro) y los dominios distales: TRD (gris claro), CTD α (gris oscuro) hasta la proteína completa (negro). B- Espectros de fluorescencia del dominio MBD al aumentar la temperatura desde 20 °C hasta 90 °C, donde se observa la reducción en la intensidad de fluorescencia y el desplazamiento del máximo hacia longitudes de onda mayores (*red-shift*) causados por la exposición del triptófano W104 al disolvente.

Tabla 4.1. Análisis de la señal de dicroísmo circular de las construcciones truncadas de MeCP2.

Construcción	Fracción estructura secundaria			
	Hélice- α	Lámina- β	Giro	Desorden
MBD	0.22	0.25	0.194	0.380
NTD-MBD	0.16	0.323	0.200	0.477
NTD-MBD-ID	0.15	0.342	0.210	0.492
NTD-MBD-ID-TRD	0.14	0.359	0.218	0.498
NTD-MBD-ID-TRD-CTD α	0.15	0.329	0.212	0.464
NTD-MBD-ID-TRD-CTD α -CTD β	0.15	0.340	0.217	0.464

muestran dos regiones típicas con bandas negativas correspondientes a lámina- β y *random-coil* (centrada alrededor de 208 nm) y α -hélice (centrada alrededor de 222 nm). El MBD contiene algo de estructura secundaria, pero está en gran medida desestructurado, como puede apreciarse observando la baja elipticidad en la señal de DC (**figura 4.2A, tabla 4.1**).

Como cabía esperar, los espectros de DC en el ultravioleta lejano de las variantes con los dos dominios flanqueantes (NTD e ID) tenían una forma similar, pero mostraban una intensidad menor al ser normalizadas por el número

de residuos, lo que indica que los dominios flanqueantes están desordenados. Esto respalda la idea sobre la naturaleza intrínsecamente desordenada de MeCP2 y su plasticidad para interactuar con muchos *partners* proteicos o ácidos nucleicos. Destaca que al introducir estos dominios parece aumentar el contenido global en lámina- β , que según las predicciones de estructura solo aparecen en el dominio MBD, de forma que parece que al introducir los dominios desordenados se estructuran las zonas con este tipo de estructura secundaria en el dominio MBD, apoyando la idea de que, aunque NTD e ID estén desordenados, modulan la conformación de MBD (**tabla 4.1**).

Esta tendencia en los espectros de DC se mantiene al seguir añadiendo los dominios distales del MBD (TRD, CTD α y CTD β), convirtiéndose progresivamente en una señal típica de *random coil* cuando se mide la señal de dicroísmo en la zona del UV-lejano, de acuerdo con la predicción de estructura tridimensional usando AlphaFold-2, donde vemos que fuera del MBD apenas aparecen zonas que puedan tender a adquirir la formación de α -hélice o lámina- β (**figura 4.2A**). Llama la atención que en porcentaje de desorden disminuye al añadir el dominio CTD, junto con un mayor porcentaje de estructura en hélice- α .

Para seguir con el estudio de la proteína a través de sus propiedades espectroscópicas, hay que considerar que la proteína tiene un único triptófano (W104), que además se encuentra en el MBD, así que la lectura de su fluorescencia cuando se excita a 290-295 nm va a reflejar el estado de plegamiento del MBD según la exposición al solvente de ese triptófano.

El espectro de ese triptófano en todas las construcciones tiene una forma similar de campana asimétrica, con un máximo a 330 nm, que indica que el residuo de triptófano no está expuesto al solvente (tal como se ve también en las estructuras obtenidas por RMN y difracción de rayos X). La ausencia de triptófanos en los otros dominios nos permite estudiar cómo afecta la presencia de los dominios desordenados al plegamiento del MBD (**figura 4.2A**).

Al estudiar el efecto del aumento de la temperatura, vemos que no existen diferencias significativas en la forma del espectro. Lo que si observamos es una disminución de la intensidad y un desplazamiento hacia el rojo (*red-shift*), es decir, el máximo del espectro va derivando progresivamente desde 330 nm a 350 nm al aumentar la temperatura por un quencheo dinámico de moléculas de agua durante la desnaturalización de la proteína por la exposición del residuo de triptófano al solvente, es decir, la desnaturalización del MBD (**figura 4.2B**).

De la lectura de fluorescencia a 330 nm al aumentar la temperatura de la muestra de 20 a 90°C, se observa un comportamiento similar con las diferentes variantes, aunque esta disminución en la intensidad de fluorescencia ocurre en puntos (temperaturas) diferentes de la rampa de temperatura, indicando una estabilización del MBD ejercido por el resto de dominios (**figura 4.3**).

Los datos se ajustaron mediante regresión no lineal con un modelo de desplegamiento de dos estados, lo que permitió estimar los parámetros termodinámicos que definen la estabilidad de MBD y sus variantes: la temperatura de desplegamiento (T_m), y entalpía de desplegamiento, $\Delta H(T_m)$, (**figura 4.3B, tabla 4.2**). Para este análisis, se utilizó un valor estimado de 0.5 kcal K⁻¹ mol⁻¹ para la capacidad calorífica de desplegamiento, ΔC_p , dado que las desnaturalizaciones térmicas son poco sensibles a este parámetro. La elección de este valor, estimado de acuerdo con una correlación entre estructura y estabilidad estructural (concretamente, una correlación entre ΔC_p y el número de residuos estructurados, Robertson & Murphy, 1997), fue validada por la buena calidad de los ajustes obtenidos para las transiciones de desplegamiento. Además, se comprobó que este proceso de desplegamiento es completamente reversible.

En cuanto a los resultados obtenidos, se observó que la temperatura de desplegamiento, T_m , aumenta con la longitud de la variante proteica, alcanzando el máximo grado de estabilización cuando los dominios NTD e ID están presentes. La adición de NTD e ID aumentó la T_m en 2.3 °C y 7.8 °C, respectivamente. Por lo tanto, se concluye que estas regiones desordenadas contribuyen significativamente en la estabilización del MBD, ya sea mediante

efectos específicos o inespecíficos (ej. interacciones electrostáticas o estéricas) (figura 4.3).

Tabla 4.2. Estabilidad térmica de las construcciones de MeCP2 en tampón 50 mM Tris pH 7.

Construcción	T_m (°C)	$\Delta H(T_m)$ (kcal/mol)
MBD	38.4 ± 0.3	29 ± 1
NTD-MBD	40.7 ± 0.2	33 ± 1
NTD-MBD-ID	46.2 ± 0.2	37 ± 1
NTD-MBD-ID-TRD	44.4 ± 0.1	55 ± 1
NTD-MBD-ID-TRD-CTD α	44.2 ± 0.3	42 ± 2
NTD-MBD-ID-TRD-CTD α -CTD β	47.2 ± 0.2	39 ± 1

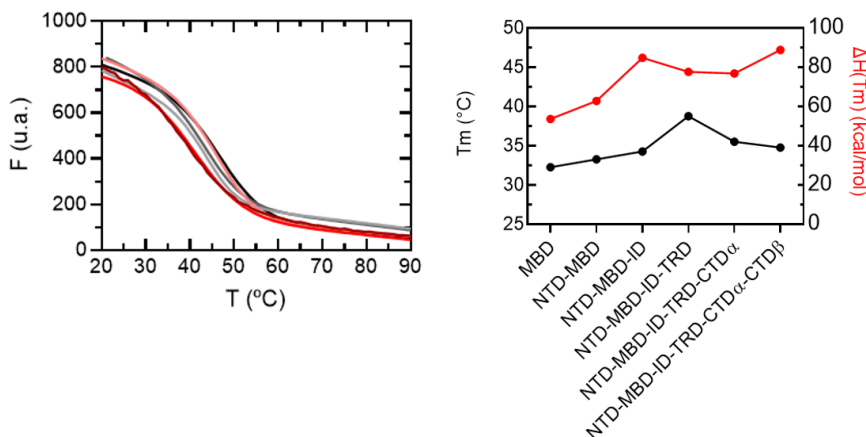


Figura 4.3. Datos de estabilidad térmica medidos por fluorescencia intrínseca de triptófano de las variantes de MeCP2. Medidas de fluorescencia (A) de todas las construcciones Partiendo del MBD aislado (rojo oscuro) añadiendo progresivamente los dominios desordenados flanqueantes NTD (rojo), ID (rojo claro) y los dominios distales: TRD (gris claro), CTD α (gris oscuro) hasta la proteína completa (negro); y resultados del ajuste de los datos a un modelo de desplegamiento de dos estados (B) de todas las variantes.

Al estudiar los datos de las construcciones más grandes (NTD-MBD-ID-TRD, NTD-MBD-ID-TRD-CTD α , y NTD-MBD-ID-TRD-CTD α -CTD β /full length), se puede ver que los parámetros de estabilidad son muy similares al comparar con la proteína entera y con el constructo NTD-MBD-ID. Los dominios distales

no aumentan significativamente la temperatura de desplegamiento del MBD, más allá de lo que consiguen los dos dominios flanqueantes (NTD e ID) solos, aunque al añadir el TRD hay un ligero aumento de la T_m que no se mantiene al añadir el resto de dominios. No hay cambio en la entalpía de desplegamiento (relacionada con la cooperatividad del proceso) al añadir el TRD, CTD α o CTD β (**figura 4.3**),

Las desventajas del estudio de estabilidad mediante la lectura de la fluorescencia del triptófano al aumentar de la temperatura son, en primer lugar, que se estudia el estado de plegamiento a nivel local (en entorno inmediato del triptófano) mientras que se obvia lo que ocurre al resto de la proteína; y, en segundo lugar, que puede haber un artefacto producido con el aumento de la temperatura, donde ocurran intermedios de desplegamiento que no ocurrirían a temperaturas más fisiológicas. Para comprobar la validez de las conclusiones tomadas en este ensayo se utilizaron dos enfoques dirigidos a superar cada una de las dos limitaciones.

Para comprobar si este efecto estabilizador era simplemente local, en el entorno del residuo de triptófano, o un efecto global, se llevó a cabo el estudio de desplegamiento mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la construcción con el MBD, y la construcción con los dominios flanqueantes NTD-MBD-ID.

Los termogramas muestran una única transición de desplegamiento aparente tanto para MBD como para NTD-MBD-ID (**figura 4.4A**). Los experimentos realizados a una concentración de proteína de 20 y 40 μ M proporcionaron resultados similares (valores de T_m aparente y entalpía de desplegamiento similares) indicando que la proteína es monomérica, y que el desplegamiento no provoca oligomerización o agregación. El análisis de van 't Hoff libre de modelo indicó que MBD se despliega en una sola transición, mientras que NTD-MBD-ID se despliega a través de dos transiciones independientes, ya que la relación de entalpías ($\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal}$) es cercana a 1 para MBD, pero bastante menor que 1 para NTD-MBD-ID (Tabla datos DSC). Este resultado indicó que el carácter cooperativo del desplegamiento es menor en el caso de NTD-MBD-

ID y requiere la consideración de, al menos, dos transiciones de desplegamiento independientes. De acuerdo con estos resultados, el desplegamiento de MBD se analizó con un modelo que considera una sola transición y el de NTD-MBD-ID se analizó con un modelo que considera dos transiciones independientes (**figura 4.4A, Tabla 4.2**).

Aunque estos datos se podían ajustar relativamente bien con un modelo con una sola transición, el modelo con dos transiciones presentaba una suma de residuos cuadrados (SSR) menor, y el test paramétrico F-test indica que el modelo con dos transiciones y, al menos, un estado intermedio es estadísticamente más apropiado ($F = 50.40 > F_{3,213}(\alpha=0.05) = 2.65$).

Alternativamente, se determinó la estabilidad de diferentes construcciones mediante desnaturalización química empleando urea. Los espectros de fluorescencia de triptófano medidos en las diferentes condiciones, con concentración creciente de desnaturalizante muestran las mismas características que en el caso de la desnaturalización térmica: al aumentar la concentración de urea hay una disminución de la intensidad de la fluorescencia emitida y un desplazamiento progresivo del máximo de 330 a 350 nm que indica la exposición al solvente del residuo de triptófano conforme aumenta la fracción de proteína desplegada con respecto a la proteína nativa. De manera similar al caso de la desnaturalización térmica, los dominios desordenados ejercen un efecto estabilizador frente a la desnaturalización química representadas mediante la energía media del espectro, aumentando la $[D]_{1/2}$ (concentración de desnaturalizante a la cual la mitad de la proteína está desplegada) de 3.3 M a 4 M al añadir los dominios flanqueantes desordenados (**Figura f.4B,C**).

Tabla 4.3. Parámetros asociados al test de van't Hoff (test de dos estados) de los datos de DSC

	T_m (°C)	ΔH_{cal} (kcal/mol)	C_{Pmax} (kcal/K·mol)	ΔH_{vH} (kcal/mol)	ratio
MBD	37.8	36	1.85	39	1.08
NTD-MBD-ID	44.8	52	2.73	42	0.81

Tabla 4.4. Parámetros asociados al análisis por DSC del desplegamiento de las construcciones MBD y NTD-MBD-ID a pH 7

	T_{m1} (°C)	ΔH_1 (kcal/mol)	T_{m2} (°C)	ΔH_2 (kcal/mol)	sqrt(RSS) (kcal/mol)
MBD	37.4 ± 0.2	38 ± 1			1.0603
NTD-MBD-ID	45.0 ± 0.2	47 ± 1			2.0606
	41.7 ± 0.2	11 ± 1	45.0 ± 0	46 ± 1	1.5540

Sqrt(RSS): raíz cuadrada de la suma de cuadrados de los residuos

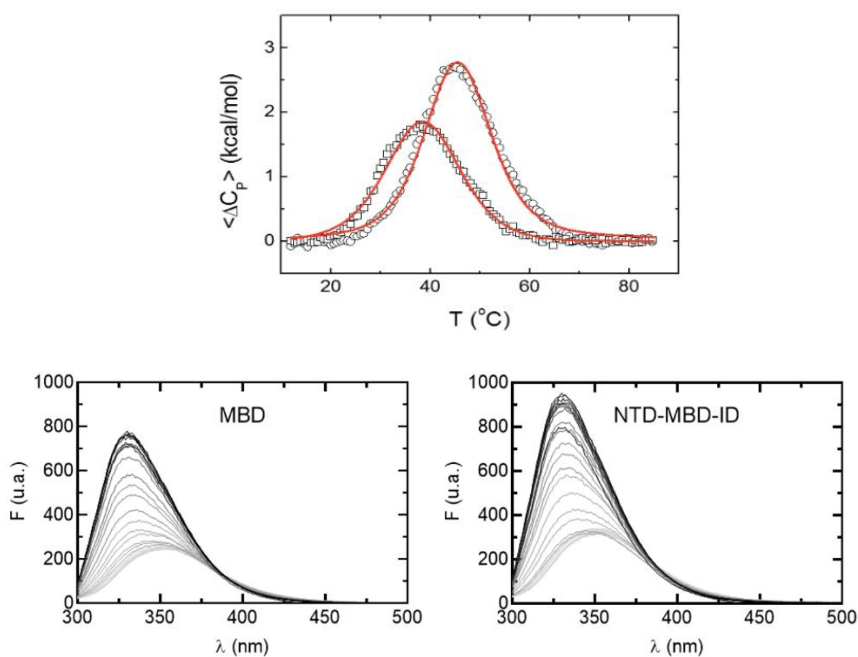


Figura 4.4. Estabilidad de las construcciones MBD y NTD-MBD-ID por DSC y desnaturalización química. (Arriba) Termogramas de calorimetría diferencial de barrido, mostrando la capacidad calorífica molar de exceso en función de la temperatura, para la construcción MBD (cuadrados) y NTD-MBD-ID (círculos). Los experimentos se realizaron a una concentración de 40 μ M, en tampón 50 mM Tris, pH 7. El ajuste no lineal está representado en rojo, de acuerdo a un modelo con una transición (MBD) o dos transiciones independientes (NTD-MBD-ID). (Abajo) Espectros de fluorescencia del triptófano intrínseco de las construcciones truncadas MBD (izquierda) y NTD-MBD-ID (derecha) en concentraciones crecientes de urea, mostradas con un gradiente de intensidad de color.

Tabla 4.5 Parámetros de desnaturalización química de las construcciones MBD and NTD-MBD-ID a pH7. Estimados analizando la dependencia de la concentración de desnaturalizante en la energía espectral media emitida.

	ΔG_w (kcal/mol)	m (kcal/mol·M)	$[D]_{1/2}$
MBD	2.5	0.77	3.3
NTD-MBD-ID	2.8	0.70	4.0

$[D]_{1/2}$ es la concentración media de desnaturalizante. La energía de estabilización libre de Gibbs en ausencia de desnaturalizante se calcula a partir de $[D]_{1/2}$, según la relación $\Delta G_w = m [D]_{1/2}$

4.2 Caracterización biofísica de la unión de MeCP2 al DNA y su implicación estructural.

4.2.1 Estudio termodinámico de la interacción: ITC.

Uno de los *partners* principales y más conocidos de MeCP2 es el DNA metilado en citosina en el contexto CpG, y gracias a las estructuras cristalográficas y por RMN del complejo, sabemos que ocurre a través del dominio MBD, al que da nombre (*Methyl Binding Domain*). Sin embargo, teniendo en cuenta que los dominios desordenados de MeCP2 tienen un efecto estabilizador en la proteína, queríamos estudiar si esta estabilización repercute en la capacidad de unión de MeCP2 al DNA.

En estas estructuras cristalográficas mencionadas, se ha utilizado un oligonucleótido cuya secuencia corresponde con un gen cuya regulación transcripcional es llevada a cabo en parte por MeCP2, concretamente, el promotor IV del gen humano para BDNF. Por eso hemos seleccionado este oligonucleótido, con diferentes modificaciones en la citosina (CpG, 5-mCpG, 5-hmCpG), para caracterizar la unión de MeCP2 al dsDNA (DNA de doble hebra) y dilucidar los mecanismos de selectividad por alguno de estos estados de metilación.

Dada la naturaleza desordenada de MeCP2, que dificulta enormemente el uso de técnicas de biología estructural con la proteína completa tanto a nivel experimental (como la cristalografía, o la microscopía electrónica) o

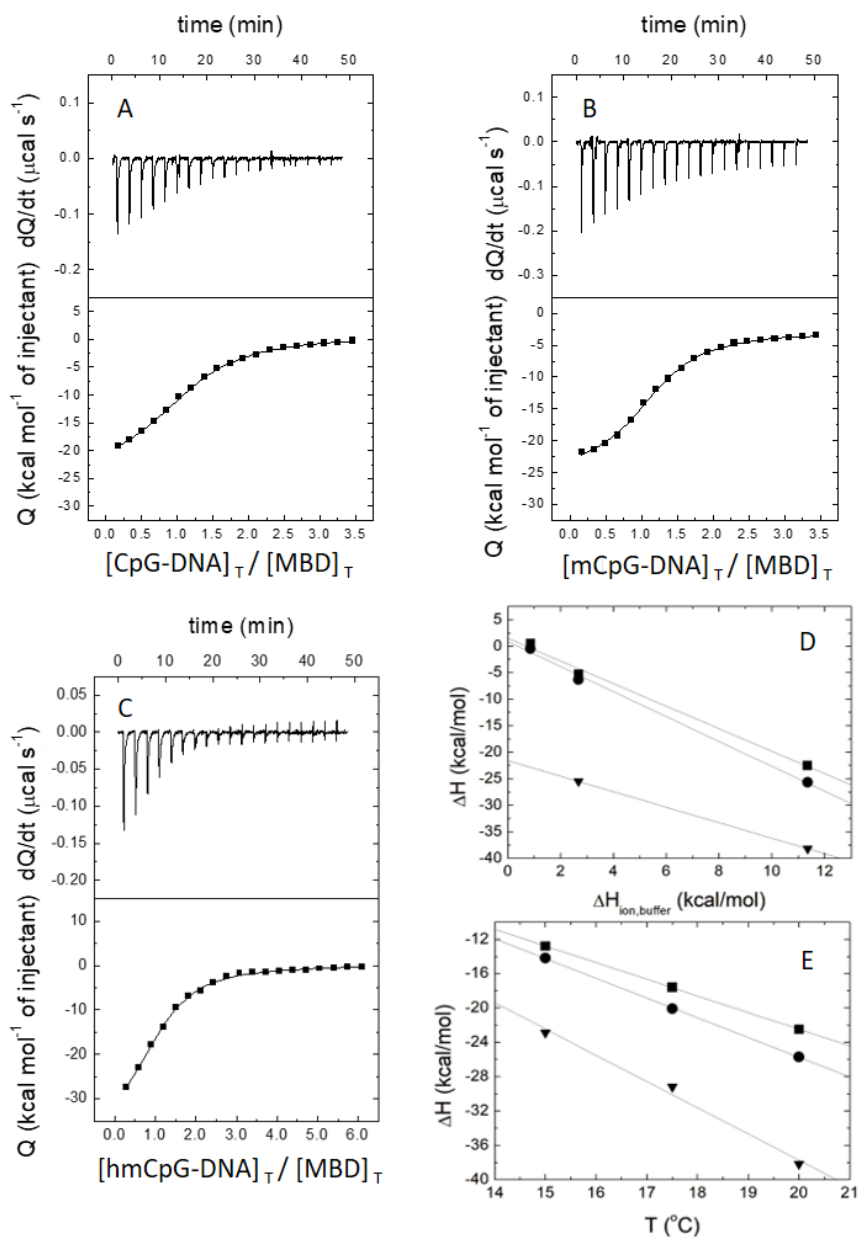


Figura 4.5 Interacción del constructo MBD con CpG-DNA (A), mCpG-DNA (B) y hmCpG-DNA (C) mediante ITC. Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso. (D) La capacidad calorífica asociada a la unión al CpG-DNA (círculos), mCpG-DNA (cuadrados) y hmCpG-DNA (triángulos) se determinó mediante la realización del experimento a diferentes temperaturas (E). La entalpía del proceso independiente del tampón y el número de protones intercambiados en la unión para los tres ligandos fue estimada realizando experimentos con tampones con diferentes entalpías de ionización

computacional (dinámica molecular) para caracterizar el complejo que forma con DNA, se ha llevado a cabo una caracterización biofísica completa mediante ITC, que permite obtener la mayor cantidad posible de datos termodinámicos de esta interacción, para dilucidar el mecanismo de unión, la base molecular de la selectividad por las diferentes modificaciones epigenéticas del DNA (metilación o hidroximetilación), y la base molecular sobre el efecto de los dominios desordenados y distales implicados en este proceso. Además de tener información de las constantes de afinidad, al realizar ensayos a diferentes temperaturas podemos calcular la variación de capacidad calorífica asociada al proceso (que es indicativo de las moléculas de agua desplazadas en la formación del complejo y de posible cambios conformacionales acoplados a la interacción), y al usar diferentes tampones de ensayo podemos calcular el número neto de protones intercambiados con el medio (indicativo de los grupos ionizables que participan en la interacción) y la entalpía independiente del tampón asociada al proceso, con la cual se pueden determinar las contribuciones entálpicas (generalmente informativas sobre la contribución de interacciones polares específicas) y entrópicas (generalmente informativas sobre la contribución de interacciones apolares inespecíficas) al proceso de unión desde un punto de vista termodinámico (Bastos et al., 2023).

La interacción del **MBD** aislado es bastante similar con dsDNA metilado y no metilado. Está caracterizada por una afinidad moderada (K_d en el rango submicromolar), dirigida entrópicamente, con una entalpía de unión ligeramente desfavorable (**figura 4.5**). En otros trabajos previos se han medido afinidades más altas, lo cual se podría explicar teniendo en cuenta las diferentes condiciones experimentales en estos experimentos. Cuando se forma el complejo MBD:dsDNA se liberan alrededor de 2 protones a la solución total (es decir, al menos dos grupos ionizables participan en ese proceso de intercambio de protones) (**tabla 4.6**). Por lo tanto, un ligero aumento del pH en 0.5 unidades aumentaría la afinidad de unión en 10 veces, dando lugar a una constante de

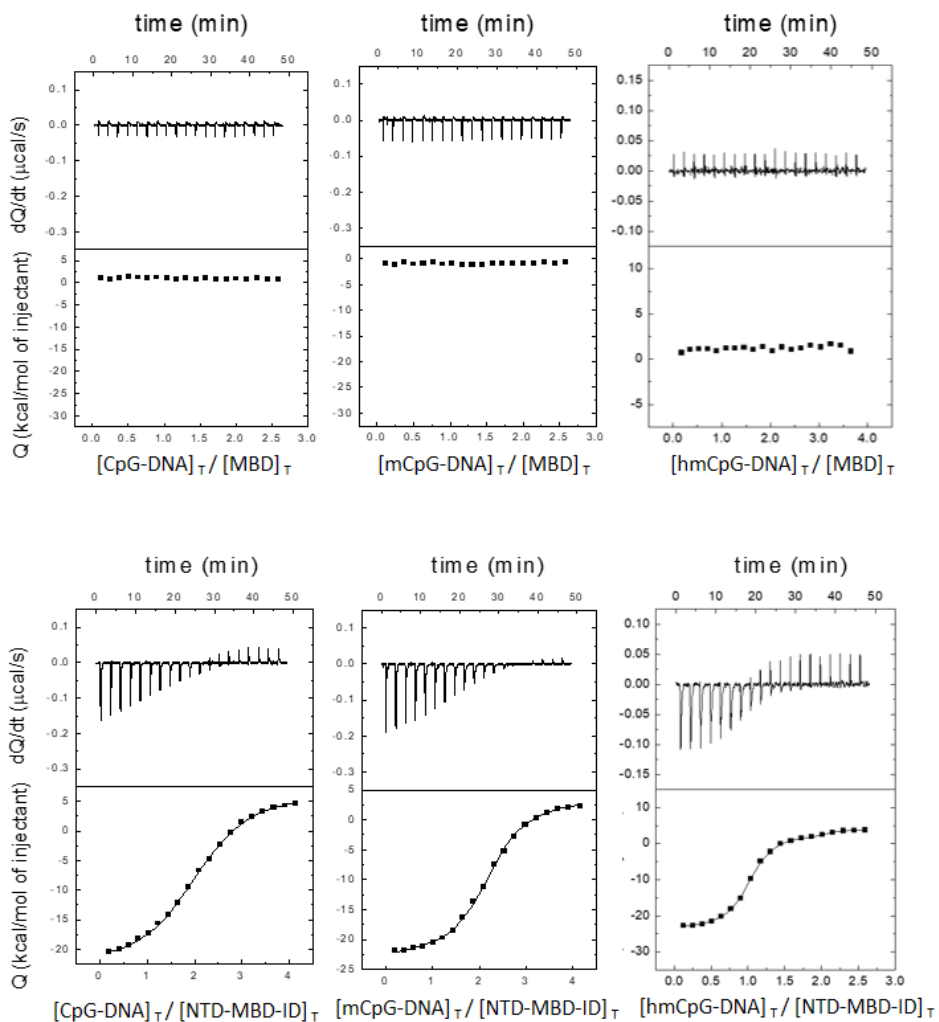


Figura 4.6. Interacción del constructo MBD (arriba) y NTD-MBD-ID (abajo) con CpG-DNA (A), mCpG-DNA (B) y hmCpG-DNA (C) en condiciones de alta fuerza iónica (150 mM cloruro de sodio) mediante ITC. Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de uno o dos sitios de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso.

disociación concordante con los resultados publicados previamente (Ghosh, Nikitina, et al., 2010; Khrapunov et al., 2014). Además, la interacción de MBD con dsDNA se caracteriza por una capacidad calorífica de unión negativa y grande, que se puede explicar teniendo en cuenta los cambios conformacionales y el enterramiento de la superficie molecular asociados a la interacción (**tabla 4.6**).

No se ven grandes cambios en cuanto a la afinidad de unión del MBD con los dos tipos de dsDNA (metilado y sin metilar), lo cual ya se había observado anteriormente (Khrapunov et al., 2014). Al aumentar la fuerza iónica (150 mM cloruro de sodio) la afinidad se ve afectada significativamente, disminuyendo ~1000 veces (**figura 4.6**). Esta reducción de la afinidad indica que la formación del complejo está acoplada a la liberación de aproximadamente 4 iones de sal del complejo al tampón (efecto polielectrolito, Vega et al., 2016)), según la siguiente relación:

$$\left(\frac{\partial \ln K_{a,obs}}{\partial \ln[S]}\right)_P = \Delta n_s \quad (12)$$

En términos de afinidad, la interacción con el dsDNA hidroximetilado no varía mucho en comparación con los otros tipos de dsDNA, con una constante de disociación ligeramente mayor que los otros. Sin embargo, al determinar la entalpía de unión independiente del buffer, se puede observar que esta unión ocurre de manera completamente opuesta al resto en términos termodinámicos: está dirigida entálpicamente, -21.6 kcal/mol, con un componente entrópico muy desfavorable, obteniendo finalmente una energía libre de Gibbs similar, lo cual representa un ejemplo de compensación entálpico-entrópica (**figura 4.7, tabla 4.6**).

También podemos ver una diferencia en el número de protones intercambiados con la solución: 1.5 protones liberados en la unión con hmCpG-DNA frente a 2.4 y 2.1 protones liberados al interaccionar CpG-DNA y mCpG-DNA, respectivamente. Además, la capacidad calorífica de unión ΔC_P presenta un valor negativo mayor para el DNA hmCpG (-3.1 kcal/K·mol) en comparación

con el CpG-DNA (-2.4 kcal/K·mol) y el mCpG-DNA (-2.1 kcal/K·mol) (**figura 4.5, tabla 4.6**).

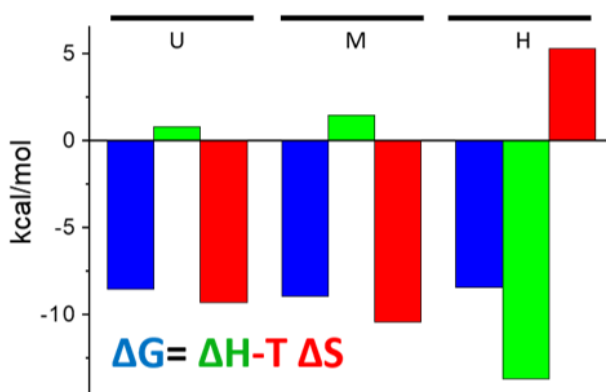


Figura 4.7. Parámetros termodinámicos de la interacción del constructo MBD con CpG-DNA (U), mCpG-DNA (M) y hmCpG-DNA (H) independiente del tampón. Energía libre de Gibbs desglosada en sus componentes entálpicas y entrópicas.

Al realizar la titulación dsDNA metilado y sin metilar sobre la construcción NTD-MBD, se obtuvieron perfiles termodinámicos similares, con un ligero aumento en afinidad, y capacidad calorífica de unión algo menor, siendo este último siempre algo menor en el caso del dsDNA metilad (**tabla 4.6**).

En los ensayos con la construcción **NTD-MBD-ID**, la situación cambia radicalmente: la afinidad del MBD por el DNA aumenta sorprendentemente, pasando del rango submicromolar al subnanomolar (un aumento de ~400 veces), y además aparece un segundo sitio de unión por el DNA, con una afinidad moderada (rango submicromolar) (**figura 4.8, tabla 4.6**).

Un análisis preliminar de las titulaciones calorimétricas libre de modelo indicó que ambos sitios de unión son diferentes e independientes (Freire et al., 2009). Aunque la capacidad de ID y MBD para unirse al dsDNA ya se había descrito anteriormente (Ghosh RP. 2010b), hasta ahora no se había establecido si los dos sitios de unión interactuarían con el mismo fragmento de dsDNA o si cada dominio interactuaría con un fragmento de dsDNA independiente.

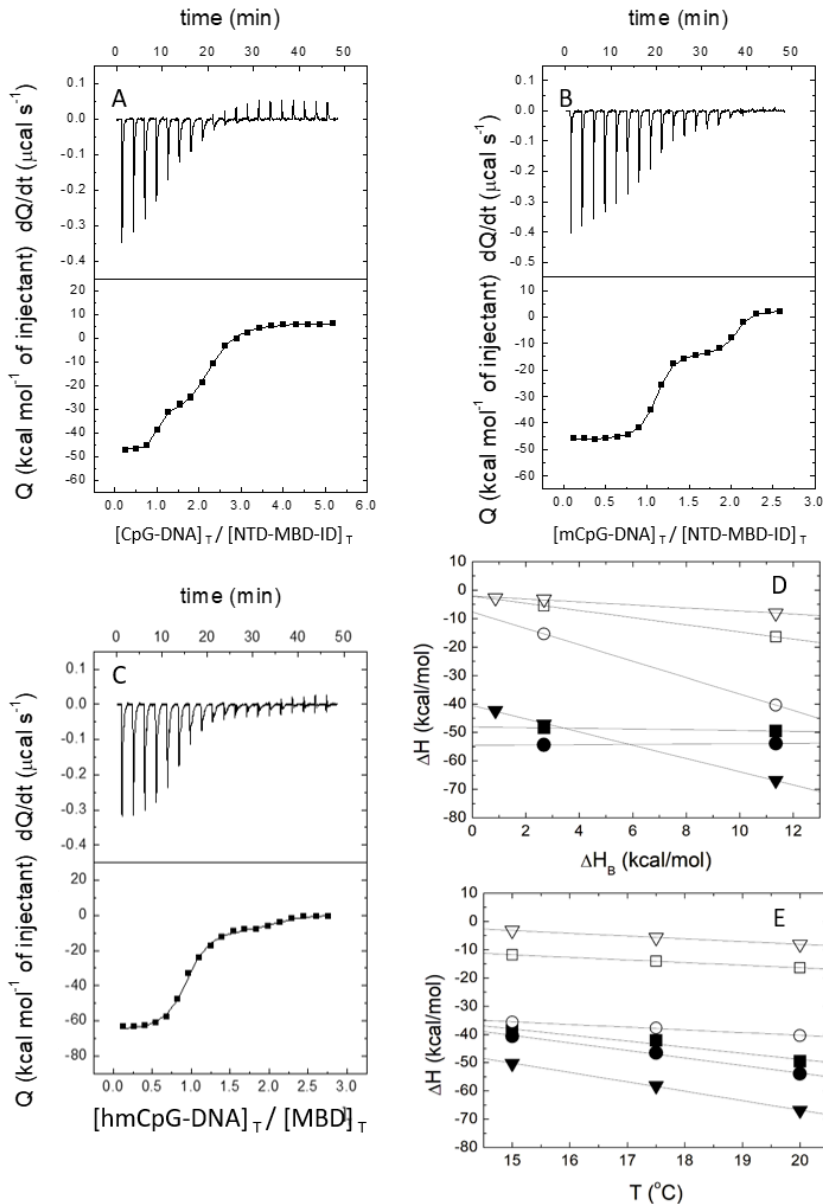


Figura 4.8. Interacción del constructo NTD-MBD-ID con CpG-DNA (A), mCpG-DNA (B) y hmCpG-DNA (C) mediante ITC. Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de dos sitios de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso. (D) La capacidad calorífica asociada a la unión al CpG-DNA (círculos), mCpG-DNA (cuadrados) y hmCpG-DNA (triángulos) se determinó mediante la realización del experimento a diferentes temperaturas para el sitio de baja afinidad (blanco) y alta afinidad (negro). (E) La entalpía del proceso independiente del tampón y el número de protones intercambiados en la unión para los tres ligandos fue estimada realizando experimentos con tampones con diferentes entalpías de ionización.

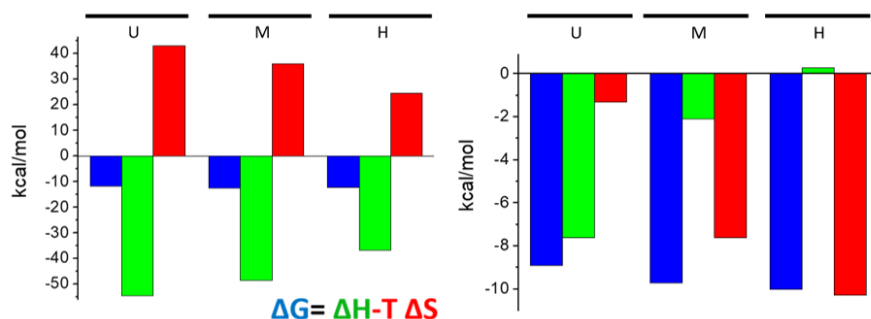


Figura 4.9. Parámetros termodinámicos de la interacción del constructo NTD-MBD-ID con CpG-DNA (U), mCpG-DNA (M) y hmCpG-DNA (H) independiente del tampón. Energía libre de Gibbs desglosada en sus componentes entálpicas y entrópicas, para el sitio de alta afinidad (izquierda) y baja afinidad (derecha).

El sitio de unión localizado en el MBD del constructo NTD-MBD-ID presenta una afinidad muy alta por todas las variantes de dsDNA (en el rango subnanomolar) con una afinidad dos veces mayor por el mCpG-dsDNA ($K_d = 0.56$ nM) que por el hmCpG-dsDNA ($K_d = 1.2$ nM), que a su vez es casi dos veces más afín que el CpG-dsDNA ($K_d = 1.9$ nM). La interacción en este sitio está caracterizada por una contribución entálpica muy favorable, con una disminución de la entropía, posiblemente debido a una reorganización conformacional de la proteína durante la formación del complejo, lo que también se observa viendo que la capacidad calorífica de unión en este sitio es mayor que en el sitio de unión en el ID. Por su parte, la unión del DNA en el dominio ID es de menor afinidad (en el rango submicromolar) con contribuciones favorables tanto en cuanto a entalpía como entropía. Cabe destacar que la unión con mCpG-dsDNA y CpG-dsDNA en este sitio presenta valores altamente negativos en el componente entálpico, y valores más bajos para el componente entrópico, lo cual es el caso contrario a lo que ocurre en la unión con hmCpG-dsDNA en este sitio. Sin embargo, atendiendo a los valores de la constante de disociación vemos que las similitudes se pueden ver en la unión de mCpG-dsDNA y hmCpG-dsDNA ($K_d = 62$ nM y 72 nM, respectivamente), en contraste con la afinidad medida para el CpG-dsDNA ($K_d = 250$ nM) que es aproximadamente cuatro veces menor (**figura 4.8, tabla 4.6**).

La unión de dsDNA presenta una gran capacidad calorífica negativa. La capacidad calorífica de unión en el sitio ID es similar con cualquiera de los tipos de dsDNA, mientras que encontramos diferencias en el sitio MBD cuando se une a los diferentes tipos de dsDNA (siendo mayor para el hmCpG-dsDNA, seguido de CpG-dsDNA siendo el mCpG-dsDNA el menor). El sitio de unión en el ID siempre presenta un intercambio neto de protones tras la unión, mientras que en el sitio en el MBD sólo existe un intercambio neto de protones tras la unión con el hmCpG-dsDNA (**figura 4.8, tabla 4.6**).

Para confirmar la capacidad de la ID de unirse al dsDNA de manera independiente, se diseñó y purificó adecuadamente una nueva construcción que contenía este dominio aislado, con la que se llevaron a cabo ensayos de ITC que mostraron que el dominio ID interacciona por sí mismo con el dsDNA, mostrando una afinidad ligeramente mayor por el dsDNA metilado que por el dsDNA no metilado, siendo algo menor la afinidad por el dsDNA hidroximetilado, con todas las constantes de disociación en el rango submicromolar (**figura 4.10, tabla 4.6**).

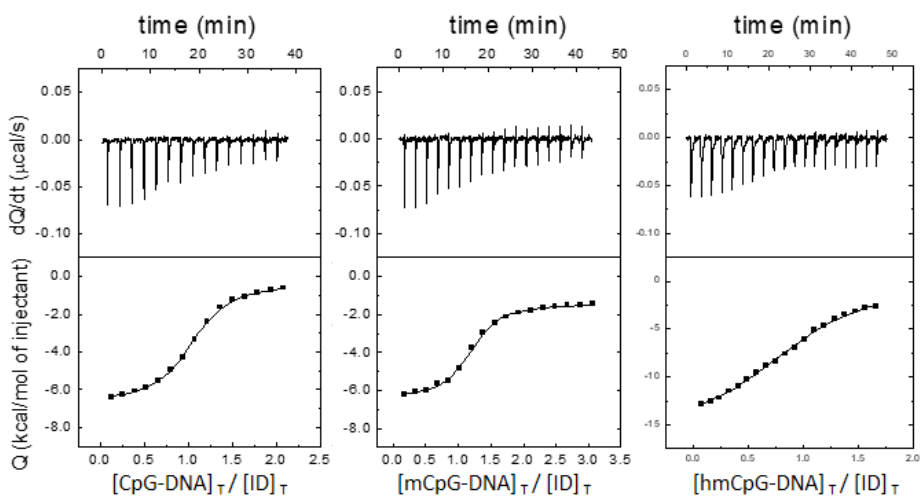


Figura 4.10. Interacción del constructo ID con CpG-DNA (A), mCpG-DNA (B) y hmCpG-DNA (C) mediante ITC. Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso.

Los ensayos de ITC proporcionan mucha información sobre la interacción de las construcciones de MeCP2 con dsDNA modificado y no modificado. La determinación de afinidad de interacción, junto con la entalpía y entropía de interacción y otros parámetros descriptivos adicionales (capacidad calorífica de interacción y número de protones intercambiados) permite delinear un proceso de interacción con el que observar diferencias significativas entre complejos diferentes y revelar detalles diferenciales en la formación de dichos complejos. En conjunto, los ensayos realizados revelan peculiaridades inesperadas para la interacción con hmCpG-DNA, apuntando que existe un modo de interacción diferente: o bien hay una red de interacciones diferente entre el dsDNA y la proteína (incluyendo las moléculas de agua atrapadas dentro de la interfaz de unión) y/o existen diferentes cambios conformacionales locales/globales que acompañan a la interacción con el DNA con la citosina hidroximetilada. Además, los experimentos realizados a alta fuerza iónica (tampón suplementado con 150 mM de cloruro sódico) revelaron una característica intrigante: la interacción de MBD con cualquiera de los tres dsDNAs fue abolida por la alta fuerza iónica, mientras que la afinidad de interacción de NTD-MBD-ID con CpG-dsDNA y mCpG-dsDNA disminuyó considerablemente (~1000 veces), mientras que la afinidad de interacción de NTD-MBD-ID con hmCpG-dsDNA en el sitio de unión de alta afinidad aumentó ligeramente (constante de disociación de 0.5 nM, en comparación con 1.2 nM con baja fuerza iónica) con una reducción significativa de la entalpía (-27.6 kcal/mol en comparación con -66.9 kcal/mol en tampón Tris), así como en el sitio de unión de baja afinidad constante de disociación de 38 nM en comparación con 71 nM a baja fuerza iónica) (**tabla 4.6**).

Aunque la interacción del hmCpG-DNA en el sitio de unión de baja afinidad de la construcción NTD-MBD-ID se caracteriza por parámetros de unión aproximadamente similares a los de la interacción con CpG-DNA y mCpG-DNA, muestra características diferentes a los otros dsDNAs modificados con citosina: mayor capacidad calorífica de unión negativa; mayor número neto negativo de protones intercambiados (es decir, liberados) durante la unión;

menor entalpía de unión favorable (y, por tanto, menor contribución entrópica desfavorable); y mayor afinidad a una fuerza iónica (casi) fisiológica.

La adición progresiva de los dominios TRD, CTDA y CTDb no cambia sustancialmente los datos termodinámicos de la unión. La presencia del TRD cambia la contribución de cada una de las partes (entálpica y entrópica), pero la compensación entre ellas resulta igualmente en dos sitios de unión independientes, con afinidades similares a las medidas con la construcción NTD-MBD-ID (figura 4.11, tabla 4.6).

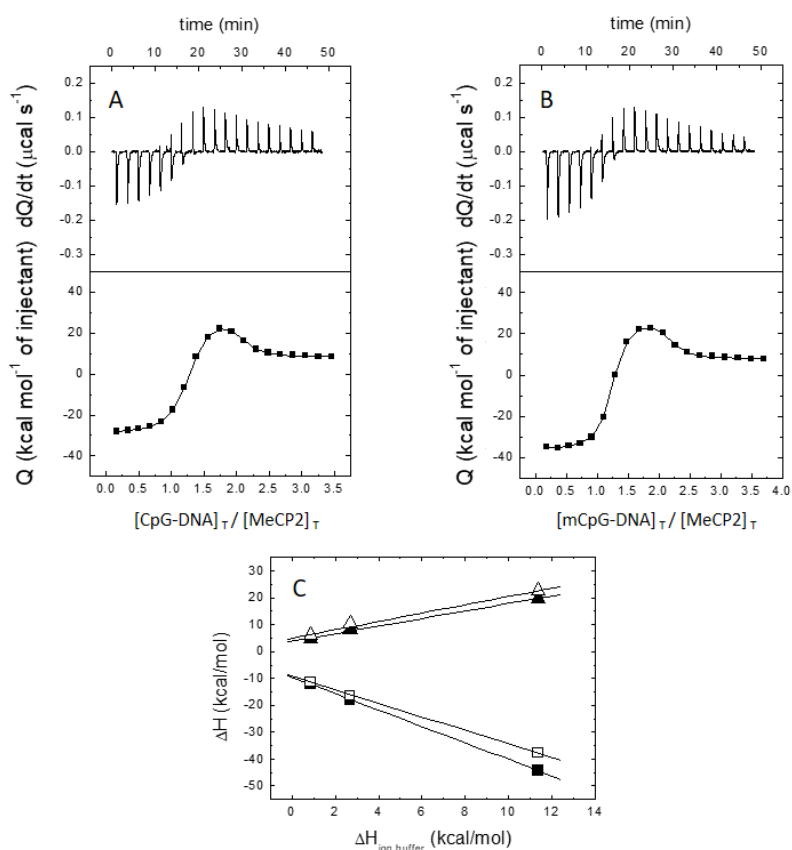


Figura 4.11. Interacción de MeCP2 con CpG-DNA (A) y mCpG-DNA (B) mediante ITC. Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de dos sitios de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso. (D) La capacidad calorífica asociada a la unión al CpG-DNA (círculos) y mCpG-DNA (cuadrados) se determinó mediante la realización del experimento a diferentes temperaturas para el sitio de baja afinidad (blanco) y alta afinidad (negro).

Tabla 4.6 Parámetros de interacción independiente del tampón para las variantes truncadas de MeCP2 con DNA sin metilar (CpG-), metilado (mCpG-) e hidroximetilado (hmCpG-) a pH7.

		K_d (nM)	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	Δn_H	ΔC_P (kcal/K·mol)
MBD	CpG-DNA	450	-8.5	0.8	-9.3	-2.4	-2.3
	mCpG-DNA	240	-8.9	1.5	-10.4	-2.1	-1.9
	hmCpG-DNA	630	-8.3	-21.6	13.3	-3.1	
NTD-MBD	CpG-DNA	210	-9.0	-0.2	-8.8	-2.1	-2.1
	mCpG-DNA	90	-9.5	-0.2	-9.3	-1.9	-1.7
NTD-MBD-ID	CpG-DNA	1.9	-11.7	-54.6	42.9	-0.1	-2.7
		250	-8.9	-7.6	-1.3	-2.9	-0.96
	mCpG-DNA	0.56	-12.4	-48.4	36.0	-0.1	-2.2
		62	-9.7	-2.1	-7.6	-1.3	-0.92
	hmCpG-DNA	1.2	-12.0	-40.6	28.6	-2.3	
		71	-9.6	-2.0	-7.6	-2.5	
ID	CpG-DNA	160	-9.1	1.2	-10.3	-0.7	-0.22
	mCpG-DNA	130	-9.2	1.0	-10.2	-0.5	-0.18
NTD-MBD-ID-TRD	mCpG-DNA	1.1	-12.0	-13.9	1.9	-1.4	
		24	-10.2	-2.4	-7.8	3.5	
NTD-MBD-ID-TRD-CTD α	mCpG-DNA	3.4	-11.4	-8.6	-2.8	-1.7	
		62	-9.7	2.1	-11.8	2.1	
NTD-MBD-ID-TRD-CTD α -CTD β (MeCP2)	CpG-DNA	2.1	-11.6	-9.2	-2.5	-2.5	-1.9
		85	-9.5	5.0	-14.5	1.6	-1.2
	mCpG-DNA	0.65	-12.3	-9.6	-2.7	-3.1	-2.2
		34	-10.0	3.8	-13.8	1.4	-1.4

En las construcciones más largas que NTD-MBD hay dos constantes de disociación (sitio de alta afinidad y de baja afinidad). El error relativo para la K_d es del 15%, el error absoluto para ΔG , ΔH , $-T\Delta S$ y Δn_H es de 0.1 kcal/mol, 0.5 kcal/mol, 0.5 kcal/mol y 0.2 respectivamente

4.2.2 Efecto de la formación del complejo MeCP2-dsDNA en la estabilidad de la proteína

Para seguir ahondando en la caracterización del complejo MeCP2-dsDNA se ha estudiado el efecto de la unión con cada una de las variantes de DNA sobre la estabilidad de los constructos de la proteína. Es un estudio indirecto de esta interacción, en el que vemos que una interacción preferente de un soluto con la proteína nativa lleva a una estabilización de este estado conformacional, es decir, la unión con un soluto causará un aumento aparente de la estabilidad

(aumento de parámetros termodinámicos (T_m y $\Delta H(T_m)$) que correlaciona con su especificidad.

4.2.2.1 Estudio local de la estabilización frente a la desnaturalización térmica medida por fluorescencia.

Se estudió el efecto estabilizante de esta unión ante la desnaturalización térmica seguida por la fluorescencia del triptófano del MBD. Al igual que el apartado anterior, se ajustaron los datos de fluorescencia a 330 nm en función de la temperatura con un modelo no lineal que asume un desplegamiento en única transición entre dos estados. Igualmente, se estimó un ΔC_p de 0.5 kcal/K·mol, tal y como se justificó en el apartado anterior, y se realizaron ensayos que confirmaron la reversibilidad del proceso.

En todos los casos la presencia de DNA ejerció un efecto estabilizador comparando sus valores de T_m y ΔH^{TM} con la proteína sin ligando, indicando que el MBD se une a DNA preferencialmente en su estado nativo, tal y como era de esperar (**figura 4.12**).

El grado de estabilización causado por la presencia de DNA depende de la afinidad de la unión, de la estequiometría y la concentración de dsDNA. Al mantener constante la concentración de dsDNA en todos los ensayos, podría parecer que el valor del efecto de estabilización medido como ΔT_m sea útil para calcular la afinidad por un ligando, sin embargo, la entalpía y capacidad calorífica de unión también modulan el efecto estabilizador de la unión sobre la proteína y sus valores serán diferentes para cada ligando. Esto hace que el efecto estabilizador de un ligando (y en particular, ΔT_m) no correlacione con la afinidad de interacción. Además, al comparar las diferentes construcciones de MeCP2 tenemos que tener en cuenta que la presencia del ID cambia la estequiometría de la unión. La presencia de un sitio de unión de dsDNA adicional está relacionada con el efecto de estabilización inducido por dsDNA mucho mayor observado en NTD-MBD-ID, en comparación con los efectos de estabilización en las construcciones más pequeñas.

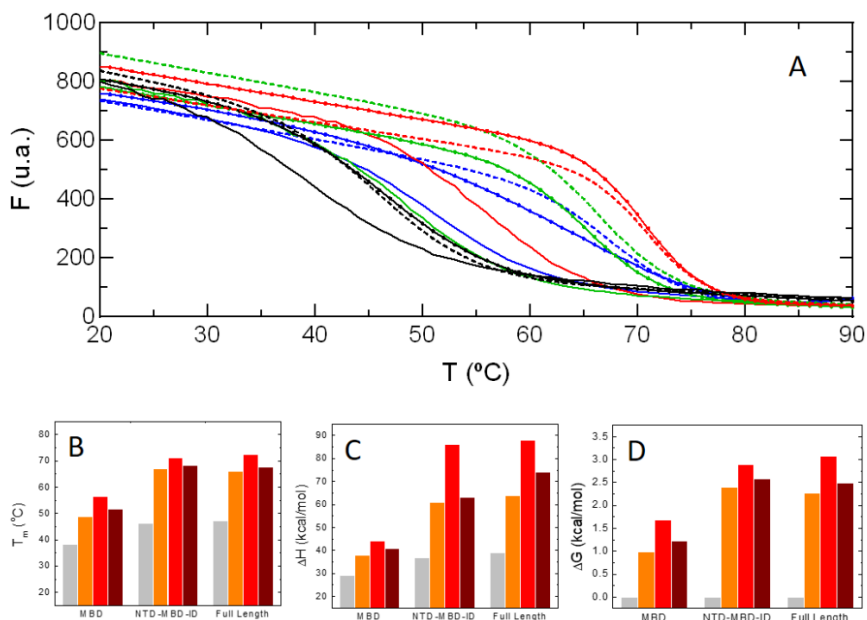


Figura 4.12. Desnaturalización térmica por fluorescencia de MeCP2 con dsDNA. (A) Desnaturalización térmica por fluorescencia de los constructos MBD (línea continua), NTD-MBD-ID (segmentos) y proteína completa (puntos) en ausencia de dsDNA (negro) o presencia de CpG-DNA (verde), mCpG-DNA (rojo) y hmCpG-DNA (azul). Todas las curvas de desplegamiento se ajustaron mediante un modelo de dos estados, excepto la de la proteína completa en presencia de hmCpG-DNA, que se ajustó con un modelo de tres estados. Mediante el ajuste no lineal de los datos de fluorescencia se estimaron los parámetros termodinámicos de la desnaturalización térmica: T_m (B), ΔH (C) y ΔG (F) asociado a cada proceso) de los constructos MBD), NTD-MBD-ID y proteína completa en ausencia (gris) o presencia de CpG-dsDNA (naranja), mCpG-dsDNA (rojo) o hmCpG-dsDNA (marrón).

Con cada una de las construcciones podemos ver que existe una jerarquía en la estabilización inducida por unión al ligando, siendo el dsDNA metilado el que ejerce una estabilización mayor, seguido del dsDNA hidroximetilado, y finalmente el dsDNA sin metilar. También vemos que estas diferencias entre las diferentes formas de DNA se ven exacerbadas al añadir los dominios desordenados NTD e ID, pero no aumentan más al añadir los dominios distales TRD, CTD α y CTD β (**figura 4.12, tabla 4.7**).

Curiosamente, los datos de fluorescencia de la desnaturalización térmica de la proteína completa en presencia de dsDNA hidroximetilado no se pudo ajustar correctamente con un modelo de una sola transición. Se utilizó un modelo que contempla tres estados, obteniendo dos T_m 's diferentes separadas por casi 10

°C. Esto podría ser indicativo de un mecanismo de desplegamiento diferente, o de que en las curvas medidas en presencia de dsDNA metilado y sin metilar se estén pasando por alto eventos que se solapan y aparentan ser una única transición con menor cooperatividad (entalpía de desplegamiento)(**figura 4.12, tabla 4.7**).

Tabla 4.7. Parámetros de estabilidad térmica por fluorescencia para MeCP2 completa y sus dos variantes truncadas MBD y NTD-MBD-ID (5 μ M) en ausencia y presencia de DNA (10 μ M) sin metilar (CpG-), metilado (mCpG-), e hidroximetilado (hmCpG-) a pH 7.

	DNA	T _m (°C)	Δ H(T _m) (kcal/mol)
MBD	--	38.4 \pm 0.3	29 \pm 1
	CpG-dsDNA	48.9 \pm 0.3	38 \pm 2
	mCpG-dsDNA	56.5 \pm 0.3	44 \pm 2
	hmCpG-DNA	51.6 \pm 0.3	41 \pm 2
NTD-MBD-ID	--	46.2 \pm 0.2	37 \pm 1
	CpG-dsDNA	64.5 \pm 0.1	60 \pm 2
	mCpG-dsDNA	71.2 \pm 0.2	86 \pm 4
	hmCpG-dsDNA	68.4 \pm 0.2	63 \pm 4
NTD-MBD-ID-TRD-CTD α -CTD β (MeCP2)	--	47.2 \pm 0.2	39 \pm 1
	CpG-dsDNA	65.9 \pm 0.1	64 \pm 2
	mCpG-dsDNA	72.5 \pm 0.2	88 \pm 2
	hmCpG-dsDNA	57.5 \pm 0.2	28 \pm 1
		67.6 \pm 0.2	74 \pm 4

4.2.2.2 Estudio global de la estabilización frente a la desnaturalización térmica medida por calorimetría.

El siguiente paso fue comprobar que este efecto local que hemos observado midiendo la fluorescencia del triptófano, que sólo nos da información sobre su entorno, es aplicable a la extensión completa de la proteína, e intentar ahondar en el mecanismo de desplegamiento y los posibles estados intermedios implicados. Para ello se llevaron a cabo ensayos de DSC con las construcciones MBD y NTD-MBD-ID, en presencia de los diferentes tipos de dsDNA.

Aunque el estudio del desplegamiento por calorimetría tiene muchas ventajas, en este caso concreto, existen varios contratiempos: la presencia y desnaturalización del dsDNA al aumentar la temperatura, que es muy energética y cuya transición se solapa con dos transiciones aparentes en la desnaturalización del constructo NTD-MBD-ID. Además, el gran contenido en desorden de la proteína completa (NTD-CTD β) hace que produzca muy poca señal en DSC, lo cual, acompañado con la tendencia a agregar y precipitar de la proteína a altas concentraciones, impide el estudio de las construcciones más grandes usando esta técnica.

Los ensayos con el MBD aislado formando complejo con los diferentes tipos de dsDNA presentan una primera etapa de desplegamiento de la proteína, que va presumiblemente acoplada a la disociación del complejo, y posteriormente se observa la desnaturalización del dsDNA en dos hebras, que coincide con el control realizado con el dsDNA sin proteína. Como ambos eventos ocurren a una temperatura tan diferente, podemos analizar cada uno de ellos por separado. En estos termogramas podemos observar algo muy parecido a lo que veíamos en la desnaturalización térmica seguida por la fluorescencia del triptófano: una estabilización inducida por la unión a DNA, siendo el dsDNA metilado el que provoca una mayor estabilización. Por su parte, no hay diferencias en la temperatura de desnaturalización de las diferentes variantes de dsDNA (**figura 4.13A**).

En las curvas obtenidas con el constructo NTD-MBD-ID podemos ver que la desnaturalización de la proteína ocurre en el mismo rango de temperaturas que

la desnaturalización del dsDNA, apareciendo una superposición parcial entre las transiciones. Comparando con la curva de desnaturalización del dsDNA solo, el primer evento que vemos debe corresponder a la disociación del complejo y la desnaturalización de la proteína. De nuevo, podemos ver que el dsDNA metilado es el que mayor efecto estabilizador induce, seguido del dsDNA hidroximetilado, y finalmente el dsDNA sin metilar. Cabe destacar que la entalpía de desplegamiento global es mucho mayor que la del dsDNA aislado, lo cual indica que hay una gran contribución del proceso de disociación del complejo, siendo menor la contribución del proceso de desplegamiento de la proteína (**figura 4.13B**).

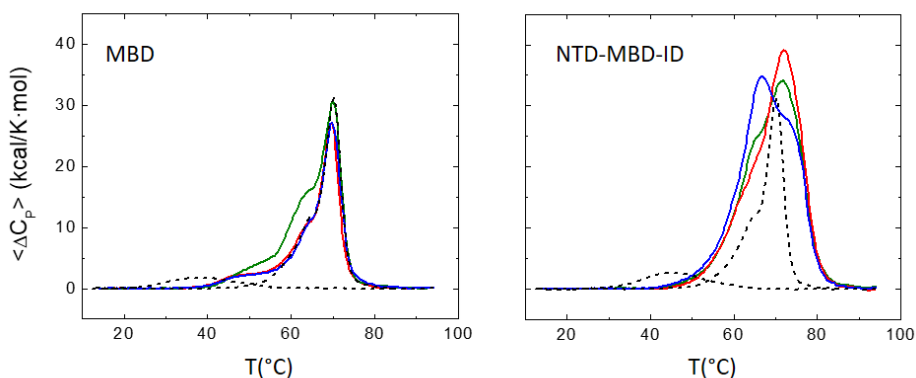


Figura 4.13. Desnaturalizaciones térmicas medidas por calorimetría diferencial de barrido de los constructos truncados de MeCP2: MBD (A) y NTD-MBD-ID (B) a pH 7 con una concentración de 20 μ M en ausencia de dsDNA (línea de puntos, transición a baja temperatura), y en presencia de CpG-dsDNA (verde), mCpG-DNA (rojo), y hmCpG-DNA (azul). La desnaturalización del CpG-DNA solo también se muestra en los dos gráficos (línea de puntos, transición a temperatura alta). Cada gráfico incluye un esquema representativo de los procesos asociados a cada transición.

Como hemos visto antes, la interacción del dsDNA con el constructo NTD-MBD-ID a 20 °C está marcada por una entalpía muy grande y negativa. La disociación del complejo a alta temperatura debe ir acompañada de una entalpía positiva y muy grande que es parte de la señal de desplegamiento del complejo (en el caso del MBD solo, la contribución entálpica a 20 °C es muy baja, y el

complejo se disocia a baja temperatura, de manera no acoplada al desplegamiento, de forma que esta entalpía de disociación es despreciable).

En el caso del desplegamiento del complejo NTD-MBD-ID con dsDNA metilado y sin metilar, podemos ver dos transiciones distinguibles, con diferencias en la temperatura de desplegamiento de menos de 5 °C, lo cual es menos pronunciado cuando se usa dsDNA metilado, indicando una mayor cooperatividad en el desplegamiento. De hecho, se puede calcular el índice de cooperatividad en el desplegamiento usando la razón de entalpías, $\Delta H_{cal}/\Delta H_{VH}$, obtenemos unos valores de 8.5, 9.5 y 10.5 para el dsDNA metilado, sin metilar e hidroximetilado, respectivamente. Por lo tanto, la menor cooperatividad estructural del complejo proteína-dsDNA corresponde al dsDNA hidroximetilado.

4.2.2.3 Estudio local de la estabilización frente a la desnaturalización química medida por fluorescencia.

La magnitud en la estabilización inducida por la unión de la proteína a dsDNA no se correlaciona con las diferencias entre las afinidades medidas por ITC, que son muy pequeñas en comparación con la gran estabilización obtenida frente a la desnaturalización térmica. Estas diferencias en efecto estabilizador se pueden justificar por las diferencias en la entalpía y la capacidad calorífica de la unión, que influyen en la dependencia de la temperatura en la constante de disociación y por tanto en el efecto de estabilización.

Para estudiar la desnaturalización a temperatura constante se realizaron medidas de la intensidad de fluorescencia del triptófano situado en el MBD a concentraciones crecientes de urea como desnaturalizante en presencia de dsDNA, donde se aprecia que la unión de dsDNA produce una estabilización sustancialmente grande en todos los casos.

Hay que tener en cuenta que la presencia de ID no sólo multiplica por 400 la afinidad de unión al dsDNA (de afinidad micromolar a afinidad

Tabla 4.8 Parámetros de desnaturalización química de las construcciones MBD and NTD-MBD-ID a pH 7, presencia de DNA sin metilar (CpG-), metilado (mCpG-), e hidroximetilado (hmCpG-), estimados analizando la dependencia de la concentración de desnaturalizante en la energía espectral media.

	DNA	ΔG_w (kcal/mol)	m (kcal/mol·M)	$[D]_{1/2}$
MBD	--	2.5	0.77	3.3
	CpG-dsDNA	2.7	0.68	3.9
	mCpG-dsDNA	3.2	0.67	4.8
NTD-MBD-ID	--	2.8	0.7	4.0
	CpG-dsDNA	4.2	0.72	5.9
	mCpG-dsDNA	7.6	0.97	7.8

$[D]_{1/2}$ es la concentración media de desnaturalizante. La energía de estabilización libre de Gibbs en ausencia de desnaturalizante se calcula a partir de $[D]_{1/2}$, según la relación $\Delta G_w = m [D]_{1/2}$

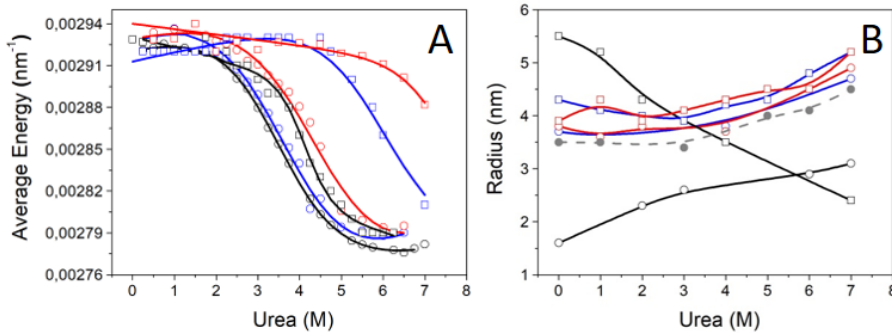


Figura 4.14 Estabilización frente a desnaturalización química de los constructos MBD y NTD-MBD-ID en presencia de dsDNA. Cálculo de energía espectral media (A) y radio hidrodinámico aparente medido por DLS (B) para el MBD (círculos) y NTD-MBD-ID (cuadrados), en ausencia (negro) o presencia de CpG-dsDNA (azul) o mCpG-dsDNA (rojo) y medida control del dsDNA sin proteína (gris) representado en función de la concentración de urea.

nanomolar), sino que también proporciona un sitio adicional de unión al dsDNA con afinidad micromolar (la magnitud del efecto estabilizador depende de la estequiometría de la interacción y de la afinidad de unión, entre otros factores). La interacción de MeCP2 con mCpG-dsDNA fue sorprendentemente estabilizadora para la proteína. De hecho, incluso a concentraciones elevadas de urea (es decir, $[D] > 6 \text{ M}$), una gran fracción de la proteína ($> 50\%$) parecía permanecer en su forma nativa (**figura 4.14A, tabla 4.8**).

Las curvas de desplegamiento pudieron analizarse empleando un modelo de desplegamiento con una sola transición, y los parámetros de desplegamiento se estimaron mediante un análisis de regresión no lineal por mínimos cuadrados, obteniendo datos que apoyan los resultados obtenidos en el análisis de la desnaturalización térmica seguida por fluorescencia. Esto indica que en ambos tipos de estrés, térmico y químico, el proceso de desplegamiento es similar, algo que en principio no está garantizado.

4.2.2.4 Estudio de las implicaciones estructurales de la unión de dsDNA

Para estudiar estructuralmente las diferencias entre los complejos formados por las construcciones de MeCP2 y el dsDNA de forma indirecta se han tomado dos enfoques: 1) determinación del tamaño del complejo mediante dispersión de luz dinámica (DLS), que nos dará una idea del radio hidrodinámico del complejo (tanto en estado nativo como durante el desplegamiento por estrés químico por aumento de concentración de urea), y 2) medidas de DC en la región UV lejano, para ver si hay una reconfiguración de la estructura secundaria de la proteína al unirse al dsDNA.

El radio hidrodinámico aparente de las dos construcciones, MBD y NTD-MBD-ID, se midió en diferentes condiciones: concentraciones crecientes de urea y en ausencia/presencia de dsDNA (**12b,c**). Los histogramas de tamaño mostraron valores medios y desviación estándar que varían con la concentración de urea. Además, se puede observar un efecto similar inducido por el dsDNA metilado

Tabla 4.9 Parámetros de dispersión dinámica de luz de los constructos MBD y NTD-MBD-ID a pH 7 en ausencia presencia de CpG-dsDNA y mCpG-ds DNA.

	DNA	Radius (nm)
MBD	--	1.6
	CpG-dsDNA	3.7
	mCpG-dsDNA	3.8
NTD-MBD-ID	--	5.5
	CpG-dsDNA	4.3
	mCpG-dsDNA	3.9
	CpG-dsDNA	3.5

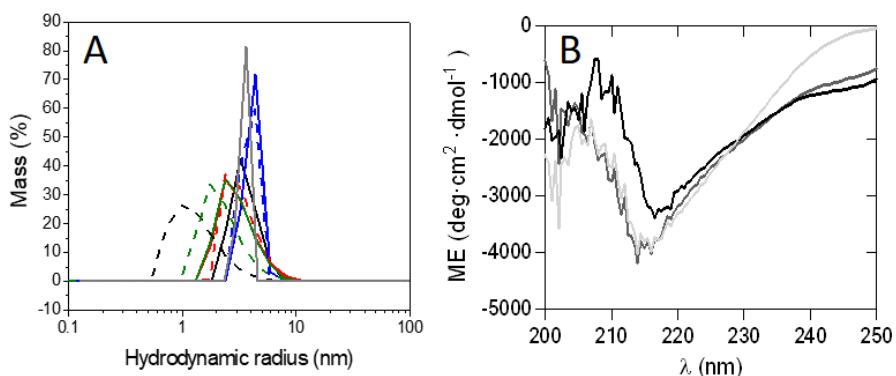


Figura 4.15 Implicación estructural de la formación del complejo MeCP2:dsDNA medido mediante DLS y DC. (A) Distribución del radio hidrodinámico del constructo MBD (línea discontinua) y NTD-MBD-ID (línea continua) solos (negro) o interaccionando con CpG-dsDNA (azul) o mCpG-dsDNA (rojo) medida control del dsDNA sin proteína (gris). (B) Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano del NTD-MBD-ID en ausencia (gris claro) y presencia (negro) de dsDNA. En gris oscuro se representa la suma de los espectros individuales de NTD-MBD-ID y dsDNA.

y no metilado. En ausencia de urea, el MBD mostró un radio hidrodinámico cercano al predicho a partir de su peso molecular (**figura 4.15A, tabla 4.9**). A medida que se aumenta la concentración de urea, el radio hidrodinámico aparente de MBD aumenta, como era de esperar en un proceso de desplegamiento, pero el radio hidrodinámico aparente de NTD-MBD-ID disminuye (**figura 4.14B**). Este resultado inesperado puede estar relacionado con la gran proporción de desorden, de residuos cargados y el aumento de la constante dieléctrica del disolvente cuando aumenta la concentración de urea, como se verá más adelante. La interpretación del pequeño aumento del radio hidrodinámico aparente de las dos construcciones con el aumento de la concentración de urea en presencia de dsDNA es difícil, ya que debe tratarse de una combinación de varios efectos: la estabilización inicial de la proteína por la interacción con el dsDNA se debilita debido a la reducción de la constante dieléctrica del disolvente (debilitamiento de las interacciones polares/electrostáticas entre la proteína y el dsDNA) y a la interacción preferente de la urea con los residuos de la proteína desplazando a las moléculas de agua, lo que conduce a la disociación del dsDNA y a la desestabilización y desplegamiento de la proteína.

Observando el espectro de DC de la proteína (NTD-MBD-ID) en ausencia y presencia de dsDNA podemos ver que hay un cambio de estructura asociado a la formación del complejo, ya que la suma de los espectros de la proteína y el DNA individuales no coincide con el espectro conjunto de ambas moléculas. Hay una disminución del contenido en lámina- β (218 nm) así como el contenido total en *random coil* (210 nm) en el espectro conjunto con respecto a la suma de espectros, lo cual puede significar que la formación del complejo implica la desestructuración parcial de una zona del MBD que contiene la lámina- β , pero las partes desordenadas se estructuran parcialmente (**figura 4.15B**).

Para resumir el estudio de la interacción de MeCP2 y el dsDNA y la contribución de cada dominio de la proteína en esta función, podemos decir que el MBD es el dominio esencial, que contiene el sitio de unión de alta afinidad por el dsDNA, y es capaz de discriminar en cierta medida entre el estado de

metilación de la doble hebra, aunque con una diferencia de afinidad que difícilmente explica un efecto biológico, o el efecto que vemos en los ensayos de estabilización. Los dominios desordenados flanqueantes al MBD tienen gran importancia en la estabilización y conformación del MBD. Además, en el ID se encuentra un segundo sitio de unión por el dsDNA, y su presencia mejora mucho la afinidad del MBD por el dsDNA, así como su capacidad de discriminación del estado de metilación del dsDNA. Los dominios distales no ejercen una gran influencia ni en la estabilidad global de la proteína, ni en su interacción con el dsDNA.

4.4 Caracterización biofísica de la unión de MeCP2 con histonas y efecto de la metilación en H3

De la función arquitectural en la cromatina llevada a cabo por MeCP2, y de su ubicación in vivo con nucleosomas, así como la coimmunoprecipitación junto a H3 que se observó en el estudio de (Thambirajah et al., 2012), se puede deducir que además de interactuar con DNA, MeCP2 podría interactuar con otros elementos del nucleosoma, en concreto con las histonas que lo conforman. Guiados por esta hipótesis quisimos comprobar si MeCP2 puede unirse a alguna de ellas, y comprobar si es capaz de leer (discriminar) la información epigenética contenida en sus modificaciones postraduccionales, en concreto, la trimetilación de la H3 en diferentes posiciones de lisina.

Para ello, se purificaron las cuatro histonas que conforman el octámero (H2A, H2B, H3 y H4) recombinantes en *E. coli*, que se utilizaron para los ensayos de interacción y caracterización estructural.

Para generar las variantes de H3 trimetiladas se purificaron mutantes de H3 con una sustitución de la lisina que se quiere metilar por una cisteína, y posteriormente se generó un modelo de metilación química, tal y como estaba descrito en la bibliografía.

Del estudio por dicroísmo circular de estas variantes se puede concluir que la mutación H3K27C no cambia apenas la estructura de la proteína, mientras que la trimetilación de la cisteína tiene como consecuencia un efecto mayor sobre esta estructura secundaria (**figura 4.16**).

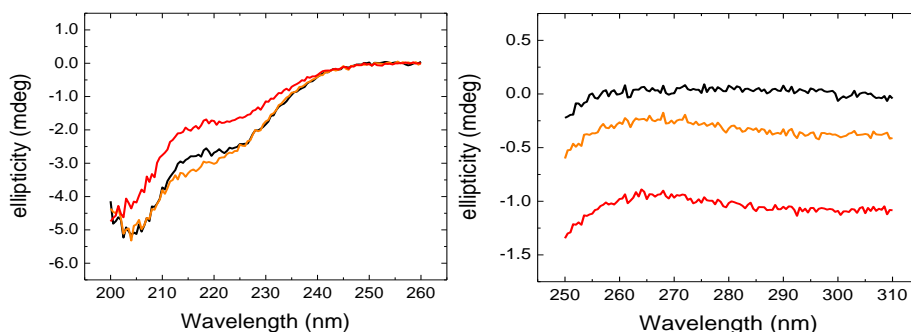


Figura 4.16. Espectros de dicroísmo circular de las variantes de H3. Espectros en el UV lejano (A) y cercano (B) para las proteínas H3 (negro), mutante H3K27C (naranja) y la variante metilada H3K27me3 (rojo).

4.4.1 Interacción de MeCP2 con H3

El primer indicio de la interacción entre MeCP2 y H3 se obtuvo precisamente mediante DC. Estudiando los espectros de CD en el UV lejano de ambas proteínas por separado y en conjunto, se puede ver que no coincide la suma de los espectros individuales con el espectro obtenido con la mezcla de ambas proteínas, indicando que hay una interacción con un cambio de estructura asociado. Los datos de UV cercano nos llevan a la misma conclusión, aunque con una interpretación más ambigua.

Una vez más se llevaron a cabo ensayos utilizando las diferentes construcciones truncadas de MeCP2, obteniendo espectros que sugieren una clara interacción también utilizando el MBD aislado. En la comparación de estos experimentos entre sí se puede observar que, al utilizar la proteína completa, el espectro obtenido en el complejo tiene una mayor elipticidad comparada con la suma de los espectros individuales, mientras que el espectro del complejo MBD-H3 presenta una menor elipticidad que los espectros individuales (**figura 4.17**).

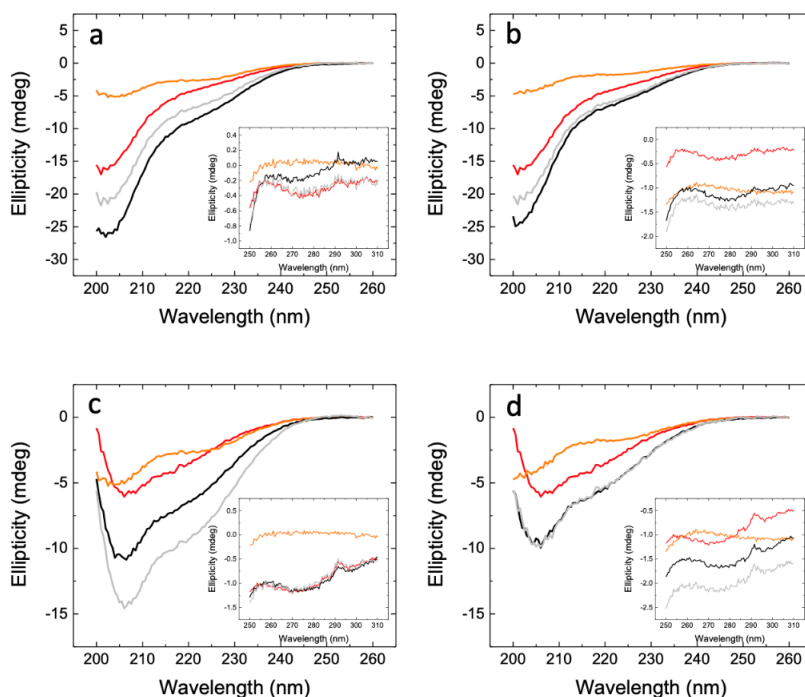


Figura 4.17. Interacción de MeCP2 con H3 por DC. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de las proteínas individuales H3 (naranja), variante de MeCP2 (rojo), y el complejo (negro). La suma de los espectros individuales de H3 y MeCP2 se muestra en gris. Los gráficos a y b muestran los espectros de la proteína MeCP2 completa mientras que c y d muestran los espectros del MBD. Los gráficos a y c muestran los espectros de H3 mientras que los gráficos b y d muestran los espectros de H3K27me3. Asociado a cada gráfico están los espectros de dicroísmo en el UV cercano.

Esto puede sugerir que la formación del complejo con el MBD tiene asociada cierta pérdida de estructura, y también puede estar relacionado con la diferencia de tamaño de ambas construcciones (MBD y proteína completa) o un cambio en la estequiometría de unión, tal y como se desarrollará más adelante. Un hallazgo importante fue que las diferencias entre los espectros son menores al utilizar la variante trimetilada H3K27me3, que es más evidente al utilizar el MBD aislado. Esto sugiere que la trimetilación en esta posición de H3 podría reducir la afinidad de unión.

Para estudiar de forma directa la interacción de MeCP2 con H3, se llevaron a cabo ensayos de ITC para determinar la afinidad entre cada una de las variantes, y conseguir el máximo de información sobre esta interacción. Atendiendo a

estos datos se puede ver que MeCP2 interacciona con H3 con alta afinidad (con una K_d en el rango nanomolar), y presenta dos sitios de unión. Estos dos sitios de unión tienen afinidades similares a baja fuerza iónica, pero son ligeramente diferentes al hacer los ensayos con fuerza iónica fisiológica. Al aumentar la fuerza iónica se reduce ligeramente la afinidad, pero no hay un cambio en la estequiometría (**figura 4.18, tabla 4.10**). Además, se puede ver que la trimetilación en la lisina 27 de H3 reduce la afinidad de esta interacción, tal y como se observó en los experimentos de DC.

Tabla 4.10. MeCP2 interacciona con H3. Parámetros de interacción de MeCP2 (proteína completa) interaccionando con H3 y H3 K27me3 a pH 7, 20 °C.

			K_a (M^{-1})	K_d (μM)	ΔH (kcal/mol)
MeCP2	H3	NaCl 20 mM	$3.6 \cdot 10^7$	0.028	-26.0
		NaCl 150 mM	$1.9 \cdot 10^7$ $1.1 \cdot 10^7$	0.053 0.093	1.5 -48.5
MeCP2	H3 K27me3	NaCl 20 mM	$2.1 \cdot 10^5$ $3.2 \cdot 10^4$	4.7 32	1.0 24.3
		NaCl 150 mM	$1.7 \cdot 10^5$	5.8	6.8

Tabla 4.11. MBD interacciona con las cuatro histonas nucleosomales. Parámetros de interacción de MBD interaccionando con con H2A, H2B, H3, y H4 a pH 7, 20 °C.

			K_a (M^{-1})	K_d (μM)	ΔH (kcal/mol)
MBD		H2A	$2.2 \cdot 10^7$	0.046	-31.9
		H2B	$1.8 \cdot 10^7$	0.057	-30.2
		H3	$2.0 \cdot 10^7$	0.050	-19.0
		H4	$2.7 \cdot 10^7$	0.037	-56.0

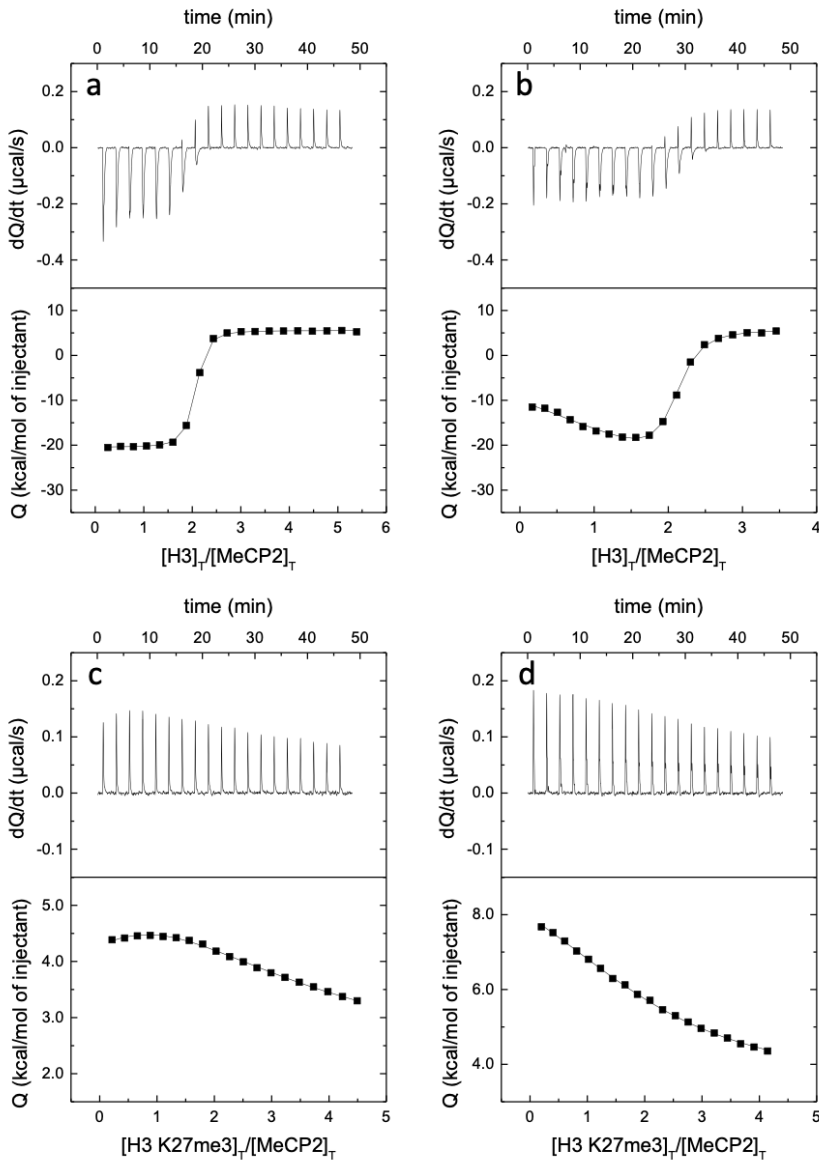


Figura 4.18 Interacción de MeCP2 con H3 por ITC. Se muestran las titulaciones calorimétricas de la proteína completa MeCP2 con H3 (a y b) y con H3K27me3 (c y d). Los ensayos han sido realizados con baja fuerza iónica (20 mM cloruro sódico, a y c) y alta fuerza iónica (200 mM cloruro sódico, b y d). Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso.

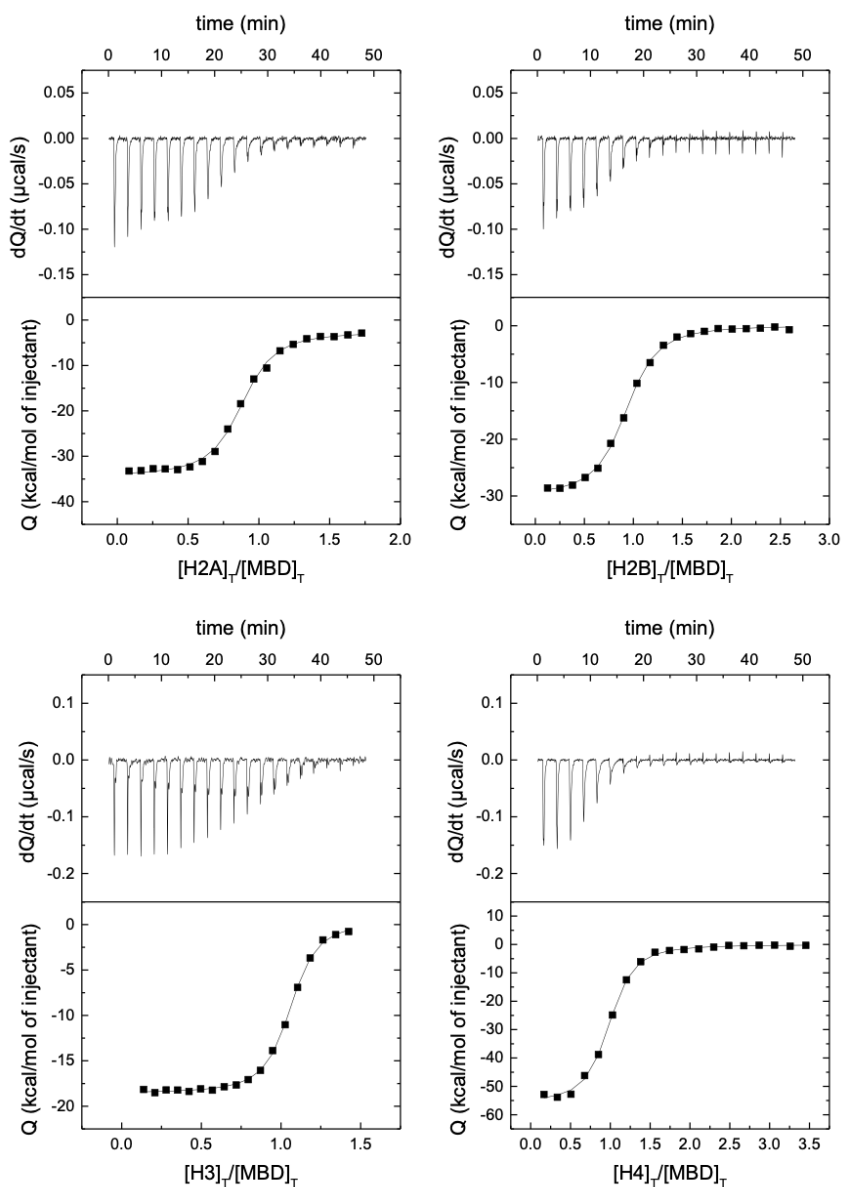


Figura 4.19. Interacción del MBD con las histonas canónicas por ITC. Titulaciones calorimétricas del MBD frente a H2A (A), H2B (B), H3 (C) y H4 (D). Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso.

4.4.2 Interacción de MeCP2 con H2A, H2B, H3 y H4 mediante el MBD.

Aunque se suele considerar que el MBD es responsable de la interacción con dsDNA y los dominios de MeCP2 implicados en interacciones con otras proteínas o complejos proteicos son los dominios distales (TRD-CTD), los datos de DC indicaron que el MBD aislado es capaz de unirse a H3 y, además, de forma dependiente del estado de metilación. Para ahondar en este hecho, evaluamos la capacidad del MBD de interactuar con cada una de las histonas que forman el octámero de los nucleosomas: H2A, H2B, H3 y H4. En estos ensayos se puede ver que el MBD es capaz de formar un complejo con cada uno de los cuatro tipos de histonas, y esta interacción está marcada por una alta afinidad, una estequiometría de interacción 1:1 y una interacción muy exotérmica. La mayor de las afinidades se produce con la histona H4 ($K_d = 37$ nM) mientras que la afinidad más baja aparece con la histona H2B ($K_d = 57$ nM) (figura 4.19, tabla 4.11).

4.4.3 Interacción de MeCP2 con las variantes trimetiladas de H3

La posición de la lisina en la que ocurre la metilación en el contexto de la histona H3 tiene grandes consecuencias a nivel biológico: mientras que las marcas H3K4me3 y H3K36me3 se asocian a genes activamente transcritos, H3K9me3 y H3K27me3 se asocian a represión transcripcional. Dado que MeCP2 tiene un papel ambivalente en cuanto a la regulación transcripcional, y es capaz de unirse a H3 de manera dependiente del estado de metilación en la posición 27, parecía importante estudiar si la metilación en otras posiciones afecta a la unión de MeCP2, y de qué manera.

Partiendo de que las consecuencias de esta metilación son pocas para en la estructura de H3, quisimos estudiar cómo afecta la trimetilación a cada una de las cuatro lisinas que hay en la cola de la histona a la interacción con el MBD.

Los ensayos de ITC reflejaron que la trimetilación en K4 y K9 afecta muy poco a la interacción de H3 con el MBD de MeCP2, mientras que cuando la trimetilación ocurre en K27 y K36, las lisinas más próximas al núcleo de la histona y al DNA nucleosomal, la afinidad por el MBD se redujo considerablemente (figura 4.20, tabla 4.12).

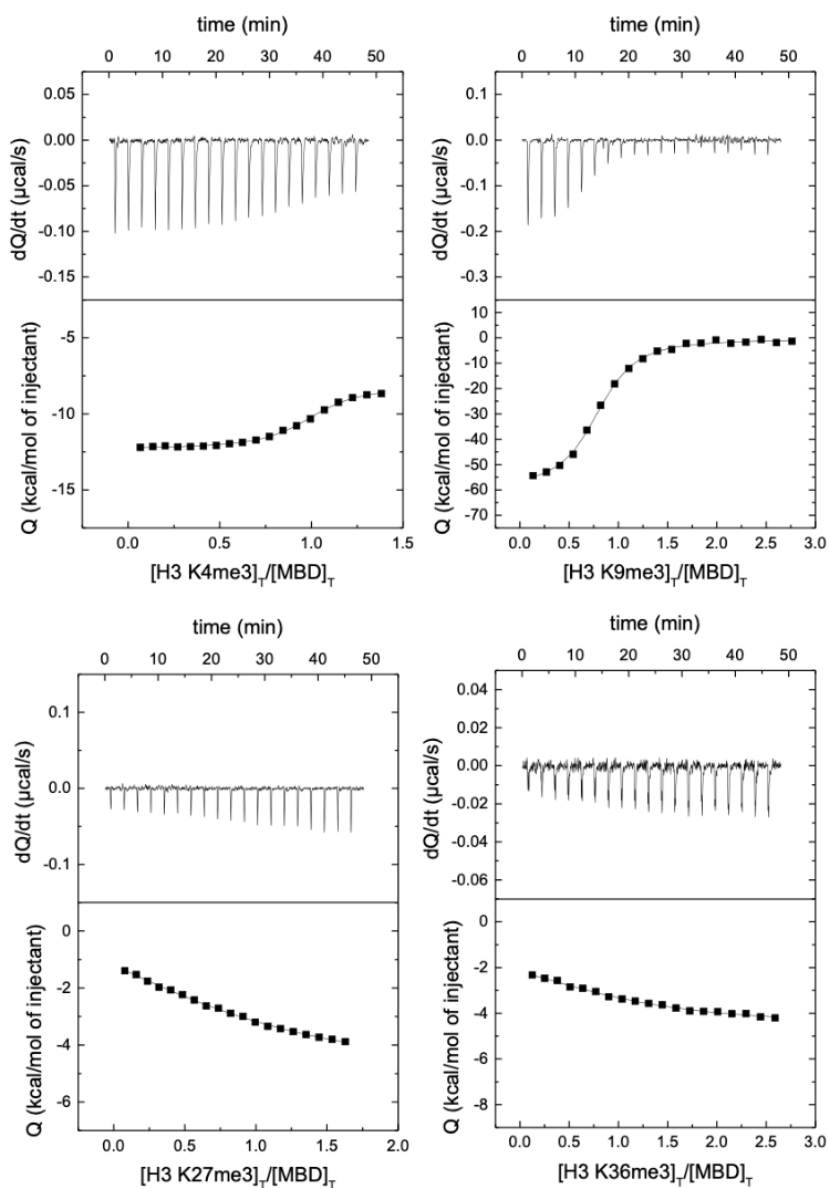


Figura 4.20. Interacción del MBD con H3 trimetilada en lisina en diferentes posiciones por ITC. Titulaciones calorimétricas del MBD frente a H3 trimetilada en la lisina K4 (A), K9 (B), K27 (C) y K36 (D). Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso.

Tabla 4.12. MBD interacciona con variantes de H3 trimetiladas en lisinas. Parámetros de interacción de MBD interaccionando con H3 trimetilada en K4, K9, K27, y K36 a pH 7, 20 °C.

		K_a (M^{-1})	K_d (μM)	ΔH (kcal/mol)
MBD	H3	$2.0 \cdot 10^7$	0.050	-19.0
	H3 K4me3	$8.4 \cdot 10^6$	0.12	-4.1
	H3 K9me3	$1.3 \cdot 10^7$	0.075	-59.0
	H3 K27me3	$1.7 \cdot 10^5$	5.9	7.0
	H4 K36me3	$3.3 \cdot 10^5$	3.1	4.0

Teniendo en cuenta que la metilación en la cola de la histona afectó a la interacción con el MBD, parece que es precisamente ese dominio de la histona el que interacciona con MeCP2. Para estudiar esta interacción aislada del núcleo, se diseñaron unos péptidos de 11 residuos cada uno, centrados en la lisina 27 de H3, uno de ellos albergando una trimetilación en dicha lisina. El objetivo era estudiar la interacción intrínseca del MBD con estos péptidos sin influencia ni restricciones conformacionales existentes en la histona completa, y reducir las partes móviles de H3 para intentar conseguir una estructura cristalográfica del complejo que nos diese más información, aunque esto último no se ha conseguido.

En los ensayos de ITC se observó poca diferencia entre la afinidad del MBD por cada uno de los péptidos, habiendo entonces un efecto de la trimetilación mucho menor que en los ensayos con la proteína completa. Mientras que la trimetilación de esta lisina produce una reducción >100 veces mayor, al utilizar los péptidos solo se observa una reducción de ≈ 3 veces (con una K_d de $3.4 \mu M$ para el péptido sin metilar y de $12 \mu M$ para el péptido trimetilado) (**figura 4.21**). Además, la afinidad del MBD por el péptido sin metilar es mucho menor que por la H3 completa. Esto puede indicar que el MBD no sólo interacciona con esta porción de la cola histónica, sino que también crea contactos con el núcleo de la histona, y que las restricciones estructurales que impone el resto de la H3 sobre su cola, y que están afectadas por esta trimetilación (tal y como indican los datos de DC), son importantes para el reconocimiento por parte del MBD. De esta forma, la región correspondiente al péptido adoptaría una estructura

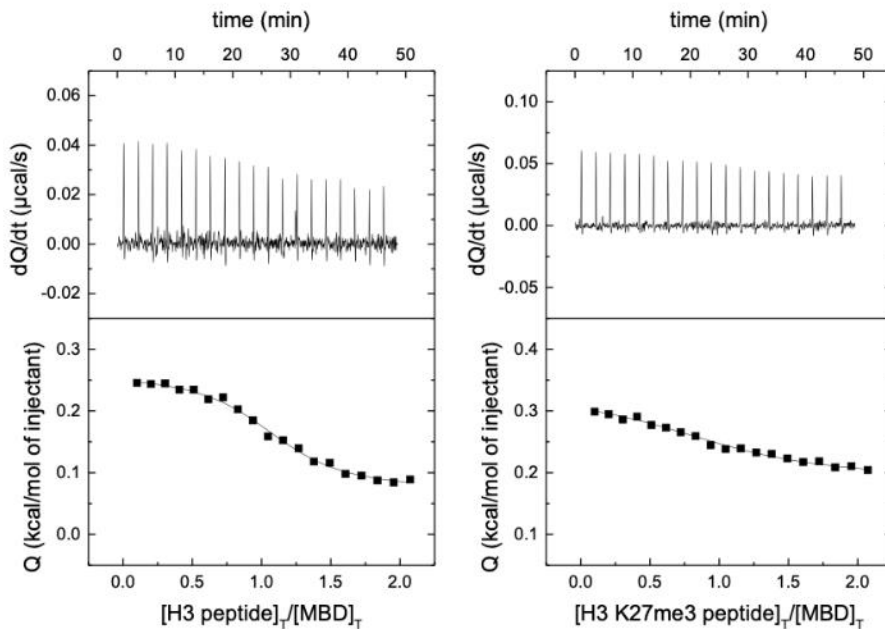


Figura 4.21. Interacción del MBD con péptidos derivados de H3 por ITC. Titulaciones calorimétricas del MBD frente a péptido derivado de la cola de H3 sin metilar (A) y metilado (B). Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso.

tridimensional que favorecería la interacción con MeCP2 en el contexto de la proteína completa, hecho que no ocurriría cuando el péptido se encuentra aislado y es más flexible. De hecho, según la base de datos AlphaFold, esta región, cercana a K27 podría adoptar estructura de α -hélice de forma transitoria.

4.4.4 Interacciones ternarias MBD, DNA y H3

Teniendo en cuenta que MeCP2 actúa en el contexto del núcleo, como una proteína multifuncional que recluta y genera complejos con diversos participantes (ej. unión a zonas metiladas y reclutamiento de represores transcripcionales) y su capacidad de leer metilación tanto a nivel de DNA como de histonas, el siguiente paso fue estudiar como interaccionan estos tres

elementos: MeCP2, DNA y H3, poniendo el foco en el efecto de la metilación en la citosina del DNA, y en la trimetilación en H3K27. Los resultados de ITC mostraron que H3 es capaz de interactuar con el complejo preformado de MBD:DNA (con una K_d de $0.1 \mu\text{M}$), pero la trimetilación de la histona en K27 elimina esta interacción (**figura 4.22**).

Al hacer el ensayo con el complejo preformado MeCP2:H3, se utilizó la construcción NTD-MBD-ID, ya que es la más apropiada para estudiar para estudiar la interacción con el DNA. Los resultados muestran que la interacción de este complejo tiene una afinidad 20 veces mayor por el mCpG-DNA ($K_d = 23 \text{ nM}$) comparado con el CpG-DNA ($K_d = 410 \text{ nM}$) (**figura 4.22**). Esto indica que el sitio de unión por el DNA del MBD sigue estando accesible después de la interacción con H3, aunque no el segundo sitio de unión, y aun así la capacidad de discriminación de MeCP2 del estado de metilación del DNA mejora considerablemente cuando está formando complejo con H3, ya que la diferencia de afinidades es solamente de un factor ~ 3 cuando no está presente la histona. Esto aclara un poco las causas de los resultados in vitro de afinidad y discriminación por DNA metilado y no metilado, y el efecto que se observa in vivo: MeCP2 aparece in vivo muy enriquecida en zonas metiladas, lo cual no era explicable por la pequeña diferencia de afinidades medidas previamente in vitro. La presencia de factores adicionales (en este caso, H3) aumenta la capacidad de discriminación y la interacción preferente con DNA metilado.

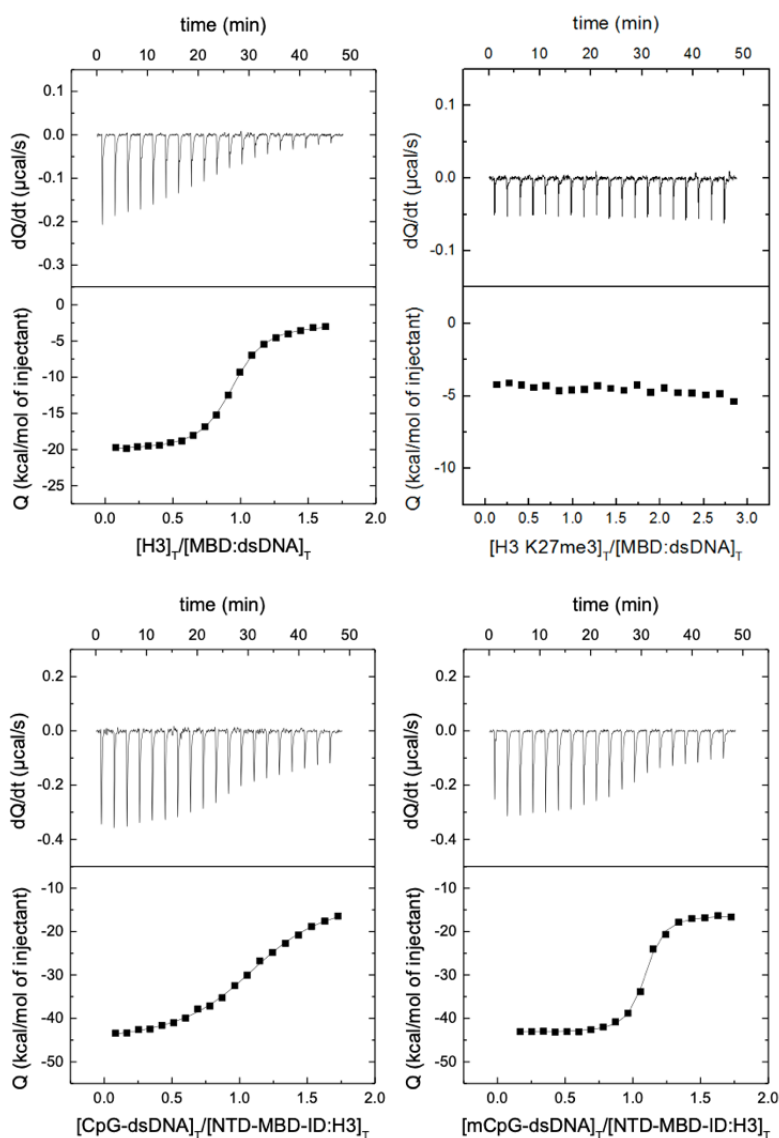


Figura 4.22. Interacciones ternarias del MBD con H3 y dsDNA por ITC. (Arriba) Titulaciones calorimétricas de H3 interactuando con el complejo binario MBD:dsDNA, observando el efecto de la trimetilación de la lisina 27 de H3 en dicha interacción. (abajo) Titulaciones calorimétricas de CpG- y mCpG-dsDNA interactuando con el complejo binario NTD-MBD-ID:H3, observando el efecto de la metilación del dsDNA en dicha interacción. Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso.

4.5 Efecto de las mutaciones causantes de RTT.

Las mutaciones en el gen que codifica la proteína MeCP2 son causantes de diferentes enfermedades, entre las que destaca RTT. Estas mutaciones pueden afectar a diversos parámetros relacionados con la patología, entre los que se encuentran los niveles de expresión, la estabilidad biofísica y biológica, la tendencia a agregación y/o degradación, la estructura o la capacidad de unirse a los diversos *partners* biológicos (que en el caso de MeCP2 son muy numerosos). Nuestro objetivo en esta parte del proyecto es determinar el efecto deletéreo que pueden tener las mutaciones asociadas a RTT en las características que son accesibles: estabilidad, estructura, afinidad por los diferentes *partners*, y capacidad de discriminación entre las diferentes marcas epigenéticas leídas por MeCP2.

Para ello, se seleccionaron dos de las mutaciones de MeCP2 más relevantes implicadas en el desarrollo de RTT: R106W y R133C. Con ese fin se diseñaron, expresaron en *E. coli BL21*, y se purificaron mediante cromatografía de afinidad variantes de los constructos MBD y NTD-MBD-ID con esas mutaciones, lo que nos permitió estudiar el posible impacto desestabilizador de esas mutaciones y evaluar la capacidad de interactuar con dsDNA e histonas.

La comparación de estas dos mutaciones es interesante porque en ambos casos se trata de una sustitución de arginina por un aminoácido de diferente tamaño y polaridad (triptófano frente a cisteína) localizado en dos regiones diferentes de la proteína (opuesta al sitio de unión, dentro del núcleo de plegamiento del MBD, frente a la superficie del sitio de unión al DNA, respectivamente) con resultados patológicos muy diferentes (puntuación de gravedad clínica grave frente a leve, respectivamente).

4.5.1 Efecto de las mutaciones RETT sobre la estructura y estabilidad de la proteína:

Para estudiar el efecto de las mutaciones sobre la estructura secundaria de la proteína, se realizaron ensayos de dicroísmo circular para determinar cómo

alteran la estructura secundaria MBD de MeCP2 las mutaciones causantes de RTT. Se llevaron a cabo las medidas utilizando variantes mutantes del MBD y NTD-MBD-ID para determinar el efecto de las mutaciones en cada uno de los contextos, teniendo en cuenta el conocimiento previo.

El espectro de DC lejano del dominio MBD WT mostraba dos regiones típicas de lámina- β y *random coil* (alrededor de 209 nm) y hélice- α (alrededor de 222 nm). Los mutantes de la construcción con el MBD solo parecían conservar su estructura secundaria, con una proporción similar de hélice- α y lámina- β , aunque con menor intensidad de señal, lo cual puede indicar alguna perturbación en la estructura que afecte en igual medida a ambos tipos de estructura secundaria (**figura 4.23A**). Además, el mutante R106W muestra una banda positiva alrededor de los 230 nm, producido por la presencia del triptófano adicional (Vuilleumier et al., 1993).

Tal y como cabía esperar, los espectros de DC en el ultravioleta lejano de las construcciones mutantes conteniendo los dominios NTD-MBD-ID eran similares en cuanto a la forma, pero con menor intensidad al normalizar por el número de residuos, indicando que los dominios flanqueantes siguen desordenados, de la misma manera que ocurre en las construcciones WT. Sin embargo, los cambios en la estructura secundaria causados por las mutaciones son más visibles en los espectros de las construcciones con los dominios desordenados: La ubicación del mínimo en el espectro de DC del mutante R106W se desplazó a longitudes de onda significativamente mayores, mientras que el mínimo en la señal del mutante R133C se desplazó a longitudes de onda menores, indicando que las dos mutaciones tienen un impacto diferente en la estructura secundaria del MBD rodeado de dominios desordenados. Además, en el espectro del mutante R106W NTD-MBD-ID también aparece una banda sobre los 230 nm, comparado al WT, aunque con menor señal que en el MBD (**figura 4.23B**).

Para estudiar el efecto de las mutaciones sobre la estabilidad de estos constructos, al igual que en los apartados anteriores, se hicieron ensayos de estabilidad frente a desnaturalización térmica seguidos por fluorescencia.

En las construcciones del MBD aislado podemos ver que la mutación R106W ejerce un efecto estabilizador, aumentando la T_m en varios grados, aunque, sorprendentemente, este proceso estaba acompañado de una reducción significativa en la entalpía de desplegamiento, lo cual indica que la cooperatividad de desplegamiento está reducida. Por su parte, la mutación R133C apenas cambia la estabilidad de la proteína, en comparación con el MBD WT, por lo que su efecto deletéreo debe estar provocado por la funcionalidad de la proteína y no por su estabilidad (**figura 4.23C, tabla 4.13**).

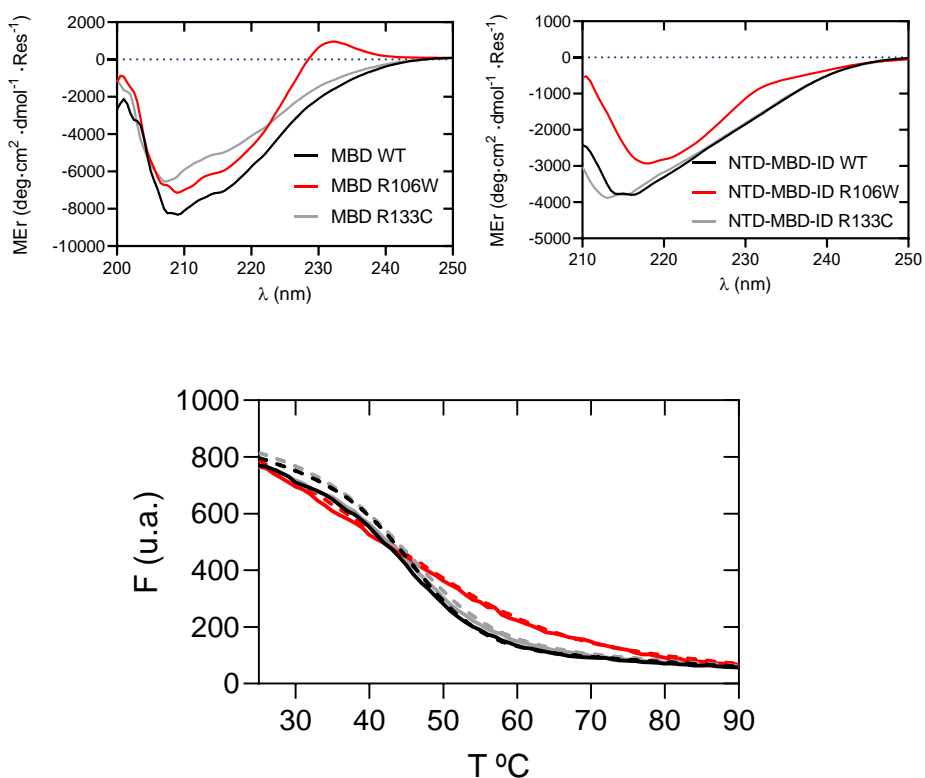


Figura 4.23. Efectos estructurales de las mutaciones asociadas a RTT. Espectros de la señal de dicroísmo circular en el UV-lejano de las mutaciones R106W y R133C en comparación con el WT para las construcciones truncadas de MeCP2 MBD (A) y NTD-MBD-ID (B). (C) Desnaturalización térmica de las variantes mutantes truncadas de MeCP2: MBD (línea continua) y NTD-MBD-ID (línea discontinua) de las proteínas WT (negro) R106W (rojo) y R133C (gris) a pH 7. Todas las curvas se ajustaron a un modelo de regresión no lineal de desnaturalización de dos estados.

Tabla 4.13. Parámetros de estabilidad térmica para los mutantes MeCP2 en sus dos variantes truncadas MBD y NTD-MBD-ID a pH 7.

	Mutante	$\Delta H(T_m)$ (kcal/mol)	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
MBD	WT	29 ± 1	38.4 ± 0.3	
	R106W	14.8 ± 0.7	51.6 ± 1.6	13.2
	R133C	26 ± 1	39.2 ± 0.5	0.8
NTD-MBD-ID	WT	37 ± 0.7	46.2 ± 0.2	
	R106W	11 ± 3	43.1 ± 0.4	-3.1
	R133C	34.1 ± 0.1	45.8 ± 0.2	-0.4

En consonancia con los datos de las construcciones WT y con las construcciones mutantes del MBD, la desnaturalización térmica de los constructos mutantes de NTD-MBD-ID mostró que los parámetros de desplegamiento del mutante R133C son muy similares al WT, presentando una mayor estabilidad que el constructo sin los dominios desordenados. En cambio, en el caso del mutante R106W vemos que la adición de estos dominios hace desaparecer el efecto estabilizante de la mutación que veíamos en los constructos del MBD aislado, obteniéndose una T_m de varios grados menor, y una menor entalpía de desplegamiento que en la construcción WT (**figura 4.23C, tabla 4.13**).

4.5.2 Sobre la unión a DNA: ITC

Una vez estudiado el efecto de las mutaciones sobre la estabilidad de la proteína, pasamos a estudiar el efecto deletéreo de las mutaciones causantes de RTT en la afinidad por el dsDNA y la capacidad de discriminación entre los diferentes estados de (hidroxi)metilación.

En los ensayos realizados utilizando las construcciones mutantes del MBD aislado se pudieron observar varias cosas interesantes. El mutante R106W se une al dsDNA con afinidad moderada (K_d en el rango submicromolar) tal y como ocurría con el MBD WT, aunque con características distintivas: la unión

está dirigida de forma entrópica, con un componente entálpico marcadamente desfavorable, y con un intercambio neto de 2-3 protones con la solución, indicando que al menos tres grupos ionizables están implicados en este intercambio. También vemos un ligero aumento en la afinidad por el dsDNA en todas sus variantes, aunque la capacidad de discriminar entre dsDNA metilado y sin metilar desaparece, conservándose la capacidad de discriminar el dsDNA hidroximetilado (**figura 4.24, tabla 4.14**).

Tabla 4.14. Interacción de mutantes MBD con dsDNA por ITC. Parámetros de unión independientes del tampón para la interacción de los diferentes mutantes MeCP2 asociados al síndrome de Rett con dsDNA no metilado (CpG-), metilado (mCpG-) e hidroximetilado (hmCpG-) a pH 7 y 20 °C.

		K_d	ΔG_B	ΔH_B	$-T\Delta S_B$	Δn_H
		(nM)	(kcal/mol)	(kcal/mol)	(kcal/mol)	
MBD	CpG-DNA	450	-8.5	0.8	-9.3	-2.4
	mCpG-DNA	240	-8.9	1.5	-10.4	-2.1
	hmCpG-DNA	630	-8.3	-21.6	13.3	
MBD R106W	CpG-DNA	110	-9.3	16.7	-26.0	-2.7
	mCpG-DNA	95	-9.4	16.0	-25.4	-2.6
	hmCpG-DNA	250	-8.9	8.6	-17.5	0.07
MBD R133C	CpG-DNA	--	--	--	--	--
	mCpG-DNA	--	--	--	--	--
	hmCpG-DNA	1000	-8.0	-2.2	-5.8	-0.81

El error relativo en K_d es del 15%, el error absoluto en ΔG_B es de 0.1 kcal/mol, el error absoluto en ΔH_B y $-T\Delta S_B$ es 0.5 kcal/mol.

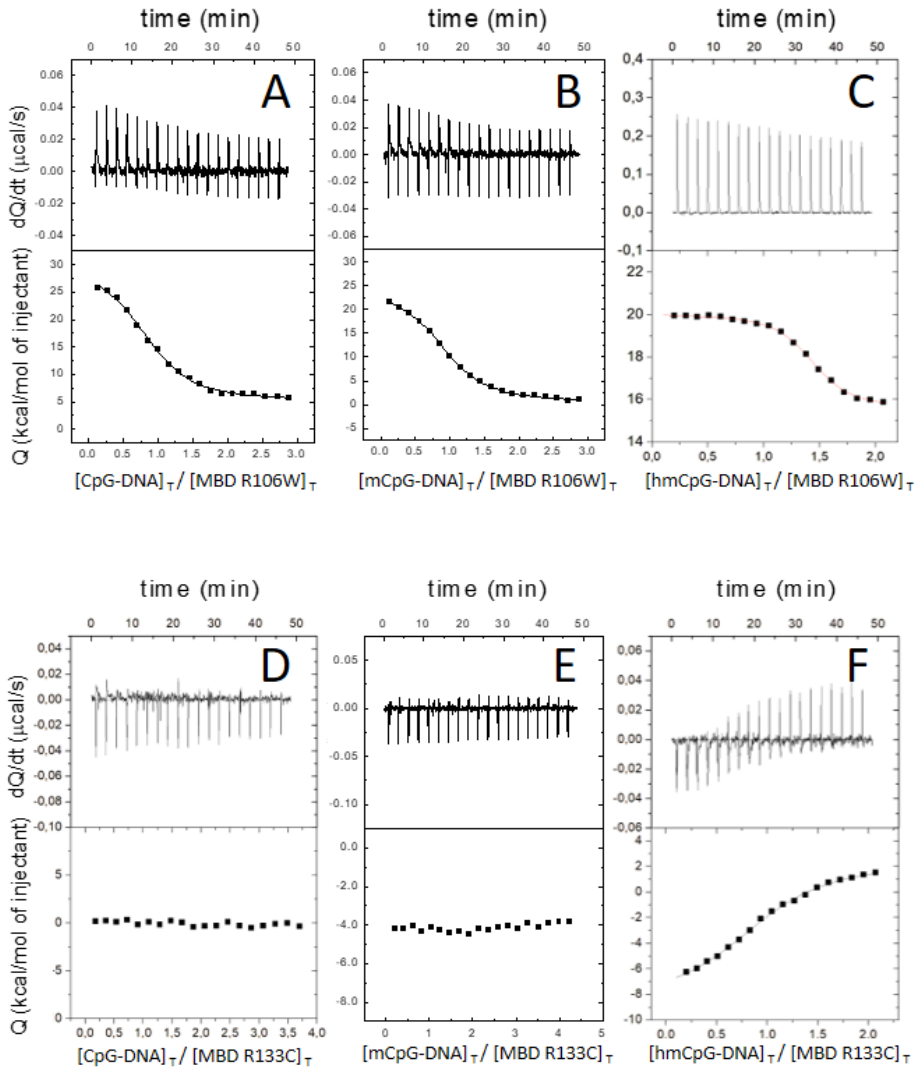


Figura 4.24. Interacción de MBD con mutaciones RTT con el dsADN mediante ITC. Interacción del constructo MBD con la mutación R106W (arriba) y R133C (abajo) con CpG-ADN (A,D), mCpG-ADN (B, E) y hmCpG-ADN (C,F) mediante ITC. Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso.

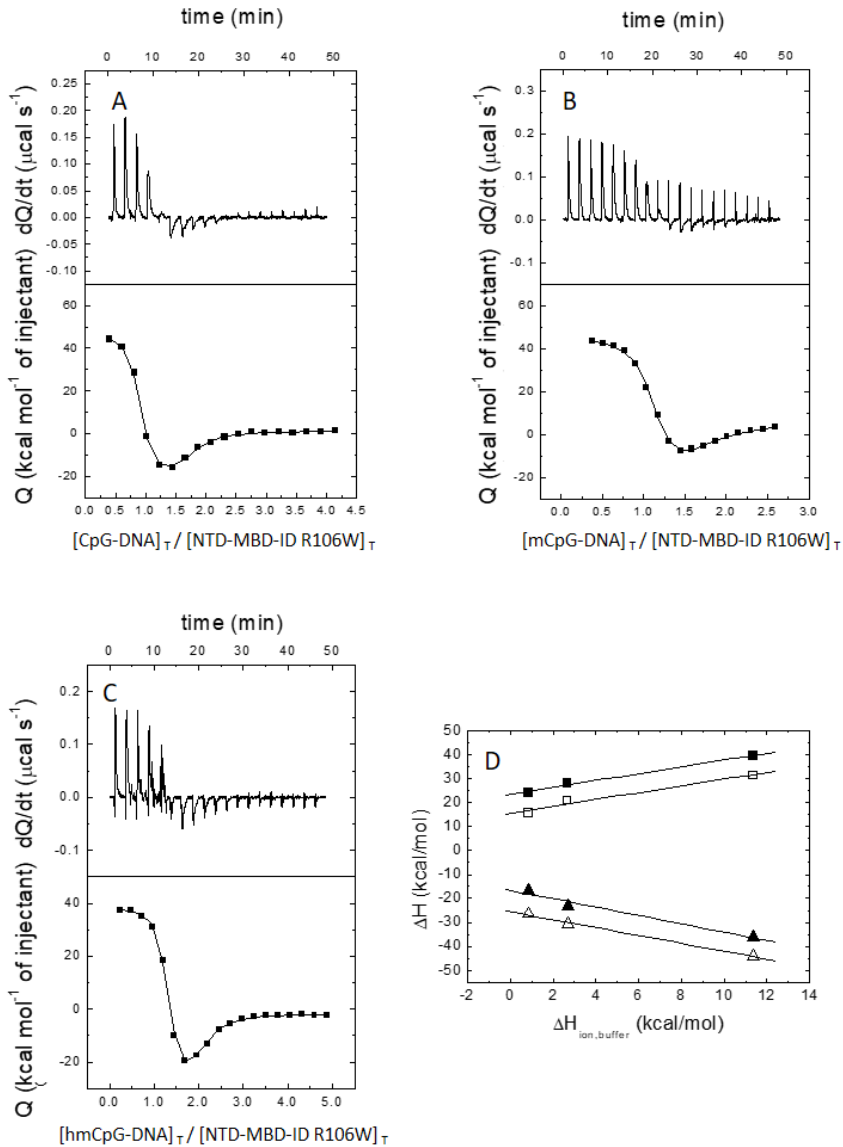


Figura 4.25. Interacción de NTD-MBD-ID con mutaciones RTT con el dsADN. Interacción del constructo MBD con la mutación R106W con CpG-ADN (A), mCpG-ADN (B) y hmCpG-ADN (C) mediante ITC. Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso. La capacidad calorífica asociada a la unión al CpG-ADN (círculos), mCpG-ADN (cuadrados) y hmCpG-ADN (triángulos) se determinó mediante la realización del experimento a diferentes temperaturas (D) La entalpía del proceso independiente del tampón y el número de protones intercambiados en la unión para los tres ligandos fue estimada realizando experimentos con diferentes entalpías de unión (E)

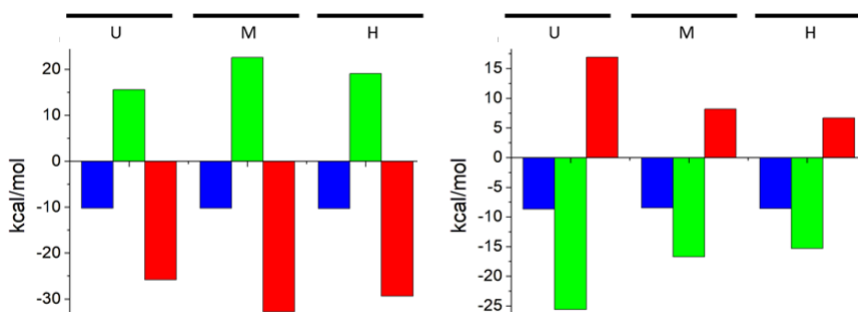


Figura 4.26. Parámetros termodinámicos de la interacción del constructo NTD-MBD-ID con la mutación R106W con CpG-DNA (U), mCpG-DNA (M) y hmCpG-DNA (H) independiente del tampón. Energía libre de Gibbs desglosada en sus componentes entálpicas y entrópicas, para el sitio de alta afinidad (izquierda) y baja afinidad (derecha).

La interacción del mutante R133C del MBD con el dsDNA metilado y sin metilar no ha podido ser medida en ninguna de las condiciones experimentales que hemos utilizado. Sin embargo, la afinidad medida por el dsDNA hidroximetilado fue similar a la del WT. Esto apoya la idea de que el mecanismo de unión del dsDNA hidroximetilado es diferente al del resto de dsDNA, y pone el foco en la importancia del residuo R133 en la unión por el dsDNA metilado y sin metilar (**figura 4.24, tabla 4.14**).

Tal y como ocurría con MBD WT, la adición de los dominios desestructurados flanqueantes modificó completamente la interacción. En todos los casos vimos un aumento de la afinidad en el MBD y la aparición del segundo sitio de unión a dsDNA. La presencia del ID aumentó la afinidad del MBD en la construcción R106W NTD-MBD-ID, pero ese incremento (~ 3 veces) es muy pequeño en comparación con lo observado en el WT (~ 400 veces mayor), de forma que la afinidad sigue en el mismo rango (submicromolar). Observamos que, para este mutante, la afinidad con el dsDNA sin metilar es mayor que para el dsDNA modificado, y apenas hay diferencias entre la afinidad por el estado de metilación o hidroximetilación (**figura 4.25, tabla 4.15**). Las contribuciones entálpicas y entrópicas cambian drásticamente, indicando que el tipo de uniones

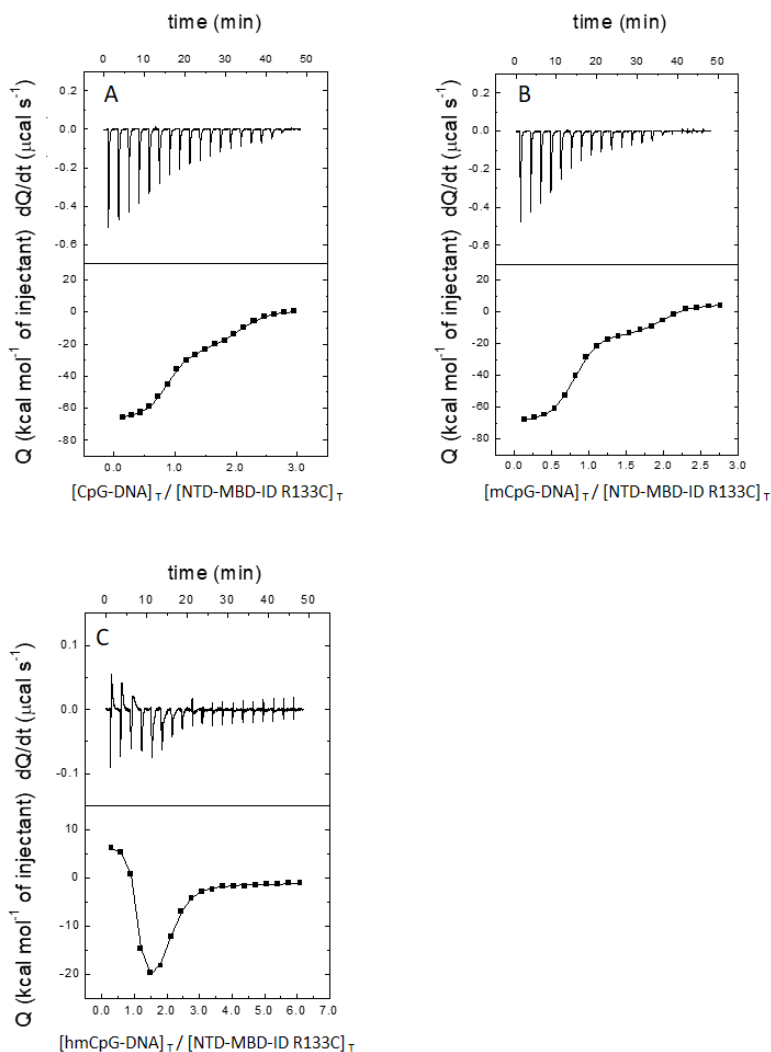


Figura 4.27. Interacción de NTD-MBD-ID con mutaciones RTT con el dsADN. Interacción del constructo MBD con la mutación R133C con CpG-ADN (A), mCpG-ADN (B) y hmCpG-ADN (C) mediante ITC. Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso. La capacidad calorífica asociada a la unión al CpG-ADN (círculos), mCpG-ADN (cuadrados) y hmCpG-ADN (triángulos) se determinó mediante la realización del experimento a diferentes temperaturas (D) La entalpía del proceso independiente del tampón y el número de protones intercambiados en la unión para los tres ligandos fue estimada realizando experimentos con diferentes entalpías de unión (E).

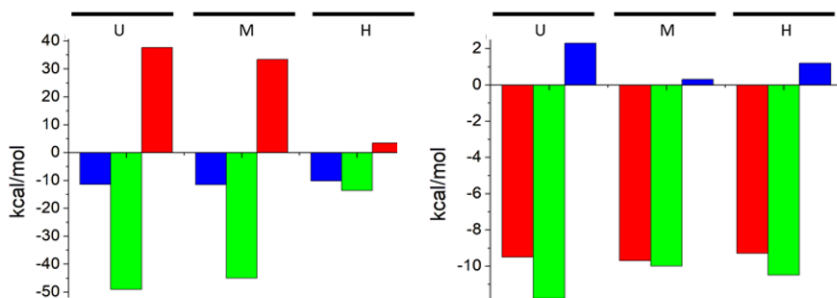


Figura 4.28. Parámetros termodinámicos de la interacción del constructo NTD-MBD-ID con la mutación R133C con CpG-DNA (U), mCpG-DNA (M) y hmCpG-DNA (H) independiente del tampón. Energía libre de Gibbs desglosada en sus componentes entálpicas y entrópicas, para el sitio de alta afinidad (izquierda) y baja afinidad (derecha).

Tabla 4.15. Parámetros de unión independientes del tampón para la interacción de los diferentes mutantes MeCP2 asociados al síndrome de Rett con dsDNA no metilado (CpG-), metilado (mCpG-) e hidroximetilado (hmCpG-) a pH 7 y 20°C.

		K_d (nM)	ΔG_B (kcal/mol)	ΔH_B (kcal/mol)	$-T\Delta S_B$ (kcal/mol)
NTD-MBD-ID	CpG-DNA	1.9	-11.7	-54.6	42.9
		250	-8.9	-7.6	-1.3
	mCpG-DNA	0.56	-12.4	-48.4	36.0
		62	-9.7	-2.1	-7.6
	hmCpG-DNA	1.2	-12.0	-40.6	28.6
		71	-9.6	-2.0	-7.6
NTD-MBD-ID R106W	CpG-DNA	27	-10.2	15.6	-25.8
		320	-8.7	-25.6	16.9
	mCpG-DNA	23	-10.2	22.6	-32.8
		430	-8.5	-16.7	8.2
	hmCpG-DNA	21	-10.3	19.1	29.4
		360	-8.6	-15.3	6.7
NTD-MBD-ID R133C	CpG-DNA	2.5	-11.5	-49.1	37.6
		83	-9.5	-11.8	2.3
	mCpG-DNA	2.1	-11.6	-45.0	33.4
		62	-9.7	-10.0	0.3
	hmCpG-DNA	24	-10.2	-13.6	3.4
		110	-9.3	-10.5	1.2

El error relativo en K_d es del 15%, el error absoluto en ΔG_B es de 0.1 kcal/mol, el error absoluto en ΔH_B y $-T\Delta S_B$ es 0.5 kcal/mol.

que se generan son diferentes a lo que ocurría con el WT en los dos sitios de unión (**Figura 4.26, tabla 4.15**).

En los ensayos del mutante R133C NTD-MBD-ID se observó que no solo aparece el sitio de unión adicional típico del dominio ID con afinidad submicromolar, sino que se recupera el sitio de unión en el MBD con afinidad nanomolar. NTD-MBD-ID R133C no mostró grandes variaciones en la afinidad de unión con respecto al WT, aunque alteró la unión de hmCpG-DNA de forma diferente al resto (**figura 4.27, tabla 4.15**). Este mutante también mostró un perfil termodinámico de unión similar al del WT, y es capaz de unir dos moléculas independientes de dsDNA. La sustitución R133C apenas afectó a la afinidad de unión del CpG-DNA y el mCpG-DNA, pero redujo en gran medida la afinidad de unión del hmCpG-DNA, de acuerdo con un fenómeno de compensación parcial entalpía-entropía considerable (**figura 4.28**).

En resumen, cada mutación de MeCP2 implicada en RTT causa diferentes perturbaciones en la estructura, estabilidad y funcionalidad de la proteína dependiendo de las interacciones intramoleculares específicamente alteradas. El entorno de la mutación resulta crucial y podría influir fuertemente en el impacto deletéreo inducido sobre la funcionalidad de MeCP2, modulando su capacidad para interactuar con el dsDNA y modificando cómo tiene lugar dicha interacción. Las mutaciones en el MBD afectan gravemente a la forma en que se establece la interacción proteína-dsDNA. La mutación R133C tiene un gran impacto para la interacción con el dsDNA metilado y sin metilar, disminuyendo tanto la afinidad de unión que no pudo observarse por ITC, mientras que la interacción con el dsDNA hidroximetilado no se ve afectada. Aunque la capacidad de unión al dsDNA metilado y sin metilar se rescata con construcciones más largas, la unión a dsDNA hidroximetilado se ve muy afectada. En segundo lugar, la mutación R106W no afecta significativamente a la interacción con el dsDNA, pero reduce la especificidad de interacción para el dsDNA metilado. Las mutaciones también pueden producir efectos perjudiciales en regiones alejadas de ellas. De hecho, el sitio de unión del ID se ve bastante comprometido en términos de afinidad por las mutaciones del MBD,

lo que revela que la correcta estructura de MBD es indispensable para la interacción ID-dsDNA. Las alteraciones en el sitio MBD muestran una fuerte influencia en los enlaces específicos formados entre los residuos. La mutación R133C no es tan perjudicial en presencia de ID, afectando solo a la interacción con el dsDNA hidroximetilado. En cambio, el efecto perjudicial de R106W en el sitio de interacción MBD se extiende al sitio de interacción ID, produciendo una importante reducción de la afinidad de unión y causando una contribución de entropía desfavorable a la interacción (**tabla 4.15**)

4.5.3 Sobre la unión a histonas:

Una vez visto el efecto de las mutaciones asociadas a RTT a nivel estructural y en su interacción con el dsDNA, el objetivo fue comprobar si estas mutaciones ejercen un efecto deletéreo en la interacción con alguna de las histonas canónicas nucleosomales, o en la capacidad de MeCP2 para leer las trimetilaciones en las lisinas de H3, tal y como se ha descrito previamente.

Para ello se utilizaron las construcciones del MBD aislado con las mutaciones R106W y R133C, ya que la interacción de esta construcción WT es la que más habíamos desarrollado.

De acuerdo con los resultados de ITC llevados a cabo a 20 °C para el MBD R106W con cada una de las histonas canónicas, esta mutación, que genera un fenotipo más severo, disminuyó considerablemente la afinidad por H2A y H2B (en un factor de 20 para ambas) e impidió completamente la interacción con H4, con la que no se ha podido medir la interacción (**figura 4.29, tabla 4.16**). Sin embargo, esta mutación no afecta a la afinidad por la histona H3. Por su parte, la mutación R133C en el MBD apenas varía la afinidad por ninguno de los cuatro tipos de histonas (**figura 4.30, tabla 4.16**).

Los resultados de ITC de los dos constructos MBD mutantes con las variantes metiladas de H3 apenas mostraron diferencias en cuanto a afinidad con respecto al WT. La única diferencia apreciable es que el mutante R106W interaccionó con mayor afinidad por la histona H3K36me3 que el WT, lo cual implicaría una

pérdida en la capacidad de lectura de esta marca epigenética (**figura 4.31, tabla 4.16**).

Globalmente hablando, la mutación R133C interactuó con las histonas (**figura 4.30, tabla 4.16**) y los derivados metilados (**figura 4.32, tabla 4.17**). que hemos estudiado de la misma manera que el WT, lo cual, junto con la menor afectación de la interacción con el dsDNA explica por qué el fenotipo RTT generado por esta mutación es menos severo que el producido por la mutación R106W.

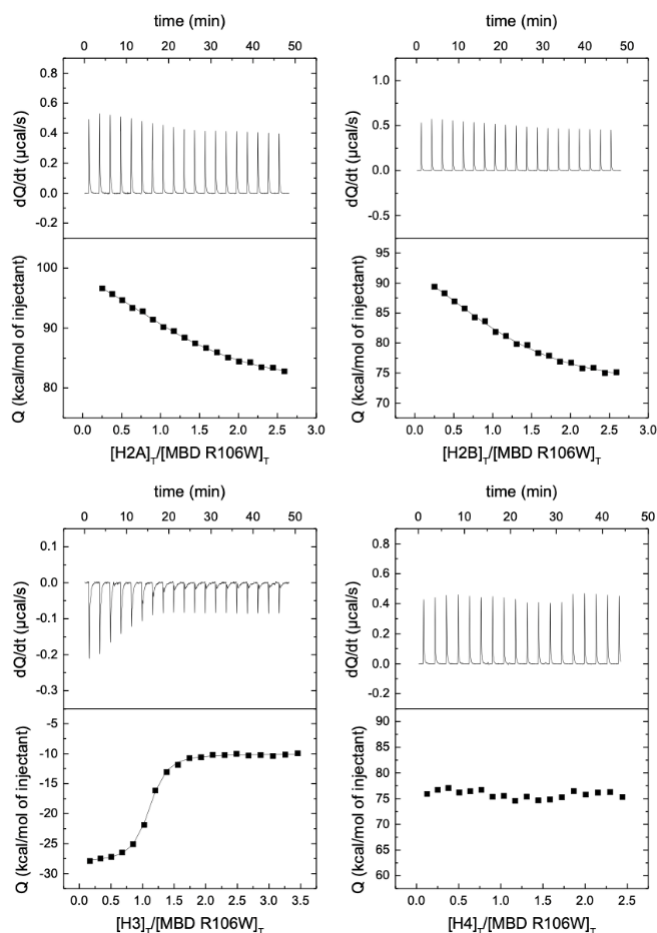


Figura 4.29. Interacción del constructo MBD con la mutación R106W con H2A, H2B, H3, H4 mediante ITC. Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isothermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso.

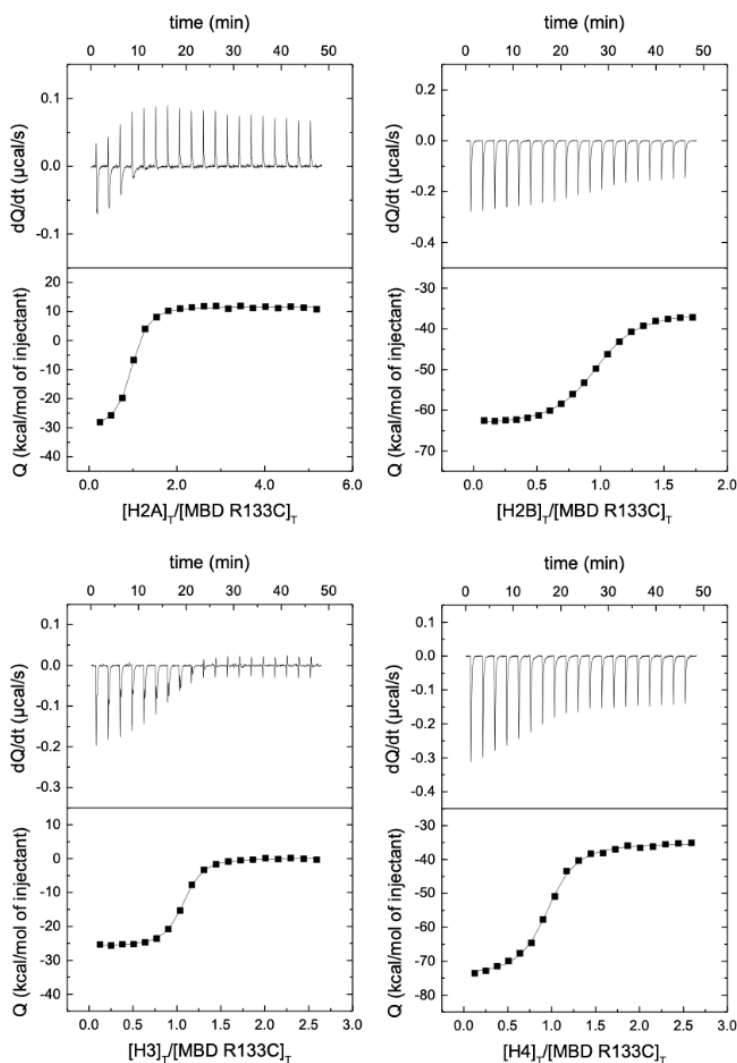


Figura 4.30. Interacción de MBD con mutaciones RTT con las histonas canónicas por ITC. Interacción del constructo MBD con la mutación R133C con H2A, H2B, H3, H4 mediante ITC. Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso.

Tabla 4.16. MBD interactuando con las cuatro histonas nucleosomales. Parámetros de unión para MBD (WT y variantes asociadas a Rett) interactuando con H2A, H2B, H3, y H4 a pH 7 y 20 °C.

		K_a (M^{-1})	K_d (μM)	ΔH (kcal/mol)
MBD	H2A	$2.2 \cdot 10^7$	0.046	-31.9
	H2B	$1.8 \cdot 10^7$	0.057	-30.2
	H3	$2.0 \cdot 10^7$	0.050	-19.0
	H4	$2.7 \cdot 10^7$	0.037	-56.0
MBD R106W	H2A	$1.0 \cdot 10^6$	1.0	25.4
	H2B	$8.9 \cdot 10^5$	1.1	29.0
	H3	$1.9 \cdot 10^7$	0.052	-18.1
	H4	--	--	--
MBD R133C	H2A	$3.0 \cdot 10^7$	0.034	-42.0
	H2B	$1.2 \cdot 10^7$	0.083	-28.3
	H3	$2.5 \cdot 10^7$	0.040	-26.2
	H4	$1.8 \cdot 10^7$	0.056	-39.4

Tabla 4.17. MBD interactúa con las variantes H3 trimetiladas en lisina. Parámetros de unión para MBD (WT y variantes asociadas a Rett) interactuando con H3 trimetilada en K4, K9, K27 y K36 a pH 7 y 20 °C.

		K_a (M^{-1})	K_d (μM)	ΔH (kcal/mol)
MBD WT	H3 K4me3	$8.4 \cdot 10^6$	0.12	-4.1
	H3 K9me3	$1.3 \cdot 10^7$	0.075	-59.0
	H3 K27me3	$1.7 \cdot 10^5$	5.9	7.0
	H4 K36me3	$3.3 \cdot 10^5$	3.1	4.0
MBD R106W	H3 K4me3	$3.2 \cdot 10^6$	0.32	-15.5
	H3 K9me3	$2.0 \cdot 10^7$	0.051	-51.9
	H3 K27me3	$1.6 \cdot 10^5$	6.2	15.3
	H4 K36me3	$6.1 \cdot 10^4$	16	7.7
MBD R133C	H3 K4me3	$3.5 \cdot 10^6$	0.29	-12.8
	H3 K9me3	$2.2 \cdot 10^7$	0.046	-51.1
	H3 K27me3	$1.3 \cdot 10^5$	7.9	10.7
	H4 K36me3	$6.7 \cdot 10^5$	1.5	-3.7

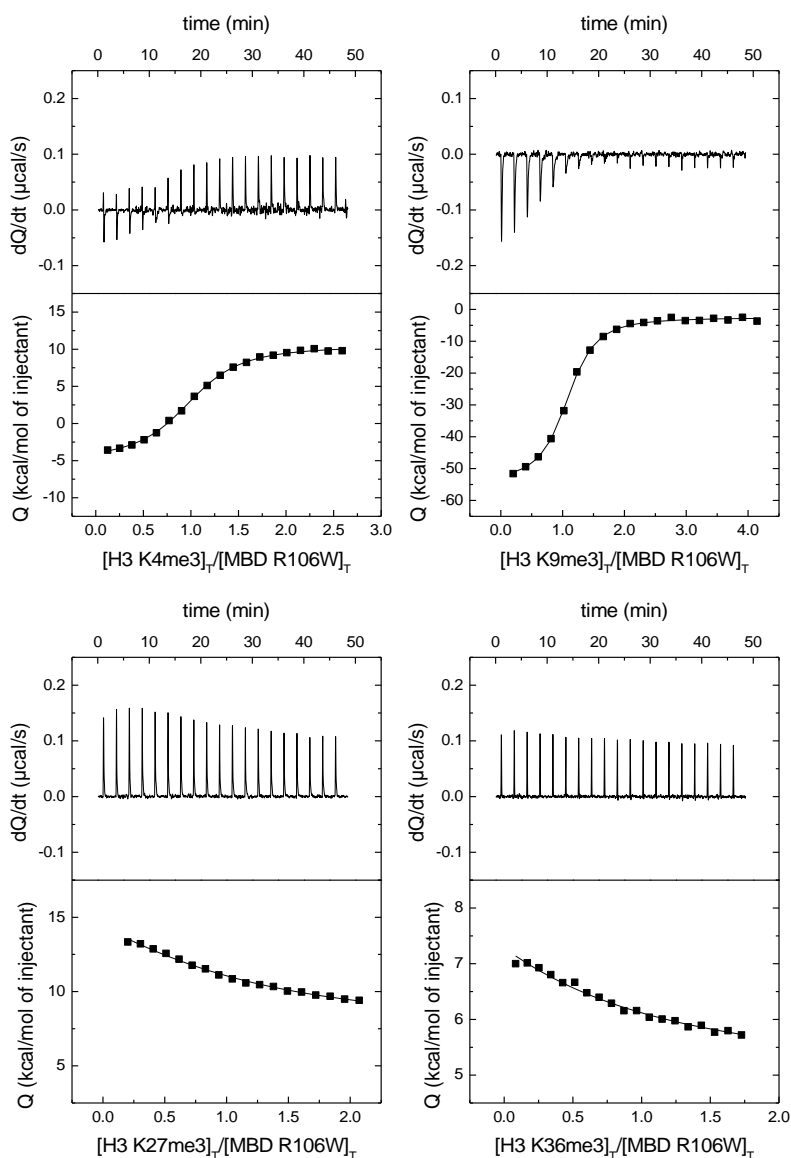


Figura 4.31. Interacción del constructo MBD con la mutación R106W con H3 trimetilada en lisina K4, K9, K27 y K36 mediante ITC. Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso.

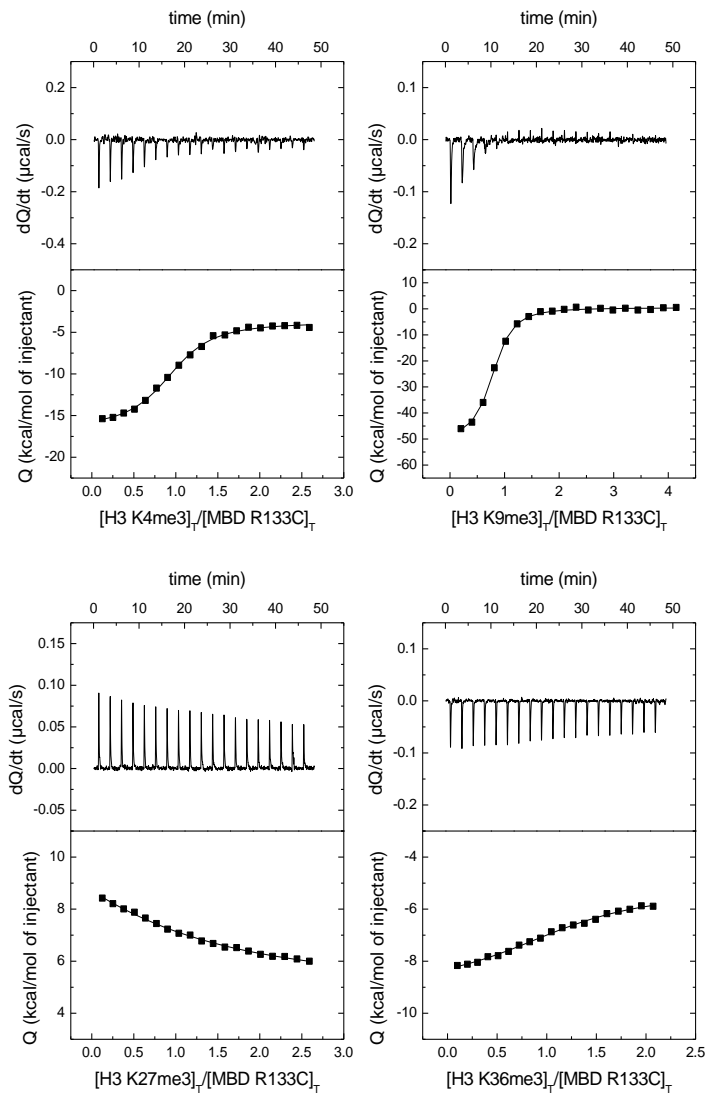


Figura 4.32. Interacción del constructo MBD con la mutación R133C con H3 trimetilada en lisina K4, K9, K27 y K36 mediante ITC. Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso.

4.6 Cribado de alto rendimiento usando MeCP2 como diana.

Después de realizar la caracterización biofísica de las variantes de MeCP2 (estabilidad estructural y capacidad de unión y discriminación de dsDNA con diferentes estados de metilación), el objetivo fue utilizar esta información para diseñar e implementar un procedimiento de cribado experimental para identificar posibles candidatos a fármacos que actúen usando el complejo MeCP2:dsDNA como diana, de forma que permitan modular la actividad de MeCP2 cuando sea necesario.

Por un lado, interesa identificar compuestos que actúen potencialmente como chaperonas farmacológicas, estabilizando las interacciones proteína:dsDNA y de esta forma rescaten la actividad defectuosa asociada a mutaciones relacionadas con RTT. Además de estabilizar el complejo MBD:dsDNA para aumentar la actividad funcional, el compuesto identificado actuaría como agente protector contra la maquinaria de degradación intracelular y evitar un transporte intracelular inadecuado.

Por otro lado, compuestos que se unan a la proteína e impidan su unión a dsDNA podrán ser utilizados como inhibidores de la misma, con un potencial terapéutico para aquellos casos donde esté localmente o temporalmente elevada la concentración o la actividad de la proteína, ya sea en el síndrome de duplicación de MeCP2 (sobrexpresión) o en situaciones de hipermetilación del DNA. Concretamente, se van a intentar usar como propuesta terapéutica para PDAC.

Para ello, se utilizaron dos bibliotecas químicas comerciales: la quimioteca Prestwick y la quimioteca HitFinder, que contienen 1120 y 10000 compuestos, respectivamente. Aunque el diseño óptimo consistiría en realizar el procedimiento de cribado utilizando la diana MeCP2 completa, la eficiencia del proceso de purificación de la proteína completa no es lo suficientemente buena como para obtener una cantidad suficiente, por lo que se emplearon las construcciones de MBD y la NTD-MBD-ID.

El procedimiento de cribado se basa en el efecto de estabilización inducido por el ligando en una proteína dada: cuando un ligando se une (preferentemente) a la conformación nativa, ese estado conformacional se estabiliza frente a la desnaturalización térmica. Por lo tanto, realizando ensayos de desnaturalización térmica en ausencia y presencia de una colección de compuestos, es posible identificar los ligandos potenciales como aquellos que alteran la traza de desplegamiento y aumentan la temperatura de desplegamiento (“thermal up-shift” Velazquez-Campoy et al., 2016). Este principio general es aplicable a estados conformacionales alternativos no nativos de la proteína: cuando un ligando se une (preferentemente) a la conformación no nativa, ese estado conformacional se estabiliza frente a la desnaturalización térmica, y es posible identificar los ligandos potenciales como aquellos que alteran la traza de desplegamiento y reducen la temperatura de desplegamiento.

Como controles internos en cada placa de cribado se utilizan soluciones de la proteína (MBD o NTD-MBD-ID) en presencia y ausencia de dsDNA. En el resto de la placa pondremos el complejo proteína:dsDNA con cada uno de los compuestos de la quimioteca que estamos evaluando. Aprovechando la gran estabilización que genera la unión al dsDNA, y comparando las T_m 's de cada pocillo con ambos controles podemos diferenciar los pocillos donde se encuentre la proteína unida normalmente a dsDNA (T_m pocillo = T_m control complejo proteína:dsDNA), aquellos donde el compuesto se ha unido al complejo, estabilizándolo (T_m pocillo > T_m control complejo proteína:dsDNA) o finalmente, aquellos pocillos donde el compuesto se ha unido a la proteína, estabilizándola, pero impidiendo su unión a dsDNA (T_m control proteína < T_m pocillo < T_m control complejo proteína:dsDNA) (**figura 4.33A**).

Mientras que la T_m de controles del complejo con el DNA se mantuvo muy estable a lo largo de todo el proceso de cribado (variabilidad entre controles de 1-2 °C), la proteína aislada varió algo más (variabilidad entre controles de aprox. 5 °C) de forma que, aunque se comparó con el control sin DNA, los cálculos de (des)estabilización se hicieron a partir del valor del complejo. Esto destaca la

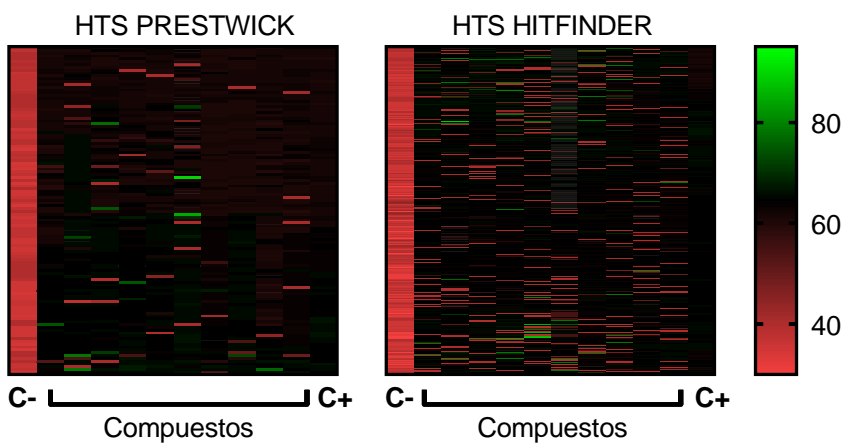
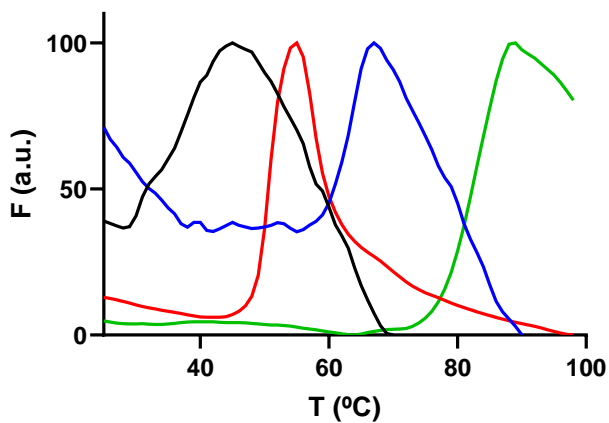


Figura 4.33 Cribado de alto rendimiento para compuestos estabilizadores e inhibidores del complejo MeCP2:dsDNA. (A) Figura representativa de los ensayos TSA para el cribado de alto rendimiento de fármacos usando MeCP2 como diana. Se representa una curva control de la construcción NTD-MBD-ID sola (negro) o en presencia de dsDNA (azul). También se representan dos ejemplos de curvas de fluorescencia de compuestos seleccionados como estabilizadores (verde) o inhibidores (rojo) del complejo MeCP2:dsDNA. (B) Resultados de las T_m 's de todos los compuestos cribados en cada una de las quimiotecas: Prestwick (izquierda) y HitFinder (derecha) representando la T_m de cada pocillo.

Tabla 4.18 Datos de estabilización de los compuestos seleccionados del cribado de alto rendimiento para la proteína WT o con mutaciones R106W y R133C.

$\Delta T_m (T_m - T_m^{\text{MBD:dsDNA}})$			$\Delta T_m (T_m - T_m^{\text{NTD-ID:dsDNA}})$			$\Delta T_m (T_m - T_m^{\text{NTD-ID:dsDNA}})$	
RAO1	WT	9	DOA1	WT	8	ADO1	-17
	R106W	8		R106	3		
	R133C	6		R133C	4		
RAO2	WT	13	DOA2	WT	8	ADO3	-3
	R106W	8		R106	0		
	R133C	8		R133C	0.5		
RAO3	WT	9	DOA3	WT	18	ADO4	-20
	R106W	10		R106	3		
	R133C	4		R133C	1		
RAO4	WT	15	DOA4	WT	18	ADO5	-21
	R106W	15		R106	9		
	R133C	16		R133C	1		
RAO5	WT	9	DOA5	WT	7	ADO6	-12
	R106W	11		R106	6		
	R133C	8		R133C	1		
RAO6	WT	7	DOA6	WT	7	ADO7	-20
	R106W	12		R106	8.5		
	R133C	2		R133C	0.5		
RAO7	WT	15	DOA7	WT	21	ADO8	-15
	R106W	21		R106	7		
	R133C	6		R133C	0.5		
RAO8	WT	15	DOA8	WT	21	ADO9	-18
	R106W	23		R106	7		
	R133C	26		R133C	3		
RAO9	WT	28	DOA9	WT	7	ADO10	-24
	R106W	41		R106	7.5		
	R133C	45		R133C	2		
RAO10	WT	7	DOA10	WT	6	ADO11	-19
	R106W	14		R106	3.5		
	R133C	7		R133C	1.5		
RAO11	WT	9	DOA11	WT	5	ADO12	-22
	R106W	0		R106	20		
	R133C	1		R133C	11		
RAO13	WT	11	DOA12	WT	5	ADO13	-24
	R106W	16		R106	5		
	R133C	13		R133C	0		
RAO14	WT	16	DOA13	WT	6	ADO14	-28
	R106W	24		R106	0		
	R133C	10		R133C	0		
			DOA14	WT	5	ADO15	-20
				R106	0		
				R133C	14		
			DOA15	WT	20	ADO16	-26
				R106W	30		
				R133C	32		

importancia de realizar ensayos de control internos en cada placa cuando se realiza un procedimiento de cribado (**figura 4.33B**).

Con este procedimiento se identificaron 14 compuestos que estabilizan el complejo MBD:dsDNA procedentes de ambas quimiotecas, llamados compuestos RAO (1-14), en una tesis doctoral anterior llevada a cabo por el Dr. Rafael Clavería. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se identificaron 15 compuestos que estabilizan el complejo NTD-MBD-ID:dsDNA, llamados compuestos DOA (1-15), y 15 compuestos que inhiben la formación del complejo NTD-MBD-ID:dsDNA, llamados compuestos ADO (1-15) (**figura 4.33B, tabla 4.18**).

4.6.3 Estabilización de mutantes causantes de RTT.

Una vez seleccionados los compuestos activadores que actúan como chaperonas y estabilizan la unión de MeCP2 WT al dsDNA, nos propusimos evaluar si este efecto ocurre también en proteínas que portan las mutaciones causantes de Rett con las que estamos trabajando (R106W y R133C), para que evaluar la posibilidad de revertir el efecto desestabilizador de las mismas y recuperar una estructura del complejo proteína:dsDNA similar a la de la construcción WT. Cada mutación tiene un efecto diferente sobre la estabilidad y funcionalidad de la proteína, por lo que se incluyeron los controles correspondientes en los experimentos, utilizando las construcciones WT con dominios flanqueantes o no, según corresponda.

Se determinaron las temperaturas de desplegamiento en presencia de todos los compuestos RAO y DOA, midiendo el efecto estabilizador sobre cada mutante en un procedimiento de cribado secundario. Como era de esperar, cada mutante mostró un comportamiento completamente diferente en el proceso de cribado. No se encontraron similitudes ni en la forma de las curvas ni en la temperatura de desplegamiento entre MBD WT y cada mutante MBD en los experimentos de control, ya sea en presencia o ausencia de dsDNA. Dado que la interacción proteína:dsDNA está fuertemente influenciada por la presencia de las mutaciones, la capacidad de un compuesto para estabilizar esa interacción también puede verse afectada. Por lo tanto, un compuesto identificado como

positivo en el proceso de cribado primario realizado en las construcciones WT podría estabilizar o no el complejo con el MBD mutante en el proceso de cribado secundario.

Como era de esperar, se encontró una gran variabilidad en el efecto estabilizador de los compuestos sobre los complejos mutantes MeCP2:dsDNA. Aunque no se pudieron extraer conclusiones generales, parecía que los mutantes R106W se estabilizaban en gran medida en comparación con R133C. El efecto de los compuestos sobre los mutantes R133C fue marcadamente inferior, en concordancia con la afinidad reducida que mostró este mutante por el dsDNA. En algunos compuestos, como RAO6, RAO7, RAO10 y RAO14, se observó una magnificación de este efecto, obteniendo un efecto estabilizador del complejo con el mutante R106W mayor que con la proteína WT, mientras que en el caso del mutante R133C el efecto fue mucho menor o nulo (**tabla 4.18**).

Como particularidades los compuestos RAO4, RAO5, RAO13 y DOA1 ejercieron sobre las variantes mutantes de MBD un efecto estabilizador similar al observado en el cribado primario con MBD salvaje. También pudimos ver cómo algunos compuestos, como RAO11, DOA2 y DOA13, no mostraron ningún efecto estabilizador sobre los mutantes, sin inducir ningún desplazamiento de las curvas de desnaturalización hacia temperaturas más altas (**tabla 4.18**).

Contrariamente a la tendencia general, el compuesto DOA14 estabilizó más el mutante R133C que el WT, pero no ejerció ningún efecto estabilizador sobre el mutante R106W. Sorprendentemente, los compuestos RAO8, RAO9, DOA11 y DOA15 exhibieron un efecto marcadamente grande, desplazando la temperatura de desplegamiento aún más que con las versiones WT (**tabla 4.18**).

4.7 Selección de modelo celular para RTT.

Un gran problema a la hora de avanzar y escalar el proyecto de búsqueda de nuevos fármacos basados en la modulación de la actividad de MeCP2 hacia modelos celulares fue la falta de dichos modelos. A la hora de estudiar los

efectos de RTT se utilizan muchos modelos KO para el gen MECP2, pero en nuestro caso, estos modelos no nos sirven, ya que necesitamos la proteína mutante para poder estabilizar (o evaluar la posible estabilización de) el complejo formado. A lo largo del desarrollo del proyecto se han explorado varias vías de actuación, cada una con sus ventajas e inconvenientes.

4.7.1 Líneas celulares linfoblásticas derivadas de pacientes con Síndrome de Rett.

La obtención de líneas celulares estables a partir de la fracción linfocitaria de la sangre de pacientes se utiliza habitualmente para generar modelos celulares de enfermedades raras. Mediante la infección de los linfocitos B con el virus de Epstein Barr podemos obtener líneas inmortalizadas de células que son representativas del material genético global de los pacientes, incluyendo las mutaciones causantes de enfermedad y el mosaicismo de la expresión de la proteína mutante, lo cual es especialmente relevante en los casos de enfermedades con diferente nivel de penetrancia, como es el caso del síndrome de Rett.

Como ventajas de este tipo de líneas celulares, aparte de ser una representación fiel al acervo genético que existe en las células de los pacientes, se puede mencionar la facilidad del manejo de estas células, ya que crecen en suspensión sin necesidad de agitación, y que no requieren suplementación o pretratamiento especial. Además, su tasa de proliferación es bastante elevada, lo cual es muy conveniente a la hora de hacer ensayos en los que se necesita mucho material de partida.

Siguiendo con las ventajas de este modelo celular, podemos destacar que nuestros colaboradores en el Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras llevaron a cabo una recogida de muestras y generación de líneas, obteniendo líneas control, así como de pacientes Rett, con las mutaciones R106W, T158M y R294X, con las que además se había hecho un estudio previo de ChIP-Seq, habiendo identificado genes con unión diferencial de MeCP2 entre las líneas provenientes de controles sanos y las líneas provenientes de pacientes RETT.

Como inconvenientes de este modelo celular podemos mencionar, en primer lugar, la inadecuación del tipo celular: los linfoblastos no son *a priori* una diana a la hora de tratar RTT y no expresan los genes de interés de forma basal en niveles suficientemente altos (BDNF, en particular), y no puede estudiarse el proceso de diferenciación, que es tan importante en esta patología.

En segundo lugar, hay que considerar que las líneas utilizadas como controles y las líneas con mutaciones patológicas proceden de individuos diferentes, de forma que existe un gran número de diferencias entre ellas, y no solo la mutación puntual de interés, de forma que la variabilidad entre individuos tiene que ser tomada en cuenta a la hora de comparar los resultados obtenidos con ellas.

En tercer lugar, hay que mencionar el mosaicismo de la muestra. El gen de MeCP2 se encuentra en el cromosoma X, de forma que, en las pacientes con la enfermedad existe la mutación en heterocigosis ya que la mutación en homocigosis no es compatible con la vida. La inactivación del cromosoma X que ocurre de forma relativamente aleatoria tiene como consecuencia que en cada muestra tendremos cierto porcentaje de células que expresen, a saber, la proteína mutante o la WT, dependiendo de qué cromosoma X esté inactivado.

Mientras se llevaban a cabo los primeros ensayos de eficacia de los compuestos seleccionados, se llevó a cabo un estudio expresión. Se purificó el mRNA total de las células, y se produjo y secuenció el cDNA correspondiente a MeCP2, para comprobar cuánto porcentaje de proteína mutante expresaba cada una de las líneas celulares que íbamos a utilizar.

El resultado fue, como mínimo, decepcionante. Ninguna de las líneas celulares provenientes de pacientes con una mutación dentro del MBD expresaba la proteína mutante a niveles detectables. Únicamente la línea celular proveniente de una paciente con una mutación en el TRD expresaba la proteína mutante. Teniendo esto en cuenta, aunque se había avanzado en la puesta a punto y caracterización de los controles, se tomó la información interesante obtenida del

tratamiento de los mismos, pero se continuó en la búsqueda de un modelo celular del mutante para llevar a cabo los ensayos funcionales.

4.7.2 Generación de línea mutante

Otro enfoque que se exploró fue el de utilizar líneas celulares de precursores neuronales, en concreto, ReNCells. Una línea celular disponible comercialmente inmortalizada con capacidad para diferenciarse fácilmente en neuronas y células gliales.

El inconveniente principal de este modelo celular es la dificultad del manejo. El estado de potencialidad de las células se mantiene gracias a la suplementación con factores de crecimiento, y necesitan de suplementación específica, e incluso del pretratamiento de todo el material para que puedan adherirse. Las ventajas, además de la homogeneidad de la línea celular, incluyen la mayor adecuación del tipo celular y la posibilidad de hacer estudios en diferenciación a neuronas, ya sea en diferenciación libre (suprimiendo la suplementación con factores de crecimiento) o la diferenciación dirigida a neuronas glutamatérgicas (mediante la expresión de genes específicos).

Como esta línea celular está disponible comercialmente, tiene unos protocolos de trabajo muy bien definidos. A partir de esta línea celular, nuestros colaboradores en el Instituto de Investigación contra la Leucemia Josep Carreras desarrollaron una línea celular estable con la mutación R133C de MeCP2 mediante edición génica usando un oligonucleótido con zona mutada como donante.

Se decidieron tres puntos de control para estudiar las diferencias entre la línea celular WT y mutante, guiados por diferencias que habían sido observadas previamente comparando la línea WT con una línea KO para el gen de MeCP2, también generada y caracterizada por el laboratorio de la Dra. Sònia Guil.

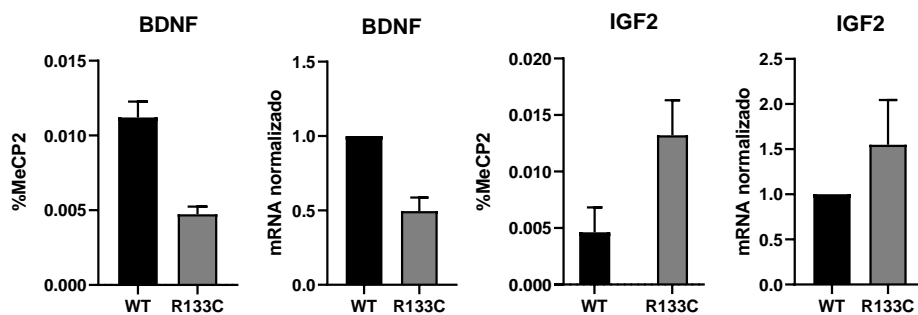


Figura 4.34. Datos comparativos de la línea de precursores neuronales ReNCells WT y con la mutación R133C. Medidas de unión de MeCP2 a los promotores de BDNF e IGF2 mediante ChIP-qPCR (a y c) respecto a input sin inmunoprecipitar y en valores de expresión, mediante cuantificación de mRNA por RT-qPCR para ambos genes (b y d).

En primer lugar, se determinó la unión directa de MeCP2 a promotores de genes de interés: BDNF e IGF2, cuya expresión está regulada por MeCP2 y se ven afectados en RTT, y que se midió mediante ChIP-qPCR. Como control positivo de inmunoprecipitación se utilizó un anticuerpo reactivo ante la histona H3, y como control negativo de inmunoprecipitación inespecífica se utilizó un anticuerpo que une inmunoglobulina G (que no debería existir en el núcleo), y los datos se expresan en porcentaje relativo a la medida por qPCR del *input* sin inmunoprecipitar. En segundo lugar, se midió mediante RT-qPCR si hay un cambio en la expresión de estos genes, que podría estar derivado de la desregulación por la mutación en MeCP2.

Se pudo observar que en la línea celular mutante hay una unión diferente a ambos promotores con respecto a la línea WT. Se midieron menores niveles de MeCP2 unido al promotor de BDNF en la línea mutante con respecto a la WT, en un factor de 2, lo cual correlaciona con una disminución en la expresión del BDNF en una magnitud similar (**figura 4.34A, B**).

En cambio, parece haber mayores niveles de MeCP2 unido al promotor de IGF2 en el caso de la línea mutante, y un aumento en la expresión del gen. Sin embargo, aunque parece haber una tendencia, la gran variabilidad en las medidas no permitió obtener resultados significativos (**figura 4.34C, D**).

4.8 Estudio funcional de compuestos estabilizadores (RAOs y DOAs)

4.8.1 Citotoxicidad de los compuestos estabilizadores

Una vez caracterizadas las diferencias entre el modelo celular WT y mutante, nuestro objetivo fue estudiar el efecto del tratamiento con nuestros compuestos sobre estos parámetros diferenciales entre ambas líneas. Para ello, se evaluó el efecto citotóxico de compuestos RAO y DOA en cultivos celulares de varias líneas celulares después de haber sido identificados como posibles chaperonas farmacológicas capaces de estabilizar la interacción entre el regulador transcripcional MeCP2 y el dsDNA con el fin de determinar el efecto tóxico que puedan tener en los modelos celulares de interés, así como otros modelos celulares no relacionados.

Se evaluó la supervivencia o viabilidad celular en las tres líneas celulares incrementando la concentración de los compuestos RAO y DOA desde 0.1 μM hasta 200-500 μM (manteniendo la misma concentración final de DMSO) para determinar la concentración citotóxica 50 (CC50). La CC50 se define como la concentración del compuesto en la que el 50% de las células sobreviven (la tasa de supervivencia se cuantifica como la tasa de actividad metabólica en comparación con los valores de control, es decir, solo DMSO agregado). Por su parte la CC95 se define como la concentración de compuesto que permite un 95% de la viabilidad celular, que se tomó como valor máximo no tóxico. Se estimó la CC50 para todos los compuestos, con una variabilidad significativa entre ellos (**tabla 4.19**) que sirvió para comparar a grandes rasgos la citotoxicidad de los diferentes compuestos entre sí; y se identificó la CC95 para determinar la dosis máxima permitida para el tratamiento en los modelos celulares de interés.

Los ensayos se realizaron en dos líneas celulares estándar: Lunet, línea celular de hepatocitos, diana interesante a estudiar en cuanto a toxicidad; células de queratinocitos humanos (HACAT), como tipo celular no relacionado; y dos

líneas celulares donde se realizarían los ensayos funcionales: células linfoblastoides derivadas de paciente sano (HBL26), y precursores neuronales (ReNCells), con la mutación R133C en MeCP2 introducida mediante CRISPR-Cas9.

Los resultados de los ensayos mostraron que los compuestos RAO6, RAO8, RAO12, DOA2, DOA4 DOA10 y DOA12 no exhiben apenas citotoxicidad en ninguna de las concentraciones testeadas, en ninguna de las líneas celulares (**figura 4.35, tabla 4.19**).

La tendencia general de aquellos compuestos que presentaron toxicidad es que las células linfoblastoides (HBL26) son las más sensibles a la misma, seguidas de las ReNCells, y finalmente HACAT y Lunet, con resultados comparables en todos los casos.

Además, se observó que RAO13 era mucho más citotóxico en las células ReNCells en comparación con otras líneas celulares. En el caso de DOA15, se observó que era altamente tóxico, mostrando una citotoxicidad de un orden de magnitud mayor en comparación con otros compuestos. Sin embargo, un hecho interesante es que se observó que la citotoxicidad disminuía en las células ReNCells mutantes. Teniendo en cuenta los datos de estabilización de mutantes y los datos de citotoxicidad se eligieron diferentes compuestos para las siguientes fases del estudio:

Los compuestos RAO5, RAO8, RAO9 Y RAO14 fueron los elegidos por su interesante perfil de estabilización de mutantes y valores relativamente bajos de citotoxicidad, y se estudiaron mediante ChIP-qPCR en líneas celulares linfoblásticas (HBL-26), utilizando una concentración única de 5 μ M para todos los compuestos.

En una segunda ronda se seleccionaron nuevos compuestos para el tratamiento de la línea celular de precursores neuronales (ReNCells) (**figura 4.36, tabla 4.19**). Esta vez, la dosis se eligió con según CC95 en la línea celular linfoblastoide, para poder administrar la mayor cantidad posible sin comprometer la viabilidad celular. Las concentraciones seleccionadas fueron:

para los compuestos RAO4, DOA1 y DOA4, 1.5 μM ; para los compuestos RAO7, DOA8 y DOA13, 2.5 μM ; para el compuesto RAO5 4 μM ; y para los compuestos RAO13 y DOA14, 5 μM .

Tabla 19. Datos de citotoxicidad de los compuestos RAO y DOA en función de CC50 y CC95 para las líneas celulares Lunet, HACAT y HBL26 y ReNCells R133C.

	CC50 (μM)				CC95 (μM)	
	Lunet	HACAT	HBL26	ReNCells R133C	HBL26	ReNCells R133C
RAO1	225	181	40		2.5	
RAO2	65.5	44	14		1	
RAO3	>300	>300	53		2,8	
RAO4	>300	>300	174	0.75	12.4	>20
RAO5	>200	>200	26	4	5	15
RAO6	>500	>500	>200		65	
RAO7	25.5	24.6	9	1.5	0.75	>10
RAO8	>500	>500	>200		129.5	
RAO9	175	66	70		5	
RAO10	>300	>300	\approx 200		>200	
RAO11	>300	\approx 300	80		80	
RAO12	>200	>200	>200		35	
RAO13	62	67	63	7.8	11	14.5
RAO14	>500	\approx 500	\approx 200		10	
DOA1	>200	>200	>200	6.8	5.5	18.75
DOA2	>200	>200	>200		42	
DOA3	58	82	35.08		15	
DOA4	>200	>200	>200	>20	>200	>20
DOA5	412	352	104		20	
DOA6	292	274	219		17	
DOA7	18.5	21.5	5.8		0.4	
DOA8	21	19.4	5.3	4	0,9	9.5
DOA9	>200	>200	122		6.5	
DOA10	>200	>200	>200		42	
DOA11	29	21	21.1		11	
DOA12	>200	>200	>200		>200	
DOA13	56	51	19.3	7	2.5	18.25
DOA14	126.5	54	30	3.2	7	>20
DOA15	1	0.5	0.5	0.75	0.3	3

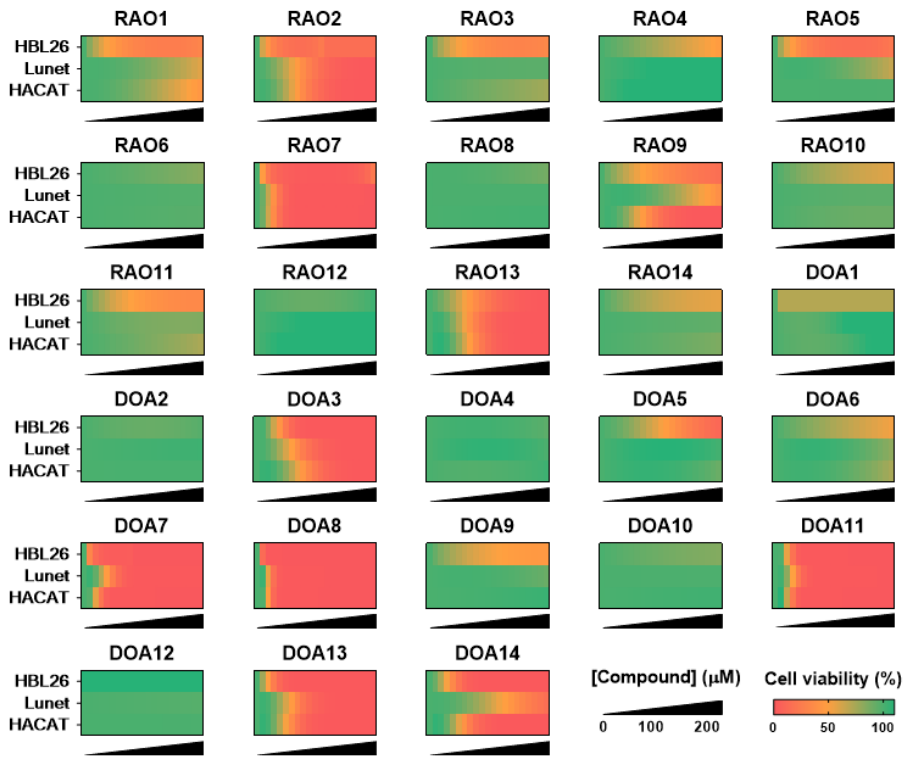


Figura 4.35. Estudio de citotoxicidad de los compuestos RAO y DOA. Viabilidad de las células HBL-26, Lunet y HACAT tratadas con los diferentes compuestos identificados como estabilizadores del complejo MeCP2-dsDNA mostradas como porcentaje de células vivas con respecto al control sin tratamiento, mostrando viabilidad en gradiente de color

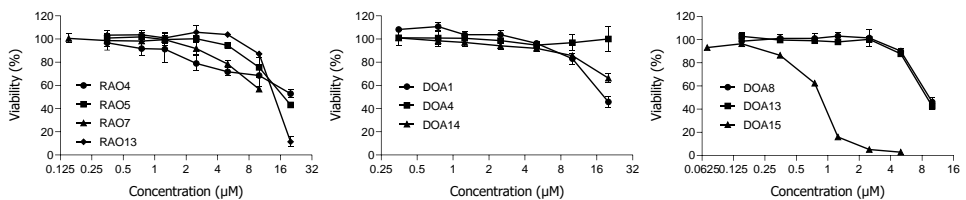


Figura 4.36. Estudio de citotoxicidad de los compuestos RAO y DOA en la línea RNC133. Viabilidad de las células compuestos preseleccionados como estabilizadores del complejo MeCP2:dsDNA mostradas como porcentaje de células vivas con respecto al control sin tratamiento.

4.8.2 Estudio funcional de los activadores en células linfoblastoides

Teniendo en cuenta los datos previos (estabilización del complejo con la proteína mutante y citotoxicidad) se eligieron 4 compuestos RAO provenientes del cribado realizado con el MBD.

Para ver si el efecto estabilizador deseado se producía en el modelo celular, se trataron los cultivos en suspensión de células linfoblastoides (WT y con la mutación R294X) con los compuestos seleccionados (RAO5, RAO8, RAO9, RAO14), y se llevó a cabo la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), partiendo de una lisis del núcleo celular, utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente MeCP2, de forma que nos permite aislar las zonas del DNA a las que se une. Mediante una RT-qPCR podemos cuantificar qué porcentaje de una secuencia concreta (promotores de genes diana BDNF, IGF2, IFF2BP2) están unidos a MeCP2, comparando con una muestra de *input* (material genético total sin inmunoprecipitar).

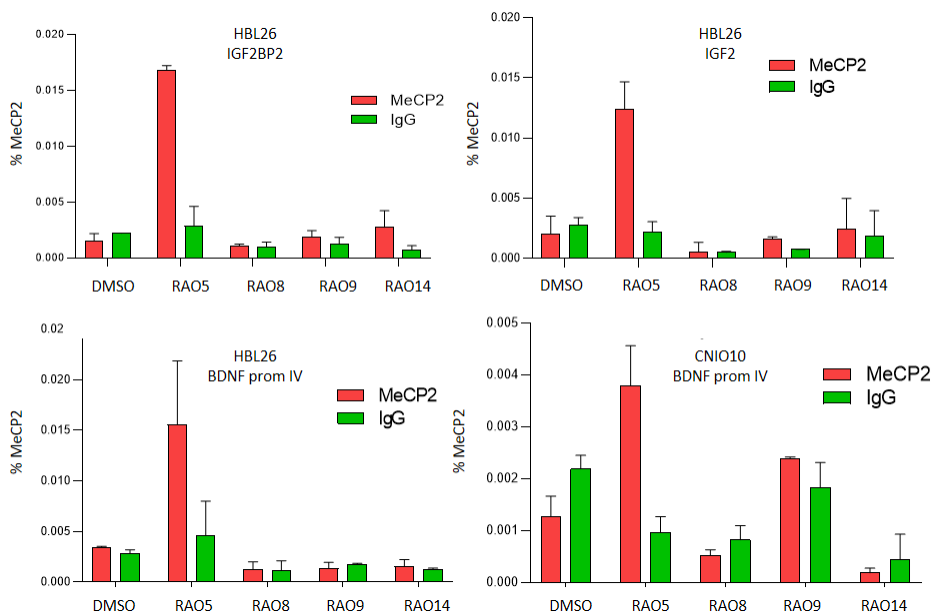


Figura 4.37. Estudio funcional de los compuestos RAO preseleccionados en la línea celular linfoblastoides. Medidas del efecto del tratamiento de los 4 compuestos RAO preseleccionados: RAO5, RAO8, RAO9 y RAO14, en comparación con el cultivo sin tratamiento en la unión de MeCP2 a los promotores de IGF2BP2 (A), BDNF (B) e IGF2 (C) en la línea WT HBL-26 y BDNF para la línea CNIO-10 (D)) como porcentaje mediante ChIP-qPCR respecto a input sin inmunoprecipitar

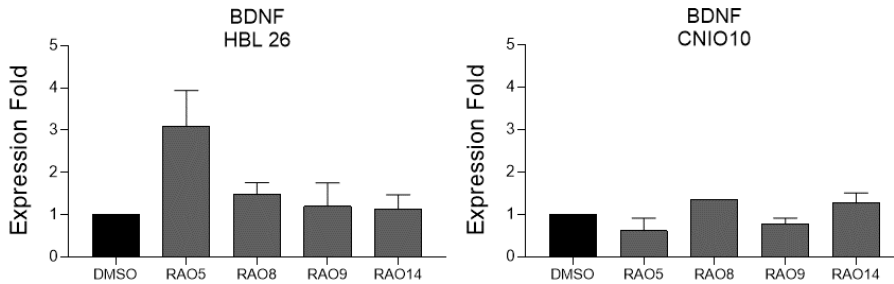


Figura 4.38. Efecto del tratamiento con compuestos RAO seleccionados sobre la expresión de BDNF de células linfoblásticas. Valores de expresión de BDNF, mediante la cuantificación de mRNA por RT-qPCR para la línea celular WT (HBL26) y con la mutación R294X (CNIO10) normalizado según los valores de expresión del control sin tratamiento.

Como control positivo de inmunoprecipitación se utilizó un anticuerpo reactivo ante la histona H3, y como control negativo de inmunoprecipitación inespecífica se utilizó un anticuerpo que une inmunoglobulina G (que no debería existir en el núcleo).

Interesantemente, el compuesto RAO5 aumenta la unión de MeCP2 a todos los promotores que hemos estudiado en este caso. En la línea WT, aumenta en un factor de 3 la unión al promotor de BDNF, en un factor de 8 al promotor de IGF2BP2 y en más de un orden de magnitud al promotor de IGF2. En la línea mutante R294X aumenta en un factor de 3-4 la unión al promotor de BDNF (**figura 4.37**).

El compuesto RAO8 no parece mejorar la unión de MeCP2 a ningún promotor. Por su parte RAO9 y RAO14 mejoran la unión a los promotores de IGF2BP2 y de IGF2 (**figura 4.37**).

Además, se estudió el efecto del tratamiento en la expresión de estos genes diana mediante RT-qPCR. Al no ser un tipo celular neuronal, algunos de estos genes no se expresan a niveles medibles, aunque sí se pudo medir un aumento en un factor de 3 en la expresión del gen BDNF con el tratamiento de RAO5, cosa que no aparece en la línea mutante R294X. Esto puede deberse a que la mutación

impide que MeCP2, aun uniéndose más a la cromatina, ejerza su función reclutando otros *partners* proteicos (**figura 4.38**).

Llama la atención que el control positivo, realizado inmunoprecipitando con un anticuerpo contra H3 da valores de Ct mucho más bajo con el tratamiento con RAO5 (datos no representados), indica que al aumentar la unión de MeCP2 a la cromatina, también aumenta la cantidad de cromatina coinmunoprecipitada con H3.

4.8.3 Estudio funcional de los activadores en precursores neuronales

Una vez se generó el modelo celular mutante para MeCP2 (R133C), se abrieron varias puertas: poder comparar parámetros entre las líneas celulares que expresan la proteína WT y la proteína mutante en un modelo celular más apropiado, donde se expresan de forma basal los genes diana que queremos estudiar.

Se realizó un cribado secundario, para identificar aquellos compuestos que eran capaces de modificar el estado transcripcional de la línea celular mutante de una forma dirigida. Se tomó BDNF como diana, y se usaron los genes NCAM y SOX como controles de genes cuya expresión no depende de MeCP2. Tras el tratamiento de la línea celular RNCe11 R133C se estudió la expresión de estos genes por RT-qPCR. De este cribado secundario se seleccionaron los compuestos RAO5, RAO7, DOA1, DOA8 y DOA15, que aumentaban la expresión de BDNF de manera consistente entre réplicas (en un factor 1.5-2.2) y sin variar apenas la expresión de los genes control (**figura 4.39**).

Las medidas de ChIP en esta línea celular demostraron que el compuesto RAO5 aumenta la unión a los dos promotores estudiados en la línea WT, mientras que el efecto en la línea mutante se dirige a recuperar los valores del WT, aumentando algo la unión de MeCP2 al promotor de BDNF y reduciendo sus niveles en el promotor de IGF2.

Los compuestos DOA8 y DOA15 reducen ligeramente el nivel de MeCP2 en el promotor de BDNF en la línea WT y lo aumentan en la línea mutante, mientras que en el caso del promotor de IGF2 ambos compuestos aumentan los niveles

de MeCP2 en la línea WT presentando una gran variabilidad entre experimentos, y se diferencian en el efecto en la línea mutante: mientras que DOA8 apenas tiene un efecto en los niveles de MeCP2 unido a este promotor, DOA15 los aumenta muchísimo (**figura 4.40**).

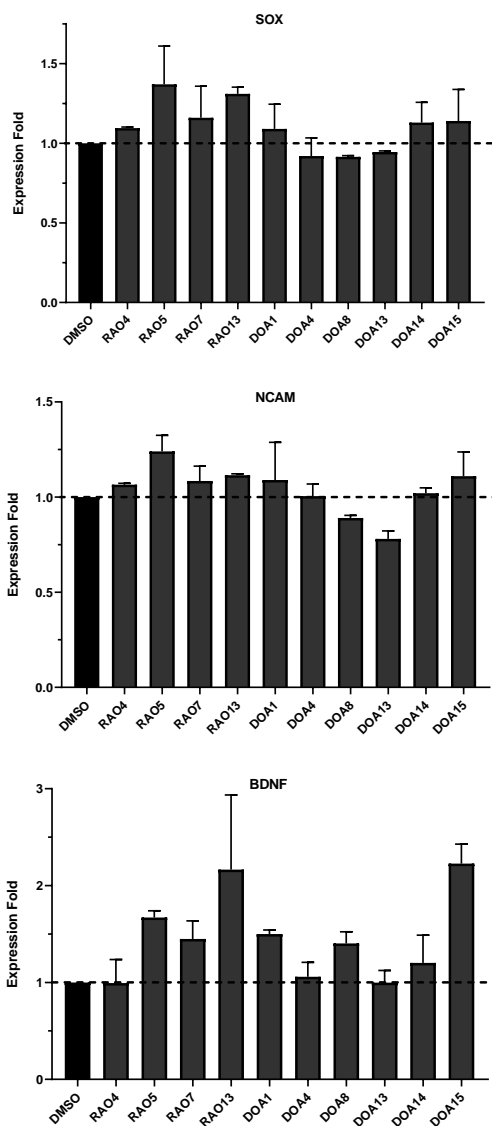


Figura 4.39. Efecto del tratamiento con compuestos estabilizadores del complejo MeCP2:dsDNA (RAO y DOA) en la expresión de genes de precursores neuronales. Medidas del efecto del tratamiento de los compuestos RAO y DOA preseleccionados para el tratamiento: RAO4, RAO5, RAO7, RAO13, DOA1, DOA8, DOA13, DOA14 y DOA15 en comparación con el cultivo sin tratamiento, en la expresión de los genes BDNF, SOX y NCAM, medida mediante cuantificación de mRNA por RT-qPCR 48h después del tratamiento.

El tratamiento con los compuestos DOA1 y DOA7 reduce tanto los niveles de unión de MeCP2 a los promotores que no eran detectables por qPCR tras la inmunoprecipitación, ya sea por inhibición de la función o por que interfieren de alguna manera con la unión del anticuerpo para la inmunoprecipitación.

En resumen, el compuesto RAO5 ha mostrado buenas cualidades en la mejora de unión de MeCP2 a los promotores de interés el estudio por ChIP en el modelo celular linfoblastoide, y en el de progenitores neuronales, lo cual se correlaciona con una regularización de la expresión de ambos genes mediada por MeCP2, y que se demuestra con la desensibilización al efecto del tratamiento en el modelo con la mutación R294X.

El compuesto DOA15, a pesar de presentar bastante citotoxicidad, mostraba una toxicidad menor en células neuronales que en el resto, y presentaba los mejores valores de estabilización del complejo proteína:dsDNA tanto para la proteína WT como para las proteínas mutantes, y esto se refleja en un aumento de unión de MeCP2 a los dos promotores estudiados en el modelo mutante, aunque no parece ser selectivo.

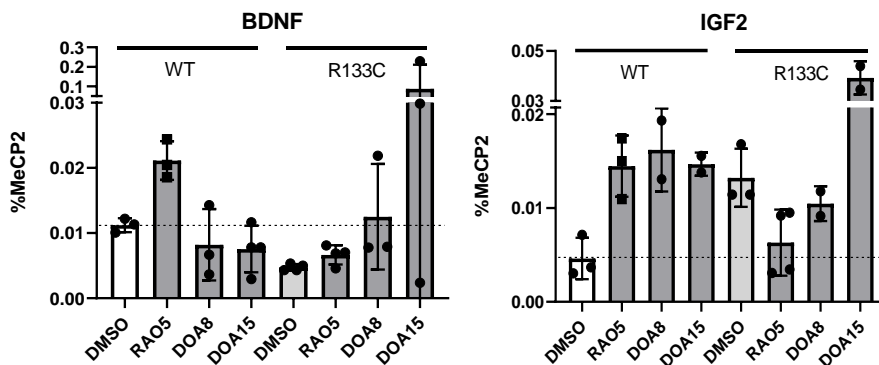


Figura 4.40. Efecto del tratamiento con compuestos estabilizadores del complejo MeCP2:dsDNA (RAO y DOA) en unión a promotores de genes en precursores neuronales. Medidas del efecto del tratamiento de los compuestos RAO y DOA preseleccionados para el tratamiento: RAO5, DOA8, y DOA15 en comparación con el cultivo sin tratamiento, en la unión de MeCP2 a precursores de los genes BDNF e IGF2 48 h después del tratamiento en la línea celular de precursores neuronales RNCe1 WT y con la mutación R133C, medido mediante ChIP-qPCR y expresado como porcentaje de unión con respecto a la medida del input sin inmunoprecipitar

El compuesto DOA8 tiene poco efecto a nivel de modelo celular a la dosis con la que se ha trabajado, causando el menor de los efectos tanto a nivel de cambio de expresión de genes como de unión de MeCP2 a promotores.

4.9 Selección de líneas celulares para el estudio funcional de inhibidores de MeCP2

La hipermetilación del DNA en tumores pancreáticos ha sido demostrada previamente en diferentes tipos de tumores, incluidos los pancreáticos. Algunos de estos estudios han detectado cierta tendencia hacia la sobreexpresión de MeCP2, aunque este no es el caso del cáncer de páncreas, donde hay cierta controversia.

Para nuestro estudio funcional, hemos seleccionado tres líneas celulares provenientes de tejido pancreático: PANC-1 y MiaPaCa2, que son dos líneas provenientes de tumores pancreáticos, y HPDE, que es una línea celular pancreática ductal no-neoplásica., que muestra un genotipo y fenotipo prácticamente normal, sin mutaciones en los genes KRAS y p53 (Radulovich et al., 2008).

Usando estas (y otras) líneas celulares, se ha demostrado previamente la existencia de unos patrones de metilación aberrantes en el caso de PDAC comparado con células no neoplásicas, incluyendo más de 1000 genes con loci hipermetilados y cerca de 400 con loci hipometilados (la mayoría de éstos encontrados dentro del cuerpo de los genes), lo cual refleja el estado de metilación observado en el estudio de tumores provenientes de pacientes, y correlaciona con la desregulación de genes implicados en el desarrollo de los tumores.

De esta manera, nuestro primer objetivo era determinar si hay una diferencia en el nivel de expresión de MeCP2 en las diferentes líneas celulares, y si estos niveles son representativos de las diferencias que puede haber a nivel fisiológico en los tumores pancreáticos.

Para ello, se llevó a cabo en el laboratorio de nuestra colaboradora la Dra. Meritxel Gironella una medida de mRNA mediante RT-qPCR para estudiar la expresión de MeCP2 en las tres líneas celulares, que demostró que no hay una sobreexpresión de MeCP2 en ninguna línea, mostrando valores muy parecidos en las tres. Además, también estudiamos mediante el mismo método la expresión de MeCP2 en una pequeña librería de 28 muestras provenientes de individuos repartidos como 16 muestras sanas y 12 de pacientes con PDAC, y tampoco se observó una diferencia significativa ($t\text{-value} = 0.067$, $p\text{-value} = 0.9473$) entre los dos grupos, en consonancia con los estudios previos con cohortes más grandes (**figura 4.41**).

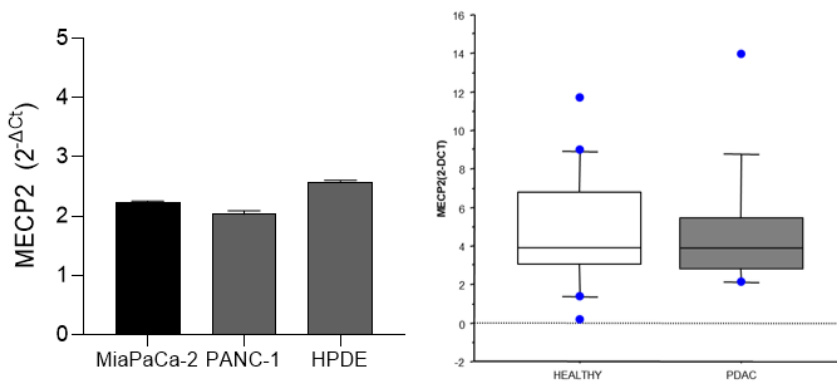


Figura 4.41. Expresión de MeCP2 en PDAC. Cuantificación de la expresión de MeCP2 en líneas celulares de páncreas sano (HPDE) y líneas tumorales (PANC-1 y MiaPaCa-2) (A) así como en tejido pancreático de tumores y de páncreas sano (B) medido mediante RT-qPCR expresado como $2^{-\Delta Ct}$ del housekeeping.

Aunque podía ser esperable una sobreexpresión de MeCP2 en las líneas tumorales o muestras de tumores, esto nos permite estudiar el efecto de los inhibidores entre células tumorales y sanas sin el sesgo de cambio de concentración de la proteína diana, al mismo tiempo que valida nuestro modelo celular como biológicamente representativo. Sin embargo, el hecho de que MeCP2 no esté sobreexpresada en algunos tumores no invalida su papel relevante como diana farmacológica, ya que la presencia de regiones de promotores hipermetilados en esos tumores hace que la actividad de MeCP2 sea

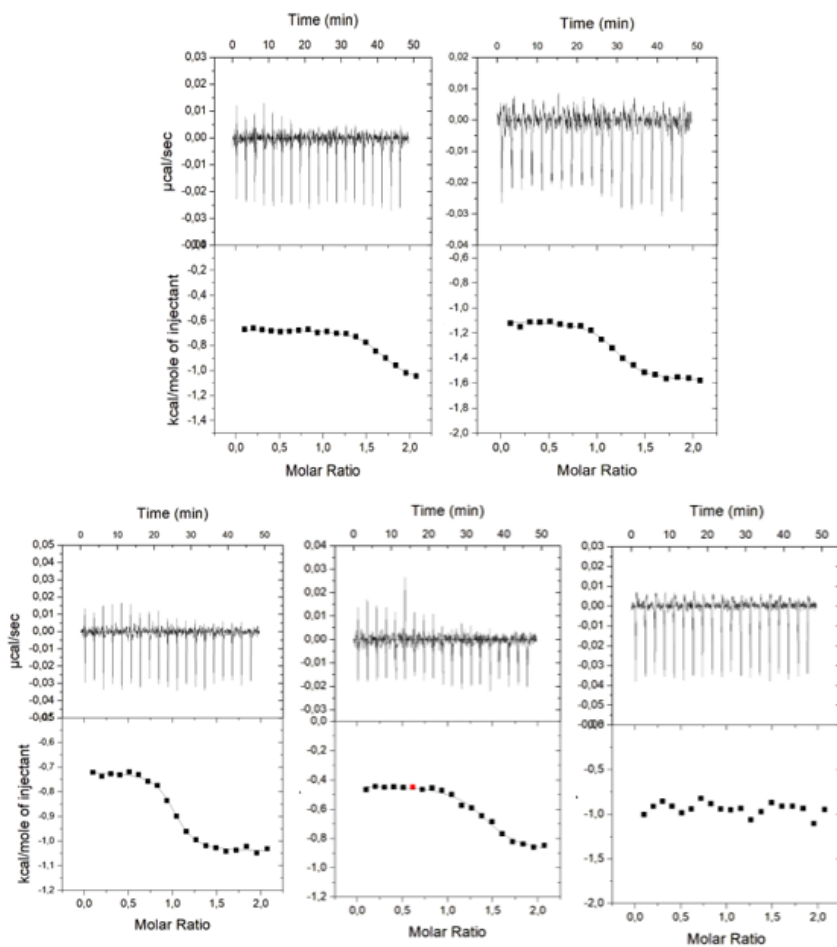


Figura 4.42. Interacción del NTD-MBD-ID con los compuestos ADO por ITC. Titulaciones calorimétricas del NTD-MBD-ID frente a los compuestos identificados como inhibidores de la formación del complejo con dsDNA: en orden, ADO1, ADO2, ADO3, ADO4 y ADO5. Los gráficos de la parte superior muestran los termogramas (potencia térmica en función del tiempo) mientras que los gráficos de la parte inferior muestran las isotermas de interacción (calor normalizado por concentración de ligando en función de la ratio molar). El ajuste de regresión no lineal por mínimos cuadrados usando un modelo de un sitio de unión (línea continua) permite estimar la afinidad y la entalpía del proceso.

clave en la desregulación transcripcional asociada a la aparición de dichos tumores.

4.10 Comprobación de unión de los compuestos a la diana MeCP2 mediante ITC.

A partir del cribado de alto rendimiento basado en el TSA, utilizando únicamente los datos de la quimioteca Prestwick (que contiene compuestos aprobados por la FDA), se seleccionaron 15 compuestos capaces de unirse a MeCP2 e inhibir su unión al DNA ($T_m \text{ MeCP2} < T_m \text{ MeCP2 obs} < T_m \text{ MeCP2:dsDNA}$). Para comprobar esta unión directa, se llevaron a cabo ensayos de ITC a una única temperatura (20 °C) y en un único tampón (50 mM Tris pH 7). El resultado es que todos los compuestos se unían a MeCP2 con una afinidad similar (en el rango de submicromolar) a excepción del ADO5, que en las condiciones experimentales probadas no parece unirse a la proteína. En el caso de ser un falso hit, podría explicarse si la T_m medida en el TSA estuviese alterada por la fluorescencia intrínseca del compuesto, interferencia de la sonda fluorescente usada, o simplemente una contaminación de la quimioteca con otro compuesto (**figura 4.42**).

4.11 Ensayo funcional. Citotoxicidad diferencial en modelos celulares.

Una vez caracterizados los modelos celulares y comprobada la unión de nuestros compuestos a la diana con una afinidad apropiada, quisimos evaluar la estrategia de utilizar MeCP2 como diana terapéutica en cáncer pancreático, cosa que no se ha hecho hasta la fecha, y al mismo tiempo acotar de entre nuestros compuestos propuestos aquellos con mayor potencial para el tratamiento de PDAC.

Aunque todos los compuestos preseleccionados provienen de la quimioteca Prestwick, y por tanto están aprobados por la FDA y se conocen sus propiedades farmacocinéticas, su uso está estudiado para otras patologías, de forma que

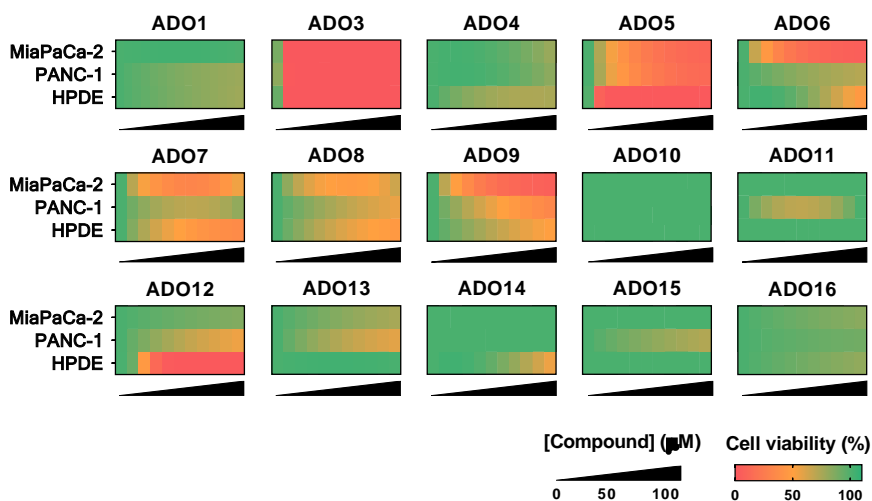


Figura 4.43. Estudio de citotoxicidad de los compuestos ADO en líneas celulares de páncreas. Viabilidad de las líneas celulares MiaPaCa-2, PANC1 y HPDE tratadas con los diferentes compuestos identificados como inhibidores de la formación del complejo MeCP2-dsDNA mostrado como porcentaje de células vivas con respecto al control sin tratamiento, mostrando viabilidad en gradiente de color.

había que estudiar si tienen un efecto antitumoral en células pancreáticas. Al utilizar las tres líneas celulares PANC-1, MiaPaCa-2 y HPDE, queremos estudiar la diferencia de toxicidad de los compuestos ADO entre ellas y así seleccionar aquellos compuestos con mayor efecto antiproliferativo en células tumorales, con la menor toxicidad posible en células sanas.

Según este ensayo, los compuestos el compuesto ADO10 apenas produjo toxicidad en ninguna de las líneas usadas, mientras que el compuesto ADO3 es muy tóxico de forma poco selectiva. Los compuestos ADO4, ADO5, ADO12 y ADO14 fueron más tóxicos en la línea no-neoplásica que en las tumorales, lo cual puede indicar que, aparte de MeCP2, estos compuestos pueden interactuar con otras dianas de forma inespecífica, generando este efecto tóxico al que, además, las líneas tumorales, parecen ser más resistentes (posiblemente debido a las modificaciones genéticas y epigenéticas previas) (figura 4.43).

Los compuestos ADO6, ADO9 y ADO13, y en menor medida ADO7 y ADO8, presentaron más toxicidad en las líneas tumorales que en las sanas. Mientras que los compuestos ADO11 y ADO15 presentaron toxicidad sólo en una de las líneas tumorales, y los compuestos ADO1 y ADO16 se comportaron igual en la línea HPDE que en una de las tumorales, siendo la otra más resistente.

Teniendo en cuenta este ensayo, decidimos seguir adelante con los compuestos ADO6, ADO7, ADO9 y ADO13, que fueron probados por nuestros colaboradores del Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), liderado por el Dr. Juan L. Iovanna, en líneas celulares provenientes de tumores de pacientes, llamadas PDAC087T, PDAC056T y PDAC079T.

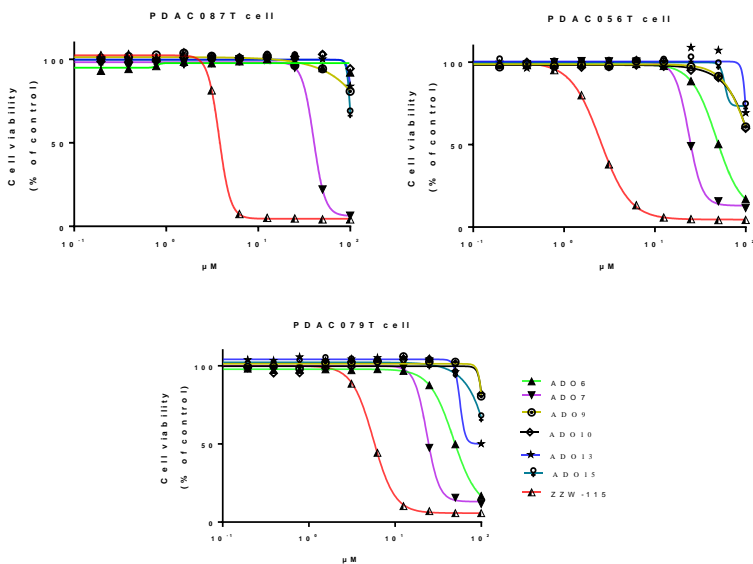


Figura 4.44. Estudio de citotoxicidad de los compuestos ADO en líneas provenientes de pacientes PDAC. Efecto citotóxico ejercido por los compuestos identificados como inhibidores de la formación del complejo MeCP2:dsDNA mostrado como porcentaje de células vivas con respecto al control sin tratamiento, en líneas celulares provenientes de pacientes PDAC.

De ellos, los compuestos ADO6 y ADO7 son los que mejor efecto antitumoral presentaron. El compuesto ADO6 tiene un EC50 de alrededor de 50 µM para dos de las tres líneas testadas (PDAC056T y PDAC079T), y ADO7, que presenta, con un EC50 de 24.5 µM para esas dos líneas celulares y 40.4 µM para

la línea PDAC087T, mientras que el resto de compuestos tienen un EC50 de más de 100 μ M (**figura 4.44**).

Con esto, demostramos que MeCP2 puede ser una diana farmacológica útil en el desarrollo de fármacos contra PDAC, y presentamos los compuestos ADO6 y ADO7 como compuestos candidatos a desarrollo para mejorar sus propiedades farmacológicas y el estudio de éstos y sus derivados en la biología de las células cancerosas ya sea por sí solos, o en combinación con otros fármacos ya utilizados en el tratamiento de PDAC.

5. Discusión

5.1 Estructura y estabilidad de MeCP2

Todos los datos espectroscópicos de la caracterización estructural confirman que MeCP2 y todas las variantes truncadas con las que hemos trabajado son proteínas intrínsecamente desordenadas. El MBD contiene algunas regiones estructuradas con una señal de CD y fluorescencia que disminuye al aumentar la temperatura debido al desplegamiento térmico. La plasticidad de MeCP2 le permite interactuar con diversos *partners* proteicos y DNA. La interacción con el DNA provoca pequeños reordenamientos en la estructura secundaria del MBD, mientras que la versión completa de MeCP2 puede experimentar reordenamientos más grandes debido a la participación de dominio ID, pero la amplia región desestructurada dificulta la observación de señales de CD significativas en esta zona.

El impacto de las regiones desordenadas sobre la estabilidad y las características funcionales de las regiones bien plegadas de las proteínas sigue siendo una cuestión importante y difícil de dilucidar, íntimamente relacionada con la regulación de la función proteica y el control alostérico (modulación de la conformación y, por tanto, del paisaje conformacional/funcional, por interacción con otras biomoléculas). En el caso de MeCP2, los dos dominios que flanquean al MBD en MeCP2 (NTD e ID) aumentan la estabilidad del MBD y la afinidad de unión al dsDNA. Esto es un hecho muy relevante e inesperado, porque esos dos dominios están totalmente desordenados y el MBD también está desordenado en un 40%, aproximadamente.

En los datos del estudio de desnaturalización térmica por fluorescencia, la entalpía de desplegamiento proporciona información sobre la cooperatividad del plegamiento y la cantidad de residuos estructurados en la conformación nativa. Aunque con una gran variabilidad, se ha demostrado que la entalpía de

desplegamiento a 60 °C, $\Delta H(60\text{ °C})$, y a 100 °C, $\Delta H(100\text{ °C})$, de proteínas plegadas se correlaciona significativamente bien con el número de residuos de la proteína (Robertson & Murphy, 1997). Los valores de $\Delta H(60\text{ °C})$ y $\Delta H(100\text{ °C})$ teóricos serían 60 y 110 kcal/mol, respectivamente; sin embargo, a partir de los valores en la **tabla 4.7** los valores extrapolados de $\Delta H(60\text{ °C})$ y $\Delta H(100\text{ °C})$ son 40 y 60 kcal/mol. Por lo tanto, la entalpía de desplegamiento medida es mucho menor de lo esperado para una proteína estructurada con la misma masa molecular, y podemos concluir que solo el 60% de MBD está estructurado, en total acuerdo con resultados experimentales y computacionales anteriores (Ghosh et al., 2008; Ghosh, Nikitina, et al., 2010) .

Aunque el estudio inicial se hizo mediante el estudio de fluorescencia durante la desnaturalización térmica, esto tiene limitaciones, tal y como se ha comentado anteriormente (artefactos debido al aumento de la temperatura, y el estudio únicamente local del entorno del único triptófano de la proteína), de forma que se superaron dichas limitaciones mediante el estudio mediante DSC (que es representativo del proceso global) y mediante desnaturalización química isotérmica. Según los datos de DSC, se puede observar que el MBD aislado se despliega en un proceso de una única transición, mientras que el NTD-MBD-ID se despliega con estados intermedios. Estas dos transiciones observadas pueden ocurrir en el entorno del MBD, donde la presencia de los dominios desordenados separe o desacople dos eventos de desplegamiento disminuyendo la cooperatividad del proceso de desplegamiento; o puede ser que una de las transiciones ocurra en el NTD o el ID, de modo que, adquiriendo cierta estructura parcialmente, pueda desplegarse. Teniendo en cuenta los parámetros estimados de estructura secundaria por CD, al añadir estos dominios aumenta el contenido en lámina beta, que la predicción de estructura secundaria mediante PSIPRED sitúa en el NTD. Si estas zonas no establecen interacciones intramoleculares con el entorno del triptófano, esto podría explicar por qué esta transición no se observa en las desnaturalizaciones seguidas por fluorescencia, pero sí en las calorimétricas.

El efecto estabilizador de estos dominios desordenados es evidente en cualquiera de las técnicas estudiadas, pero al poner el foco en los datos de DSC se puede ver un hecho interesante. Al calcular la fracción molar de cada una de las especies relevantes (**Figura 5.1**) a partir de los datos de tabla 4.4 parámetros DSC, se puede ver que en el caso del MBD, a 20 °C el 96% de la proteína tiene una conformación nativa, y alcanza el 50% a 37.4 °C. Sin embargo, como en la desnaturalización del constructo NTD-MBD-ID coexisten más especies conformacionales relevantes, aparte de los estados nativo y desplegado, a 20 °C solo el 75% de la proteína está en su conformación nativa, con una energía de Gibbs de estabilización considerablemente menor. Esto implica que, aunque la construcción más grande requiere una temperatura más elevada para un desplegamiento global, la integridad de la proteína se ve comprometida a temperatura más baja (menor fracción molar nativa y menor energía necesaria para el desplegamiento). Un ejemplo de las consecuencias de este hecho se ve claramente a 37.2 °C, donde el MBD se encuentra en un 50% en conformación nativa, con una energía de estabilización de Gibbs de 0 kcal/mol, mientras que el constructo NTD-MBD-ID se encuentra en conformación nativa en un 46%, con una energía de estabilización de Gibbs de -0.7 kcal/mol. La existencia de dos transiciones en el desplegamiento de NTD-MBD-ID refleja una menor cooperatividad de plegamiento (es decir, una cierta independencia entre dominios) y un paisaje conformacional más complejo que el de MBD.

Esto pone de manifiesto las carencias que tiene un estudio de estabilidad solamente basado en una comparación de T_m , sin tener en cuenta la energía de estabilización de Gibbs a temperaturas relevantes a nivel fisiológico.

Previamente se había demostrado que, en contra de los resultados reportados aquí, la adición de los dominios NTD e ID disminuye la estabilidad estructural de MBD (Ghosh, R. P. 2010b). Sin embargo, en esos estudios se emplearon condiciones experimentales ligeramente diferentes (pH 7.4 y NaCl 150 mM). El diferente pH no debería ser responsable de la discrepancia, ya que en datos previamente publicados en nuestro grupo se observa un efecto estabilizador de

los dominios flanqueantes en el rango de pH de 7 a 9. Por lo tanto, el factor clave debe ser la baja fuerza iónica empleada en nuestros experimentos. En una proteína altamente polar y básica, como MBD y sus variantes, la alta fuerza iónica puede enmascarar efectos específicos y no específicos de los dominios desordenados flanqueantes, lo que resulta en un efecto estabilizador disminuido.

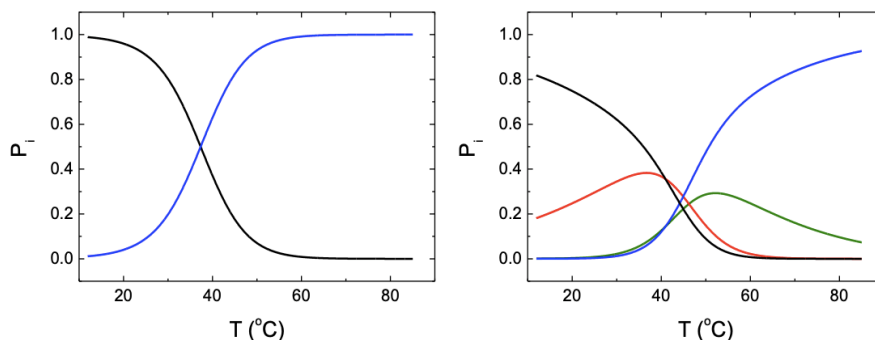


Figura 5.1. Fracción molar de los diferentes estados conformacionales de las construcciones de MeCP2. El estado nativo (negro), estados intermedios (rojo y verde) y estado desplegado (azul) para el MBD (izquierda) y NTD-MBD-ID (derecha) calculado a partir de los datos de la tabla 4.4

Según los datos de DLS (*Dynamic Light Scattering*), MBD presenta un radio hidrodinámico similar al predicho según su peso molecular. Sin embargo, NTD-MBD-ID mostró un radio hidrodinámico mucho más grande de lo esperado. Para MBD, se esperaría un radio hidrodinámico de alrededor de 1.9 nm si estuviera completamente plegado o de 2.9 nm si estuviera completamente desplegado (<https://www.fluidic.com/toolkit/hydrodynamic-radius-converter/>). El radio observado de MBD fue de 1.6 nm, lo que indica que contiene una proporción considerable de estructura plegada, como se esperaba. Por otro lado, NTD-MBD-ID mostró un radio anormalmente grande de 5.5 nm, mucho mayor que el predicho incluso si estuviera completamente desplegado. Si NTD-MBD-ID estuviera completamente plegado o desplegado, se esperaría un radio hidrodinámico de alrededor de 2.5 nm o 4.6 nm, respectivamente. Por lo tanto, asumiendo las limitaciones de la medida (considerando las incertidumbres experimentales y las aproximaciones aplicadas al estimar el radio hidrodinámico

aparente mediante DLS, así como las incertidumbres asociadas con la estimación del tamaño a partir del peso molecular de la proteína), NTD-MBD-ID debe contener una proporción muy grande de desorden intrínseco en las condiciones experimentales en que se realizaron las medidas y los estados intermedios de desplegamiento que se deducen de los ensayos de DSC tienen un grado de desorden mucho mayor que el estado nativo, incluido en la zona del MBD.

5.2 Interacción con el dsDNA

Aunque hay varios trabajos que estudian termodinámicamente la interacción de MeCP2 con dsDNA, hay cierta variabilidad entre los resultados publicados, debido a cambios en las condiciones utilizadas para hacer los ensayos (tanto el pH como la fuerza iónica tienen un gran efecto en la afinidad de esta unión), así como la secuencia y longitud del dsDNA y la forma de modificarlo epigenéticamente (hemimetilado o simétricamente metilado). Por esta razón era muy importante estandarizar las condiciones de todos los ensayos para poder extraer conclusiones comparando la interacción con los diferentes constructos truncados (y mutaciones causantes de RTT), así como con las modificaciones epigenéticas del dsDNA, sobre todo con el hmCpG-dsDNA, que ha sido menos estudiado hasta ahora.

Según el perfil termodinámico experimentalmente determinado para la interacción MBD-dsDNA (una unión dirigida por la entropía, con entalpía de unión desfavorable y una capacidad calorífica de unión grande y negativa), sería razonable esperar que las interacciones hidrofóbicas sean predominantes. Sin embargo, la interfaz de unión entre MBD y dsDNA es fundamentalmente de naturaleza polar, con una mayoría de grupos iónicos básicos. Se ha observado anteriormente que, en general, las proteínas que se unen al surco mayor del DNA exhiben una unión dirigida por la entalpía, mientras que aquellas que se unen al surco menor exhiben una unión dirigida por la entropía. Sin embargo, MBD se une al surco mayor, pero su unión está impulsada por la entropía, con una entalpía de unión ligeramente desfavorable. Además, la gran capacidad

calorífica de unión negativa asociada a la formación del complejo indica una interacción muy restringida que implica cambios en la estructura o dinámica de las moléculas de los ligandos o el medio alrededor. Todas estas discrepancias sugieren que el mecanismo de interacción MBD:dsDNA es más complejo de lo que parece, y puede estar asociado a un cambio conformacional o configuracional mayor del observado por CD, y a efectos mediados por las moléculas de agua.

Existen dos estructuras cristalográficas disponibles para un complejo MeCP2:dsDNA: MBD unido a dsDNA simétricamente metilado (PDB 3c2i, K. L. Ho et al., 2008) y dsDNA hemi-hidroximetilado unido a MBD (PDB 6yww, Ibrahim et al., 2021). A pesar de algunas limitaciones (modificación de citosinas simétricas y no simétricas, y DNAs con diferentes secuencias), se puede obtener información valiosa al compararlas teniendo en cuenta los datos termodinámicos que hemos obtenido.

Las interacciones clave que involucran la citosina principal en cada complejo se muestran en la **Figura 5.2**: con las bases nitrogenadas adyacentes, los aminoácidos R133, S134 y moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno para el complejo mCpG-DNA; y con las bases nitrogenadas adyacentes, R133, K135 y moléculas de agua unidas por enlaces de hidrógeno para el complejo hmCpG-DNA. Se observan diferencias importantes en las interacciones con la citosina principal. En el complejo mCpG-DNA hay 5 moléculas de agua que establecen 8 enlaces de hidrógeno, y la 5mC establece un enlace de hidrógeno con una molécula de agua a través del nitrógeno-4, y otros enlaces de hidrógeno con las bases nitrogenadas adyacentes; cabe destacar que, R133 no interactúa directamente con la 5-mC. Sin embargo, en el complejo hmCpG-DNA hay 3 moléculas de agua que establecen 3 enlaces de hidrógeno, y la 5hmC establece un enlace de hidrógeno con una molécula de agua y dos enlaces de hidrógeno con R133 a través del grupo hidroxilo, y otros enlaces de hidrógeno con las bases nitrogenadas adyacentes.

La reducción en el número de enlaces de hidrógeno con moléculas de agua en el caso de hmCpG-DNA puede estar relacionada con la entalpía de unión menos favorable en comparación con mCpG-DNA (**tabla 4.6**). Además, la mayor capacidad calorífica de unión para hmCpG-DNA puede explicarse considerando esas diferencias estructurales: la reducción en el número de moléculas de agua atrapadas dentro de la interfaz de unión proteína-dsDNA sugiere una mayor deshidratación al unirse hmCpG-DNA, lo que resulta en una capacidad calorífica de unión más negativa y una entropía global menos desfavorable (debido a una entropía de desolvatación más favorable) (**tabla 4.6**). Además, el enterramiento del grupo hidroxilo en 5hmC contribuirá aún más a una capacidad calorífica de unión más negativa, como se concluye a partir del cálculo de parámetros energéticos del plegamiento y de la unión, ya que los grupos hidroxilo se comportan de manera similar a los grupos no polares en cuanto a la capacidad calorífica de unión (Freire, 1997; Gómez & Freire, 1995b).

Como información adicional, el dominio ID aislado puede interactuar con hmCpG-DNA con una afinidad similar a la de CpG-DNA o mCpG-DNA. Ya se conocía que este dominio era capaz de interactuar con el dsDNA (Wakefield et al., 1999), pero no se había establecido si MBD e ID se unirían al mismo fragmento de dsDNA o si podrían unirse a dos fragmentos de dsDNA independientes. Al observar dos procesos de interacción en las isotermas de ITC, se puede concluir que cada dominio puede unir una molécula de dsDNA diferente e independiente (es decir, MBD e ID no interactúan con la misma molécula de dsDNA). El aumento en la afinidad de unión observado para MBD en presencia del dominio ID indica algún tipo de acoplamiento estructural y energético entre ambos dominios. Esto sugiere que la presencia del dominio ID modifica la interacción de MBD con el dsDNA, mejorando significativamente su afinidad de unión.

Esta es una importante observación que ayuda a entender la función de MeCP2 como un elemento de remodelación de la arquitectura de la cromatina mediante

la generación de bucles de dsDNA (Hansen J. C. 2010; Ghosh, R. P 2010a; Thambirajah A.A. 2012).

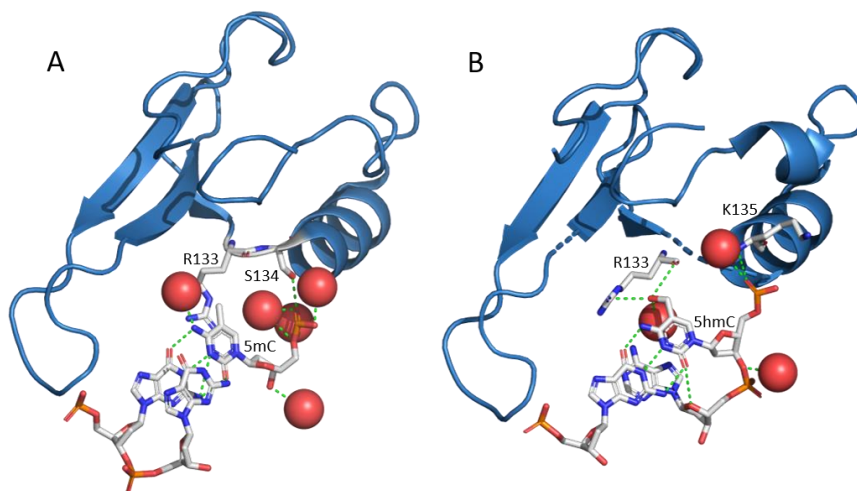


Figura 5.2. Representación esquemática de la interacción de 5-mC y 5-hmC con el dominio MBD de MeCP2. Interacciones principales entre la citosina modificadas con residuos del MBD y moléculas de agua en las estructuras cristalográficas disponibles: PDB 3c2i para el complejo mCpG-DNA (A), y PDB 6yww para el complejo hmCpG-DNA (B). Las moléculas de agua se muestran como esferas rojas y los residuos MBD clave que interactúan con 5-mC y 5-hmC están resaltados. Los enlaces de hidrógeno se muestran como segmentos verdes punteados.

En la variante NTD-MBD-ID se observan dos sitios de unión al DNA: uno de alta afinidad en MBD y otro de baja afinidad en ID. Esta interpretación se basa en la afinidad de unión al DNA submicromolar para el MBD aislado y el NTD-MBD, y en estudios previos que muestran una mayor afinidad de MBD aislado para el DNA en comparación con ID aislado. Además, las mutaciones en MBD asociadas con el RTT afectan drásticamente solo al sitio de alta afinidad en la variante NTD-MBD-ID, lo que respalda que este sitio de alta afinidad corresponde a MBD. Estos hallazgos son relevantes para comprender la función de MeCP2 en el contexto del síndrome de Rett y otras interacciones con el DNA.

El MBD aislado se une al dsDNA de manera predominantemente dirigida entrópicamente, con una pequeña y desfavorable contribución entálpica. Sin embargo, cuando está en presencia del dominio ID, la unión al dsDNA se vuelve

altamente exotérmica y está dirigida principalmente por contribuciones entálpicas y entrópicas grandes y opuestas. Estas diferencias indican que el modo de interacción del MBD con el dsDNA varía drásticamente dependiendo de su contexto estructural. La presencia del dominio ID puede desencadenar cambios conformacionales y efectos alostéricos que afectan significativamente al proceso de unión al dsDNA. Estos hallazgos son relevantes para comprender la función de MeCP2 en la regulación de la cromatina y su interacción con el DNA, ya que resaltan la importancia del contexto estructural en la dinámica de la unión y ponen en valor el uso del constructo NTD-MBD-ID como modelo de MeCP2 para la unión con dsDNA en detrimento del MBD aislado.

Una de las características más sorprendentes de la interacción entre hmCpG-dsDNA y NTD-MBD-ID es su insensibilidad a los cambios en la fuerza iónica, mientras que CpG-dsDNA y mCpG-dsDNA muestran una pérdida significativa de afinidad (reducción de 1000 veces) a alta fuerza iónica. Este comportamiento puede interpretarse utilizando la siguiente relación

$$\frac{\partial \ln K_B}{\partial \ln[X]} = \Delta n_X \quad (12)$$

donde K_B representa la constante de asociación para la unión del ligando primario (en nuestro caso es dsDNA), X se refiere al ligando secundario (en nuestro caso son iones salinos), y Δn_X indica la diferencia en la fracción de saturación del ligando X entre el complejo y la proteína y el ligando primario libres (Wyman, 1964). En consecuencia, Δn_X representa el número neto de moléculas de ligando X que se liberan (si es negativo) o se capturan (si es positivo) desde la solución al formar el complejo con el ligando primario. En el caso de hmCpG-DNA, los resultados indican que prácticamente no hay liberación neta de iones de sal hacia la solución al formarse el complejo proteína:DNA. En cambio, al menos tres iones de sal son liberados al formarse el complejo con CpG-DNA o mCpG-DNA. Este

hallazgo proporciona evidencia adicional que respalda el modo de interacción diferente de hmCpG-DNA en comparación con los otros tipos de dsDNA.

A pesar de la similitud en la afinidad de unión, las desnaturalizaciones térmicas monitorizadas por la fluorescencia intrínseca del triptófano mostraron un efecto de estabilización inducido por hmCpG-DNA en las construcciones de MeCP2, MBD y NTD-MBD-ID con valores de T_m intermedios entre los efectos causados por CpG-DNA y mCpG-DNA (**figura 4.14, tabla 4.7**). El efecto en la energía de estabilización inducido por la unión de dsDNA se puede cuantificar mediante la relación:

$$\Delta\Delta G = \frac{\Delta H(T_m)}{T_m} \Delta T_m \quad (13)$$

resultando también valores intermedios para el hmCpG-dsDNA entre los valores de CpG-dsDNA y mCpG-DNA. Por lo tanto, MeCP2 puede interactuar de manera diferente con los tres dsDNAs, discriminándolos eficazmente en términos de la estabilidad estructural general del complejo. Los resultados obtenidos con hmCpG-dsDNA refuerzan la consideración de NTD-MBD-ID como un adecuado sustituto para la proteína completa MeCP2 en cuanto a la estabilidad estructural y las características de interacción con dsDNA (**tablas 4.6, 4.7**).

Las desnaturalizaciones térmicas revelaron que la modificación de la citosina también afecta a la cooperatividad del desplegamiento. Se observó una sola transición de desplegamiento en todos los complejos (MBD y NTD-MBD-ID unidos a cualquier tipo de dsDNA). Sin embargo, hmCpG-dsDNA desacopla el desplegamiento de los dos sitios de unión a dsDNA en la proteína MeCP2 completa, ya que en el análisis se tuvieron que considerar dos transiciones de desplegamiento para poder reproducir los datos experimentales. Esto sugiere que la conformación local de los sitios de unión al dsDNA y/o la conformación global de la proteína y los contactos entre dominios pueden ser bastante

diferentes en esos complejos. De hecho, las grandes diferencias en el tamaño molecular de NTD-MBD-ID en ausencia y presencia de DNA medidas por DLS: un radio hidrodinámico de 5.5 nm, 4.3 nm y 3.9 nm para NTD-MBD-ID libre, unido a CpG-DNA y unido a mCpG-DNA, respectivamente (**tabla 4.9, figura 4.15**) son un reflejo de la plasticidad y adaptabilidad estructural de las proteínas desordenadas e interacciones modulares ante cambios menores en las moléculas interaccionantes.

La menor afinidad de unión de MBD comparada con NTD-MBD-ID resultó en un menor grado de estabilización, como se observó en las desnaturalizaciones térmicas espectroscópicas (**figura 4.12, tabla 4.7**) y calorimétricas. Las trazas calorimétricas proporcionan más información, ya que no sólo se detectan los eventos de desplegamiento cerca del único triptófano, sino también otros procesos que tienen lugar (por ejemplo, el desplegamiento del dsDNA). En el caso de los complejos de MBD se pudieron distinguir transiciones no superpuestas para la proteína y el dsDNA, a partir de las cuales se estimó el efecto de estabilización inducido por el dsDNA en la proteína (que refleja el acoplamiento entre la disociación del complejo y el desplegamiento de la proteína). Los tres dsDNAs diferentes mostraron trazas de desplegamiento idénticas, lo que indica que la metilación e hidroximetilación no alteraron la estabilidad del dsDNA de 45 pb, a diferencia de lo que se ha informado para la desestabilización inducida por 5hmC y la estabilización inducida por 5mC en secuencias de DNA más cortas (**figura 4.4**).

En el caso de los complejos NTD-MBD-ID, las transiciones de la proteína y el dsDNA se superpusieron (reflejando el acoplamiento entre la disociación del complejo y el desplegamiento de la proteína/dsDNA), a partir de las cuales fue más difícil estimar el efecto de estabilización en la proteína, pero aún en concordancia razonable con los experimentos espectroscópicos. Se observó una entalpía de desplegamiento global muy grande. Dado que la entalpía de desplegamiento intrínseca de la proteína es bastante pequeña, la principal contribución a la entalpía global de desplegamiento debe provenir de la

disociación proteína:dsDNA (interacciones no covalentes que se rompen y cualquier cambio conformacional asociado). De hecho, la gran entalpía negativa de unión proteína-dsDNA a 20 °C (aproximadamente -50 kcal/mol), junto con una gran capacidad calorífica de unión negativa (aproximadamente -3 kcal/mol) para el sitio de unión de alta afinidad, además de la interacción y estabilización adicionales provenientes del sitio de unión de baja afinidad, resultaría en una entalpía de disociación muy grande y positiva para el complejo proteína:dsDNA a alta temperatura (**tabla 4.4**).

Hay una discrepancia entre el efecto estabilizador inducido por unión de dsDNA con las pequeñas diferencias en las afinidades de unión estimadas mediante calorimetría de titulación isotérmica. Una posible explicación para esta discrepancia podría ser que los datos de estabilización reflejan el efecto final en estado estacionario de la interacción entre MeCP2 y el dsDNA después de una larga incubación, donde hay tiempo suficiente para que el complejo alcance la configuración óptima. En cambio, en los ensayos de interacción por ITC se observa el efecto transitorio de la interacción en los primeros minutos después de la mezcla instantánea, y puede que no haya suficiente tiempo para que el complejo alcance la configuración de unión final óptima. Esto podría llevar a una estimación de afinidades de unión más bajas en los experimentos de ITC en comparación con los ensayos de estado estacionario que podría indicar que el mecanismo de selectividad de unión por el mCpG-dsDNA puede estar condicionado por otros parámetros, como la cinética de interacción, o la reestructuración lenta del complejo, que no han podido estudiarse con las técnicas utilizadas.

Al utilizarse las construcciones más grandes de la proteína, incluyendo los dominios distales (TRD, CTD α y CTD β) llama la atención que, a pesar de contener motivos que pueden interaccionar con el dsDNA, como los *AT-hook*, la estequiometría de la unión aumenta y se mantiene en 2 (1:2 MeCP2:DNA), lo cual implica que no hay sitios de unión independientes y adicionales en los dominios distales. Tampoco varía mucho la interacción en términos de afinidad

o estabilización del complejo. A pesar de ello, hay ciertas diferencias entre la interacción de la construcción NTD-MBD-ID con la proteína completa comparando los parámetros termodinámicos. Esto puede ser debido a que estas zonas modulan a su vez la interacción en el segundo sitio de unión pudiendo alterar los parámetros de unión, por ejemplo, generando barreras cinéticas a la disociación del complejo.

5.3 Interacción de MeCP2 con histonas.

Teniendo en cuenta la capacidad de MeCP2 para interactuar masivamente con la cromatina a nivel del nucleosoma, la función de MeCP2 como proteína de andamiaje sustituyendo a H1 como nexo entre nucleosomas, la presencia de las colas desordenadas de histonas que sobresalen de los mismos, constituyendo *hot spots* epigenéticos que modulan la accesibilidad de muchas proteínas al DNA, y la capacidad de MeCP2 para interactuar con una amplia gama de *partners* biológicos, no sería totalmente inesperado algún tipo de interacción entre MeCP2 y las histonas nucleosomales. Siguiendo esta hipótesis, en este trabajo hemos aportado pruebas directas de la interacción de MeCP2 y MBD con las cuatro histonas canónicas.

Las principales limitaciones de este estudio son el uso de la construcción del MBD aislado para la mayoría de ensayos en vez de la proteína completa, y que no se ha completado la caracterización biofísica de la unión en su totalidad (es decir, se ha demostrado la interacción y determinado la afinidad de interacción, pero no se han estimado las contribuciones entálpicas y entrópicas de dicha interacción, siendo en cierta manera aspectos secundarios).

Aunque las pruebas iniciales se realizaron con la proteína completa, la mayoría de los experimentos se llevaron a cabo con el MBD, debido a su relevancia funcional y la facilidad de trabajo (la construcción MBD presenta menor propensión a agregar y precipitar, y se degrada más difícilmente que la proteína completa). Se ha proporcionado evidencia directa de la existencia de un sitio de unión a histonas en el MBD, lo que sugiere que MeCP2 interactúa con las

histonas a través de este dominio y también se plantea la posibilidad de que el segundo sitio de unión a histonas que se observa en la proteína completa se localice en el dominio TRD/NID.

Como no se han hecho todos los ensayos para una caracterización biofísica de estas uniones hay evidencia de interacción directa y una medida de afinidad, pero no se han obtenido el resto de los parámetros termodinámicos independientes del buffer (entalpía y entropía de interacción), capacidad calorífica de interacción, el número de protones intercambiados con el medio....

El MBD interactúa con las cuatro histonas nucleosomales con una afinidad similar ($K_d \approx 30-60$ nM), mostrando baja especificidad dentro de esta familia de proteínas, lo cual tiene sentido teniendo en cuenta la similitud estructural y funcional entre histonas. Sin embargo, considerando el rango de afinidades y los valores de entalpía de interacción medidos, la unión es de alta especificidad dentro del interactoma completo de MeCP2, ya que la afinidad es elevada y la concentración de las histonas es igualmente elevada. Incluso teniendo en cuenta la contribución del buffer a los parámetros termodinámicos medidos, la interacción MBD-histonas parece estar dirigida principalmente por una contribución entálpica muy favorable y exotérmica (de -19 a -56 kcal/mol), acompañada de una penalización entrópica, seguramente debida a la restricción de movilidad o plegamiento parcial de regiones desordenadas de ambas proteínas al unirse. Las contribuciones entálpicas fuertes son comunes en interacciones proteína-proteína que involucran proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs) (Hadži & Lah, 2022; Zavrtnik et al., 2021). Cuando hay una reducción significativa en la afinidad de unión, como el efecto de la mutación R106W en la interacción con H2A o H2B, también se observa una interacción entálpica menos favorable o incluso desfavorable.

Los experimentos se han hecho en condiciones no fisiológicas: en tampón Tris 50 mM, pH 7, NaCl 20 mM. El tampón Tris tiene una entalpía de ionización elevada que puede distorsionar las entalpías y entropías de interacción aparentes

y sean muy diferentes de los parámetros intrínsecos, de forma que, aunque la interacción está suficientemente probada y las afinidades medidas son fiables, hay que ser cautelosos con la descomposición en componentes entálpicos y entrópicos, hasta que se realice una caracterización biofísica completa, que no entraba dentro de los objetivos de este estudio. La fuerza iónica del medio puede variar la fortaleza y selectividad de la interacción, sobre todo teniendo en cuenta la gran cantidad de grupos cargados y polares presentes en las IDPs. Sin embargo, los estudios con alta fuerza iónica prueban que, aunque la afinidad se vea reducida al aumentar la fuerza iónica, sigue teniendo unos valores suficientemente altos como para que la interacción MeCP2:histonas sea biológicamente relevante, sobre todo teniendo en cuenta las altas concentraciones de estas proteínas en el núcleo.

Observando los resultados de la interacción con H3 trimetilada, se ha probado que la trimetilación en las posiciones K4 y K9 apenas afecta a la afinidad de interacción entre MBD e histonas, mientras que la trimetilación en K27 y K36 reduce significativamente la afinidad de interacción. Esto sugiere que el sitio de unión de MeCP2 se encuentra en la región de la cola desordenada de histonas cercana al nucleosoma (**figura 5.3**). Los dos sitios de unión a histonas, unidos a los dos sitios de unión a dsDNA explicarían la función arquitectural en la cromatina llevada a cabo por MeCP2 generando complejos, involucrada en interacciones ternarias o de orden superior, al unirse a otros elementos nucleares ya descritos. Se ha reportado anteriormente que MeCP2 se une específicamente a nucleosomas en los que K27 está trimetilada, con algún tipo de dependencia de la metilación del DNA como mecanismo de refuerzo hacia la represión transcripcional (W. Lee et al., 2020; Thambirajah et al., 2012). Aunque nosotros hemos observado un resultado similar con la construcción NTD-MBD-ID (aumento de afinidad frente a dsDNA metilado en presencia de H3), la afinidad de interacción de MBD con H3 disminuye cuando K27 está trimetilada. Sin embargo, la comparación directa con los resultados anteriores no es apropiada porque en nuestro caso la mayoría de los experimentos se realizaron *in vitro* con MBD aislado y con proteínas purificadas en solución, que es un escenario

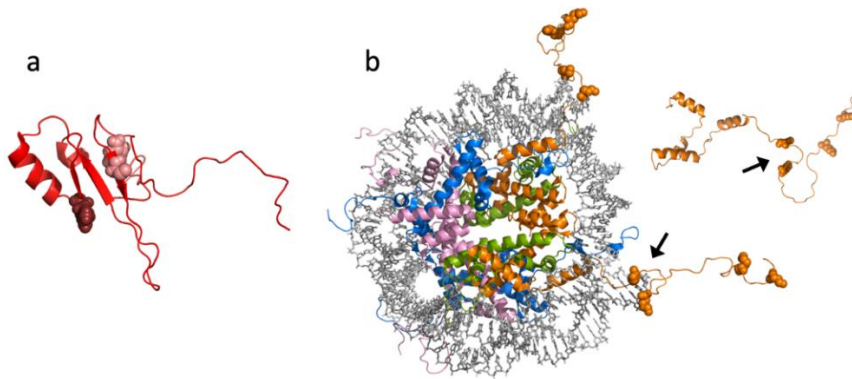


Figura 5.3. Modelos estructurales de MBD y H3 dentro del nucleosoma. (a) Modelo AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk>) para la estructura de MBD (UniProt: A0A075BPH5) mostrando la localización de las dos mutaciones asociadas al síndrome de Rett estudiadas en este trabajo: R106 (rojo claro) y R133 (rojo oscuro). (b) Estructura del nucleosoma (código PDB: 1kx5), mostrando el octámero de histonas como modelo *cartoon* (histonas en diferentes colores, H3 en naranja) y el dsDNA como modelo *stick* (gris). El modelo AlphaFold para la histona H3 aislada (UniProt: B4E380) también se muestra a la derecha. Las lisinas K4, K9, K27 y K36 se muestran en modelo de esfera. Las flechas negras apuntan a K27 y K36, situadas cerca del nucleosoma

diferente comparado con la interacción de MeCP2 con nucleosomas dentro de la célula, lo que puede añadir elementos/factores intrínsecos o extrínsecos adicionales (por ejemplo, dominios de MeCP2 u otras moléculas) que medien dicha interacción. Por tanto, se requiere más trabajo para evaluar este posible efecto de cooperatividad.

La trimetilación en las posiciones K9 y K27 de las histonas se asocia a la represión transcripcional, mientras que la trimetilación en K9 y K36 tiene un efecto contrario. Como MeCP2 es conocido como mediador de represión, se podría pensar *a priori* que su unión estaría correlacionada con las marcas histónicas asociadas también a represión, ya sea por aumento de afinidad cuando H3 tiene marcas asociadas a represión transcripcional o por disminución de afinidad cuando H3 tiene marcas asociadas a activación transcripcional. Sin embargo, sorprendentemente, la unión de MBD depende de la localización de la metilación, independientemente del efecto biológico de la marca. Esto apoya

el hecho de que la regulación epigenética de MeCP2 no es un simple interruptor de "encendido" o "apagado", sino un ajuste fino resultado de múltiples señales que influyen en la expresión génica según el contexto molecular.

Los ensayos de interacción de complejos ternarios que incluyen a MeCP2 con H3 y el dsDNA responden a alguna de las cuestiones que se quedaron sin responder anteriormente: pequeña diferencia entre la afinidad *in vitro* de MeCP2 por el dsDNA metilado y sin metilar frente a una preferencia considerable *in vivo* por dsDNA metilado. En el contexto de los complejos ternarios, se observa que aumenta la diferencia entre de afinidad de interacción con dsDNA metilado y no metilado. Es decir, la formación de un complejo de MeCP2 con H3 parece causar un cambio conformacional en MeCP2 que aumenta su capacidad de discriminar entre los diferentes estados de metilación del dsDNA. Sin embargo, esto es sólo una parte de los procesos biofísicos implicados en la lectura de marcas epigenéticas y regulación transcripcional. Por ejemplo, se sabe que MeCP2 puede inducir la separación de fases líquido-líquido (LLPS) en presencia de dsDNA con suficiente longitud, y que este proceso es dependiente de la metilación del dsDNA (H. Zhang et al., 2022), lo que puede contribuir a su capacidad de discriminación de estados de metilación de dsDNA.

En conjunto, con nuestros datos se abre camino a más estudios que podrían proporcionar información sobre cómo la formación del complejo con las histonas puede alterar el proceso de separación de fases en presencia de dsDNA, y si las marcas epigenéticas en histonas o las mutaciones causantes de RTT pueden tener un efecto (des)estabilizante de las *droplets* generadas tras la separación de fases, y tener un impacto en la estructuración de la heterocromatina *in vivo*. Otra cuestión no resuelta es la interacción de MeCP2 con las histonas en el contexto del octámero plegado, y más allá, formando un nucleosoma con la hebra de dsDNA.

5.4 Fisiopatología de las mutaciones causantes de RTT

Las regiones desordenadas en las proteínas están compuestas principalmente por aminoácidos polares y cargados que tienen una alta propensión a estar expuestos al solvente. A pesar de su falta de estructura definida, estas regiones pueden afectar a la conformación y función de la proteína a través de interacciones estéricas y electrostáticas. Aunque hemos demostrado que las regiones desordenadas son esenciales para MeCP2 y alteran considerablemente su estructura, estabilidad y afinidad por sus ligandos, lo cierto es que las mutaciones de MeCP2 asociadas a RTT se encuentran en su mayoría en las regiones estructuradas de la proteína. De hecho, se han descrito diferentes variantes de MeCP2 mutadas en el dominio ID que no son causantes de patología (por ejemplo, T196S y T197M), mientras que las únicas mutaciones patológicas encontradas en este dominio son mutaciones sin sentido que causan un truncamiento prematuro de la proteína, de forma que los efectos patológicos pueden estar causados por la falta de dominios efectores, como puede ser el TRD (Miltenberger-Miltenyi & Laccone, 2003). Esto puede deberse a que la plasticidad estructural, así como la abundancia en aminoácidos de características similares, puede ejercer un papel amortiguador o adaptativo de forma que las mutaciones en este dominio tengan poco o ningún efecto en la capacidad de unión al dsDNA.

Las dos mutaciones causantes de RTT que hemos estudiado (R106W y R133C) se encuentran en la región estructurada del MBD, y sus efectos son diferentes debido a sus características químicas y ubicación en la proteína. R106W involucra la sustitución de una arginina por un residuo hidrofóbico más grande, mientras que R133C implica la sustitución de una arginina por un residuo polar más pequeño. Además, R106 está lejos de la interfaz de unión al DNA, no genera interacciones con él, pero sí genera interacciones intramoleculares con otros residuos de la proteína (concretamente cuatro puentes de hidrógeno con M94, D156, T158 y V159) mientras que R133 se encuentra en la interfaz de unión al DNA, interaccionando con él mediante enlaces de hidrógeno/van del Waals, aunque genera menos interacciones intramoleculares (solo un puente de

hidrógeno con E137, **Figura 5.2**). Estas diferencias ya sugieren *a priori* que R106W podría causar una distorsión estructural significativa mientras que R133C tendría un impacto estructural menor y está en consonancia con nuestros datos experimentales de estructura y estabilidad térmica.

Los resultados presentados muestran que el impacto de las sustituciones R106W y R133C en la estabilidad estructural y la capacidad de unión al dsDNA depende del contexto molecular, es decir, si están presentes o no los dominios desestructurados. Las sustituciones R106W y R133C aumentan la estabilidad térmica de MBD, pero disminuyen la estabilidad térmica de NTD-MBD-ID; y los efectos sobre la unión a los diferentes tipos de dsDNA también son diferentes al utilizar las construcciones con estos dominios.

Como se esperaba, se observaron los mayores cambios en el perfil termodinámico de unión causados por las mutaciones asociadas al síndrome de Rett en el sitio de alta afinidad de NTD-MBD-ID, que es el sitio ubicado en el MBD. El principal efecto de R106W es la reducción en la afinidad del sitio de alta afinidad para todos los tipos de dsDNA (CpG-dsDNA, mCpG-dsDNA y hmCpG-dsDNA), y el principal efecto de R133C es la reducción en la afinidad del sitio de alta afinidad específicamente para hmCpG-DNA. Esto concuerda con la información estructural: 5hmC se coordina con R133 a través de dos enlaces de hidrógeno, que están ausentes para 5mC (**Figura 5.2**). Por lo tanto, la sustitución de arginina por cisteína tendría un impacto mayor en 5hmC en comparación con 5mC. Estos resultados sugieren que R106W, una sustitución de un residuo polar por un residuo hidrofóbico dentro del núcleo de MBD lejos del sitio de unión al DNA, afecta la arquitectura global de MBD y la interacción con todos los tipos de dsDNA, mientras que R133C, una sustitución de un residuo polar por otro residuo polar dentro del sitio de unión al DNA, afecta específicamente la interacción con dsDNA que lleva una modificación particular de citosina (5hmC). Esto también concuerda con una menor estabilidad de NTD-MBD-ID R106W en comparación con la mutación R133C.

Por lo tanto, la mutación R106W tendría un efecto perjudicial global, independientemente del nivel de metilación del DNA, la relación metilación/hidroximetilación, o la etapa de desarrollo celular, mientras que la mutación R133C tendría un impacto dependiente de la presencia de 5hmC, por lo que el efecto dependería de la etapa de desarrollo celular/tejido/organismo, ya que, por ejemplo, los niveles de 5hmC se ven elevados durante el desarrollo neuronal a medida que las neuronas maduran a partir de células progenitoras. Esto podría contribuir a explicar las diferencias en la gravedad fenotípica y el tiempo de inicio de la enfermedad relacionado con diferentes mutaciones del síndrome de Rett. Desde un punto de vista traslacional, este conocimiento sobre

el efecto de las mutaciones asociadas al Rett en la unión al DNA podría abrir nuevas vías terapéuticas más racionales y eficaces. En el caso de pacientes con la mutación R133C, donde hay una disminución específica en la afinidad por el hmCpG-DNA, un enfoque estratégico que apunte temporalmente al sistema TET podría llevar a una regulación de la unión de MeCP2 a las islas CpG en el cerebro al reducir la relación 5hmC/5mC; sin embargo, el efecto global de este enfoque debe evaluarse, debido al papel biológico del hmCpG-DNA. Por otro lado, los pacientes con la mutación R106W, donde la pérdida en la estructura proteica conduce a una interacción deficiente con el DNA de manera global (independientemente de la modificación epigenética), se beneficiarían más del desarrollo de chaperonas moleculares que recuperen la estructura funcional de MeCP2 y, por lo tanto, restauren su capacidad de unirse al DNA.

Considerando el impacto de las mutaciones R106W y R133C en la afinidad de interacción del MBD con las diferentes histonas, que causa una reducción significativa de la afinidad inducida por R106W por las histonas H2A y H2B, en comparación con un efecto insignificante de R133C, es razonable concluir que el sitio de unión para estas histonas en el MBD se encuentra cerca de la arginina 106, detrás del sitio de unión al DNA. Teniendo en cuenta el efecto casi nulo de las mutaciones causantes de RTT con H3 y sus variantes trimetiladas, se puede concluir que estos residuos (R106 y R133) no están

implicados en el reconocimiento directo de la trimetilación, de forma que el pequeño efecto observado puede ser derivado de las consecuencias estructurales de las mutaciones y no en la interrupción de los contactos generados con la histona H3 (**Figura 5.3**). Las limitaciones del estudio son, una vez más, que la mayoría de ensayos se han realizado con el constructo MBD, que no es representativo de la totalidad de la proteína (que tiene otro sitio de unión para histonas en los dominios distales), aunque es esperable que el efecto deletéreo de estas mutaciones se concentre en el sitio de unión en el MBD, pero no es descartable que haya efectos alostéricos en otras partes de la proteína.

El efecto observado de estas dos mutaciones (cambios en la estabilidad estructural, efectos específicos de capacidad de lectura de la metilación del DNA y en la unión a histonas) se correlaciona con su puntuación o evaluación clínica de la gravedad. R133C se asocia con una puntuación fenotípica más leve que R106W, y tiene un menor efecto deletéreo a todos los niveles que hemos estudiado: sobre la estructura y la estabilidad de la proteína, sobre la afinidad al dsDNA y las histonas.

5.5 Desarrollo de fármacos para RTT

MeCP2 es una proteína que desempeña un papel crucial en la regulación de la expresión génica y en el desarrollo del sistema nervioso. Dado que MeCP2 está involucrado en múltiples cascadas de señalización y procesos celulares, su disfunción conduce a una amplia gama de alteraciones en el organismo.

La complejidad de estas alteraciones hace que el tratamiento dirigido a una sola ruta afectada, aunque pueda aliviar algunos síntomas, no sea suficiente para revertir completamente el fenotipo de RTT. Dado que la terapia génica para MeCP2 todavía no es una opción viable (aunque está en desarrollo), la búsqueda de chaperonas farmacológicas que sean capaces de corregir el efecto deletéreo en la estructura y recuperar la función de la proteína al inicio de las vías proporciona un enfoque más integral para el tratamiento de RTT. Mientras

tanto, el tratamiento actual para RTT se enfoca en el manejo de los síntomas y la mejora de la calidad de vida de los pacientes.

Aunque el uso del TSA ha sido ampliamente probado para identificar compuestos que interactúen con una proteína diana, la estrategia novedosa de llevar a cabo el cribado con el complejo dsDNA-MeCP2 preformado ha resultado ser una buena estrategia. Dado que MeCP2 tiene numerosos *partners* biológicos, acotar la porción de la proteína utilizando una proteína truncada con los dominios representativos para la unión (NTD-MBD-ID) y utilizar el complejo con dsDNA como diana, en lugar de la proteína aislada, permite dirigir la selección de compuestos hacia funciones específicas. Además, también ha permitido identificar a posteriori inhibidores de la proteína. Esta diferenciación entre activadores e inhibidores no puede hacerse en el caso en el que lo que se identifica son compuestos que se unen al estado nativo de la proteína, ya que ese método no discrimina por efecto biológico y necesita de una comprobación posterior del efecto sobre la función de la proteína.

Un aspecto relevante a considerar en el estudio es cómo afectan los compuestos a la interacción de MeCP2 con cada variante del dsDNA, especialmente en el caso de la mutación R133C, donde se debe asegurar que el compuesto seleccionado estabilice específicamente la interacción de MeCP2 con el 5hm-CpGdsDNA. Por otro lado, para la mutación R106W, el efecto estabilizador debe abarcar todas las variantes de dsDNA. También sería interesante investigar el efecto sobre la unión a histonas, aunque esto no se tuvo en cuenta al diseñar el cribado y la selección de compuestos.

Un punto interesante es que los datos de estabilización del complejo MeCP2-dsDNA, tanto con la proteína WT como con los mutantes, correlaciona con los datos de unión al promotor de BDNF en el modelo celular, aunque hay ciertas discrepancias. El compuesto DOA15 es el que induce un mayor efecto estabilizador *in vitro*, con mucha diferencia con todas las variantes de MeCP2 utilizadas, y, en el caso de los estudios de ChIP, genera un gran aumento de unión a todos los promotores estudiados de forma inespecífica. El compuesto RAO5 genera un efecto claro con MeCP2 WT, aunque en el caso de los

mutantes no se observa tan bien el efecto en unión a los promotores. Esto no correlaciona con el efecto que hemos observado sobre la expresión de estos genes.

El proyecto ha enfrentado desafíos en el escalado a modelos celulares y en la selección de ensayos funcionales para estudiar el posible efecto terapéutico de los compuestos. Dada la gran variedad y abundancia de sitios de unión de MeCP2 en la cromatina y la cantidad de genes regulados por esta proteína, los enfoques que se han usado en este trabajo son reduccionistas, con el objetivo de establecer varios niveles de selección de compuestos para encontrar los más prometedores. Para caracterizar apropiadamente el efecto de las mutaciones causantes de Rett y el efecto del tratamiento con los compuestos DOA y RAO hace falta un enfoque diferente, incluyendo varias "ómicas" (la transcriptómica, concretamente) que pueden aportar un enfoque más global al estudio de las vías implicadas, aunque esto no fue parte de los objetivos de esta tesis doctoral.

A pesar de las limitaciones en las conclusiones debido a los resultados limitados, se ha comprobado que la hipótesis que motivó el diseño del cribado experimental (utilizar el complejo MeCP2:dsDNA como diana en vez de la proteína sola para dirigir el efecto de los compuestos seleccionados) es correcta, y se han obtenido al menos dos compuestos que podrían servir como base para el desarrollo de fármacos capaces no solo de estabilizar el complejo MeCP2:dsDNA a nivel celular, sino también de generar una respuesta a nivel de regulación de la transcripción. Además, se han establecido metodologías más sencillas que la transcriptómica para llevar a cabo las primeras etapas de selección de compuestos, como la estabilización del complejo con MeCP2 tanto en su forma WT como mutante, y el estudio del efecto del tratamiento con compuestos sobre la expresión de BDNF y IGF2. Específicamente, el compuesto RAO5 ha demostrado un perfil muy interesante y que merece ser desarrollado, ya que ha normalizado la unión de MeCP2 a los promotores diana seleccionados y ha generado una normalización de la expresión de estos genes mediada por MeCP2.

El modelo celular linfoblastoide a partir de células de pacientes RTT podría haber permitido el estudio de los compuestos si se hubieran obtenido líneas inmortalizadas con diferentes mutaciones. Sin embargo, al no expresar de forma basal los genes diana implicados en la patología de RTT, es necesario desarrollar y caracterizar modelos más apropiados para futuras etapas de selección de compuestos. Aunque algunos compuestos seleccionados inicialmente en el cribado no mostraron el efecto biológico esperado, esto podría ser debido a problemas de internalización celular, degradación o localización en el núcleo, donde deben actuar.

Un concepto clave que hay que tener en cuenta al desarrollar este tipo de fármacos es la ventana terapéutica, es decir, la diferencia entre las concentraciones que generan un efecto biológico terapéutico beneficioso y las concentraciones que generan un efecto tóxico perjudicial. Aunque es de esperar la aparición de cierta toxicidad y efectos secundarios inespecíficos con cualquier tratamiento farmacológico, considerando que intentamos modular la maduración del sistema nervioso, habría que acotar muy estrictamente las dosis aplicadas para evitar otros efectos no deseados, y el aumento de esta ventana terapéutica debe ser uno de los puntos más importantes a la hora de optimizar y desarrollar fármacos a partir de los compuestos que hemos identificado en este estudio.

Durante el proyecto se intentó llevar a cabo estudios sobre el proceso de diferenciación neuronal utilizando precursores neuronales como punto de partida. Sin embargo, la falta de caracterización previa del modelo celular mutante impidió obtener resultados concluyentes en este sentido.

Desde un punto de vista más global, viendo en retrospectiva todos los resultados obtenidos del estudio de los compuestos seleccionados como estabilizadores del complejo MBD:dsDNA (RAOs) o del complejo NTD-MBD-ID:dsDNA (DOAs), podemos decir que aunque se pueda pensar que el diseño experimental que ha llevado a la selección de los compuestos DOA es más apropiado, por la gran influencia de los dominios desordenados en la formación del complejo diana, el cribado utilizando el MBD ha demostrado ser un buen enfoque

igualmente. Compuestos seleccionados en cada uno de los cribados (RAO5 y DOA15) han generado resultados alentadores que pueden proporcionar un *scaffold* interesante y prometedor para desarrollar fármacos frente a RTT.

5.6 Identificación de fármacos para PDAC

La inhibición de MeCP2 puede ser interesante, terapéuticamente hablando, para diversas patologías, tal y como se ha comentado antes, incluyendo el síndrome de duplicación de MECP2, diversos tipos de cáncer o problemas de naturaleza neurológica. Teniendo en cuenta que MeCP2 interviene en el desarrollo y maduración neuronal en la infancia, la inhibición transitoria de su actividad en pacientes adultos no debería suponer un problema grave, aunque teniendo en cuenta la multifuncionalidad de MeCP2 hay que tener en cuenta posibles efectos secundarios. La motivación para centrarnos en PDAC partió de la necesidad social de búsqueda de herramientas para afrontar el tratamiento de esta enfermedad, el poco estudio previo realizado en cuanto a MeCP2 como diana relacionada con PDAC, y la presencia de patrones de hipermetilación aberrantes en PDAC, lo que puede permitir abrir nuevas vías que no se han explorado aún, y la posibilidad de establecer diferentes colaboraciones con expertos en este tipo de patologías que han permitido la realización de los ensayos presentados en esta tesis y la planificación de las siguientes etapas a explorar.

El uso de los estudios de citotoxicidad para la selección de compuestos ADO puede dar pistas sobre el efecto diferencial que tienen los compuestos sobre células tumorales y no tumorales, sin embargo, los modelos celulares tumorales utilizados no representan la heterogeneidad celular presente en los modelos de PDAC reales.

Además, tal y como ocurre en el caso de RTT, la amplia distribución y el gran número de genes regulados por MeCP2 dirigen el estudio hacia el uso de “ómicas” en siguientes etapas del proyecto. En primer lugar, habría que tener en cuenta el estudio metilómico de líneas celulares y tejidos tumorales de pacientes PDAC. Aunque ya se ha descrito ampliamente el desajuste de

metilación (hipermetilación en promotores e hipometilación en cuerpos de genes) que hay en las líneas celulares que hemos utilizado (PANC-1, MiaPaCa-2), nuestro estudio se beneficiaría mucho de la caracterización concreta del metiloma de estas líneas, para saber qué genes están desregulados epigenéticamente y determinar así puntos y metodologías de control para el estudio de eficacia terapéutica de los compuestos, ya sea mediante estudios de transcriptómica o estudios de expresión de ciertos genes de manera más local.

El uso de estos compuestos inhibidores no pretende en ningún momento ser ejercido como monoterapia, que no es muy prometedora en tumores como PDAC. En vez de eso, lo que pretendemos es modificar la programación metabólica de las células tumorales para disminuir ciertas características tumorales, como pueden ser la capacidad de invasión y migración, el grado de potencialidad, o la resistencia a quimioterápicos o a la respuesta inmune, de forma que el estudio de citotoxicidad que hemos planteado debería complementarse con estudios de sinergia con otros agentes quimioterápicos y estudios de reprogramación metabólica.

Esta parte del proyecto ha abierto una vía interesante en el desarrollo de fármacos, que solo acaba de empezar a explorarse. De hecho, los compuestos ADOs seleccionados provienen únicamente de la quimioteca *Prestwick*, y ya hay datos de compuestos con efecto similar procedente de la quimioteca *HitFinder*. La integración de los datos obtenidos hasta la fecha en términos de clusterización, agrupamiento y clasificación de compuestos por su naturaleza química, características de unión a MeCP2 (que se puede llevar a cabo de manera sencilla mediante herramientas bioinformáticas de *docking* o dinámica molecular) y el efecto biológico puede permitir hacer una selección más dirigida y efectiva de compuestos que ejercen un efecto inhibitorio de la unión en el ensayo de cribado por TSA, y buscar características comunes que puedan llevar a un desarrollo racional de los derivados de estos compuestos.

Finalmente, al igual que con los compuestos estabilizadores del complejo MeCP2:dsDNA, es crucial estudiar en mayor profundidad el efecto de los compuestos inhibidores más prometedores (ADO6 y ADO7) para comprender cómo afectan a la regulación génica en el contexto de la inhibición de MeCP2. La inhibición de MeCP2 podría tener un impacto significativo en la regulación de la expresión génica, ya que esta proteína juega un papel crucial en la modulación de la actividad génica mediante la unión al DNA metilado. Al inhibir MeCP2, podrían producirse cambios en la actividad transcripcional de los genes que normalmente regula, lo que a su vez podría afectar diversos procesos celulares y fisiológicos. Para determinar los efectos a nivel de regulación génica que puedan surgir debido a la inhibición de MeCP2, se necesitarían estudios detallados y exhaustivos utilizando técnicas como análisis de expresión génica, secuenciación de RNA, y otros métodos moleculares y celulares. Estos estudios permitirían identificar los genes específicos que se ven afectados por la inhibición de MeCP2 y cómo estos cambios pueden influir en diversas funciones celulares y patologías.

Es importante tener en cuenta que, si bien la inhibición de MeCP2 podría ser una estrategia terapéutica potencial para ciertas condiciones médicas, también es necesario tener precaución, ya que esta proteína tiene funciones importantes en el desarrollo y funcionamiento normal del sistema nervioso, entre otros. Por lo tanto, cualquier enfoque terapéutico que implique la inhibición de MeCP2 debe ser cuidadosamente evaluado para garantizar que los efectos sobre la regulación génica sean beneficiosos y no perjudiciales para la salud, o al menos el perjuicio sea transitorio y menor que el posible beneficio.

6. CONCLUSIONES

6.1 Contribución de los diferentes dominios en la estructura y estabilidad de la proteína

MeCP2 es una proteína intrínsecamente desestructurada con una T_m (temperatura de desplegamiento) relativamente baja. El dominio MBD tiene una estabilidad marginal, pero ésta se incrementa cuando los dominios flanqueantes NTD e ID están presentes. El dominio ID muestra el mayor efecto estabilizante sobre el dominio MBD.

Los dominios NTD e ID parecen desempeñar un papel estructural y funcional importante en MeCP2, lo que contribuye a su naturaleza multifuncional y al impacto de las mutaciones ubicadas dentro de las regiones desordenadas.

Factores intrínsecos, como la presencia de dominios flanqueantes y la dinámica y movilidad de las regiones desordenadas, así como factores extrínsecos como la concentración iónica y las moléculas de agua, modulan fuertemente las propiedades estructurales globales y las capacidades funcionales de MeCP2.

MeCP2 es una proteína intrínsecamente desordenada multidominio en la que el dominio MBD, responsable principal del reconocimiento del DNA, se ve sustancialmente influenciado por sus dominios desordenados flanqueantes.

La construcción NTD-MBD-ID muestra diferencias funcionales y características estructurales diferenciales en comparación con el dominio MBD aislado. Presenta un paisaje conformacional con mayor complejidad, donde los estados parcialmente desplegados pueden ser funcionalmente relevantes, una menor cooperatividad de despliegue debido a la coexistencia de estados

intermedios parcialmente desplegados y una estabilidad relevante menor que el MBD, pero una mayor estabilidad global a temperaturas moderadas.

Desde el punto de vista estructural y funcional, la construcción NTD-MBD-ID representa un modelo mínimo estructural y funcional respecto a la interacción con dsDNA.

6.2 Interacción con dsDNA sin metilar, metilado e hidroximetilado. Contribución de los diferentes dominios

MeCP2 interactúa con dsDNA metilado, hidroximetilado y no metilado, mostrando afinidades similares con una ligera preferencia por el dsDNA metilado.

La interacción con el DNA contribuye significativamente a estabilizar la estructura de MeCP2, con una mayor estabilización observada correspondiente a la unión con el dsDNA metilado, seguida del hidroximetilado y finalmente el no metilado.

MeCP2 presenta dos sitios de unión independientes (MBD e ID/TRD) que interactúan con dos moléculas diferentes de dsDNA con afinidades muy diferentes, en el rango subnanomolar y en el rango submicromolar, respectivamente.

La presencia del sitio de unión localizado en los dominios ID/TRD potencia considerablemente la afinidad (>400 veces) del sitio de unión localizado en el MBD, mientras que el dominio CTD parece no tener un papel relevante en la interacción MeCP2-dsDNA.

Los perfiles termodinámicos del dominio MBD al interactuar con dsDNA son diferentes de los correspondientes a la construcción NTD-MBD-ID y a la

proteína completa MeCP2 en su interacción con dsDNA. Aunque MeCP2 es una proteína desestructurada, los dominios no estructurados contribuyen a su estabilidad estructural y a la interacción con el dsDNA.

La interacción de MeCP2 con dsDNA hidroximetilado es diferente en comparación con el dsDNA metilado o no metilado. Esto podría reflejarse en una conformación diferente de MeCP2, lo que afectaría la configuración arquitectónica de la cromatina y sus interacciones con elementos de maquinaria de transcripción.

Las moléculas de agua atrapadas en la interfaz entre MeCP2 y el dsDNA desempeñan un papel importante en la interacción.

6.3 Interacción con las cuatro histonas canónicas H2A, H2B, H3 Y H4. Efecto de la trimetilación en lisina en diferentes posiciones de H3.

MeCP2 se une directamente y con alta afinidad a las cuatro histonas que componen el nucleosoma (H2A, H2B, H3 y H4) con un sitio de unión en el dominio MBD y otro sitio de unión adicional en otro dominio (posiblemente, NID/TRD). Este hecho es de gran importancia debido a la abundancia y relevancia estructural/funcional de estas proteínas, así como su papel crucial en la regulación epigenética, expandiendo así su interactoma conocido.

La trimetilación de las lisinas en diferentes posiciones de H3 modula la unión de esta histona a MeCP2. Esto implica que MeCP2 lee marcas epigenéticas a nivel de modificación postraduccional de histonas, además de la metilación del DNA.

Concretamente, las marcas H3K27me3 y H3K36me3 disminuyen la afinidad de la histona por MeCP2.

Cuando MeCP2 está unido a la histona H3, mejora su capacidad de discriminación del estado de metilación del DNA, pero dejan de observarse dos sitios de unión por el mismo. Es posible que la interacción con histonas impida estéricamente la unión de dsDNA al segundo sitio.

6.4 Efectos de las mutaciones causantes de RTT R106W y R133C sobre la estructura y estabilidad de MeCP2, así como en la unión a dsDNA e histonas.

Las mutaciones asociadas al síndrome de Rett provocan alteraciones significativas en la estabilidad de la proteína MeCP2 y en el efecto estabilizante causado por el dsDNA.

Los efectos sobre la estabilidad de la proteína son completamente diferentes según la localización de la mutación y las interacciones intramoleculares afectadas. El entorno de la mutación es crucial e influye fuertemente en el impacto perjudicial potencial en la estabilidad y la funcionalidad de MeCP2, condicionando su capacidad para interactuar con dsDNA e histonas.

Los efectos de las mutaciones sobre la interacción con dsDNA son dependientes del contexto de la mutación. Mientras que R133C anula la interacción con dsDNA en el MBD, R106W ligeramente la mejora; sin embargo, en la construcción NTD-MBD-ID la presencia del segundo sitio de unión (ID/TRD) restaura la interacción en la variante R133C, mientras que reduce la afinidad en la variante R106W.

Las mutaciones pueden tener efectos perjudiciales en regiones lejanas a través de acoplamiento alostérico. El sitio de unión del dominio ID se ve bastante comprometido en términos de afinidad por las mutaciones en el dominio MBD, lo que revela que la estructura del MBD podría ser indispensable para la interacción ID:dsDNA. Así, la sustitución R106W en NTD-MBD-ID no sólo afecta al sitio de interacción del MBD, sino que su influencia se extiende al sitio

de interacción del ID, provocando una reducción considerable de la afinidad de unión.

Las mutaciones en el dominio MBD asociadas al síndrome de Rett pueden afectar la estructura y función de MeCP2 de diferentes maneras, distorsionando la estructura global o local, restringiendo las propiedades estructurales en regiones desordenadas, o dificultando la interacción con dsDNA en general o con tipos específicos de dsDNA modificado.

La mutación R106W, que se asocia con un fenotipo grave, tiene efectos perjudiciales globales, independientemente del nivel de metilación del DNA (y por lo tanto de la etapa de desarrollo celular), mientras que R133C, asociada a un fenotipo leve, tiene un impacto dependiente de la hidroximetilación del DNA (y por lo tanto de etapa de desarrollo celular/organismo), lo cual podría explicar las diferencias en la gravedad del fenotipo y el tiempo de inicio de la enfermedad asociadas con diferentes mutaciones de Rett.

Además, las mutaciones asociadas al síndrome de Rett en MeCP2 pueden afectar a la afinidad de esta proteína por las histonas. La mutación R106W disminuye la afinidad de la interacción del MBD con H2A y H2B y elimina completamente la interacción con H4, mientras que la mutación R133C no varía la afinidad por ninguna de las cuatro histonas canónicas de manera significativa.

Ninguna de las dos mutaciones que hemos estudiado afecta a la capacidad del MBD para reconocer la trimetilación en H3 en ninguna de las cuatro posiciones (K4, K9, K27, K36), con una variación muy pequeña de las afinidades de unión a las variantes metiladas en comparación con las no metiladas.

6.5 Identificación de fármacos utilizando el complejo MeCP2-dsDNA como diana terapéutica.

MeCP2 es una potencial diana farmacológica asociada directamente con el síndrome de Rett (causado por la actividad deficiente de MeCP2) y PDAC (donde puede haber un exceso de actividad de MeCP2 asociada a una hipermetilación del DNA), aunque ni en tumores PDAC ni en líneas celulares tumorales pancreáticas hay sobreexpresión de MeCP2.

Se han identificado compuestos estabilizantes del complejo MeCP2:dsDNA, denominados RAOs y DOAs, mediante un cribado de alto rendimiento basado en su efecto estabilizador frente a la desnaturalización térmica (*thermal shift assay*). Los RAOs, seleccionados utilizando el MBD como diana, y los DOAs, seleccionados utilizando la construcción NTD-MBD-ID como diana, son capaces de estabilizar el complejo MeCP2:dsDNA tanto con la variante WT como con las variantes mutantes R106W y R133C. Estos compuestos ofrecen una estrategia prometedora para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la disfunción de MeCP2, como el síndrome de Rett.

De entre los compuestos seleccionados, RAO5 mejora la unión de MeCP2 a los promotores de los genes diana en las líneas celulares linfoblastoides, aumentando su expresión, excepto en la línea que contiene una variante de MeCP2 truncada. En la línea de precursores neuronales, normaliza tanto la unión a promotores de genes diana como su expresión. Por otro lado, DOA15, que presenta los mejores valores de estabilización del complejo, aumenta la unión de MeCP2 a todos los promotores estudiados de forma más inespecífica.

Además, se han identificado compuestos inhibidores o desestabilizadores de la formación del complejo MeCP2:dsDNA, denominados ADOs. Su unión a MeCP2 ha podido ser medida mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC) con afinidades en el rango submicromolar, lo que sugiere un potencial para interferir con la interacción MeCP2:dsDNA y modular la actividad de

MeCP2. De entre ellos, algunos presentan citotoxicidad preferencial hacia células pancreáticas tumorales y menor en las no tumorales, observando que los compuestos ADO6 y ADO7 mantienen esta actividad en líneas celulares provenientes de tumores de pacientes.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, N., Hardt, T., Brero, A., Nowak, D., Rothbauer, U., Becker, A., Leonhardt, H., & Cardoso, M. C. (2007). MeCP2 interacts with HP1 and modulates its heterochromatin association during myogenic differentiation. *Nucleic Acids Research*, 35(16), 5402–5408. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm599>
- Albano, F., Anelli, L., Zagaria, A., Coccaro, N., Minervini, A., Rossi, A. R., & Specchia, G. (2011). Decreased TET2 gene expression during chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia Research*, 35(11), e220–e222. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.07.013>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American Psychiatric Association. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- Amir, R. E., Van den Veyver, I. B., Wan, M., Tran, C. Q., Francke, U., & Zoghbi, H. Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nature Genetics*, 23(2), 185–188. <https://doi.org/10.1038/13810>
- Amrutkar, M., & Gladhaug, I. (2017). Pancreatic Cancer Chemoresistance to Gemcitabine. *Cancers*, 9(12), 157. <https://doi.org/10.3390/cancers9110157>
- Andricovich, J., Perkill, S., Kai, Y., Casasanta, N., Peng, W., & Tzatsos, A. (2018). Loss of KDM6A Activates Super-Enhancers to Induce Gender-Specific Squamous-like Pancreatic Cancer and Confers Sensitivity to BET Inhibitors. *Cancer Cell*, 33(3), 512–526.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.02.003>
- Ariani, F., Hayek, G., Rondinella, D., Artuso, R., Mencarelli, M. A., Spanhol-Rosseto, A., Pollazzon, M., Buoni, S., Spiga, O., Ricciardi, S., Meloni, I., Longo, I., Mari, F., Broccoli, V., Zappella, M., & Renieri, A. (2008). FOXP1 Is Responsible for the Congenital Variant of Rett Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 83(1), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.05.015>
- Armstrong, D. D. (2002). Neuropathology of Rett syndrome. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 8(2), 72–76. <https://doi.org/10.1002/mrdd.10027>
- Armstrong, D., Dunn, J. K., Antalffy, B., & Trivedi, R. (1995). Selective Dendritic Alterations in the Cortex of Rett Syndrome. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 54(2), 195–201. <https://doi.org/10.1097/00005072-199503000-00006>
- Armstrong, J., Póo, P., Pineda, M., Aibar, E., Geán, E., Català, V., & Monrós, E. (2001). Classic rett syndrome in a boy as a result of somatic mosaicism for a mecp2 mutation. *Annals of Neurology*, 50(5), 692–692. <https://doi.org/10.1002/ana.1272>
- Ausió, J., Paz, A. M. de, & Esteller, M. (2014a). MeCP2: the long trip from a chromatin protein to neurological disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 20(9), 487–498. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.03.004>
- Ausió, J., Paz, A. M. de, & Esteller, M. (2014b). MeCP2: the long trip from a chromatin protein to neurological disorders. *Trends in Molecular Medicine*, 20(9), 487–498. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.03.004>

- Avvakumov, G. V., Walker, J. R., Xue, S., Li, Y., Duan, S., Bronner, C., Arrowsmith, C. H., & Dhe-Paganon, S. (2008). Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature*, *455*(7214), 822–825. <https://doi.org/10.1038/nature07273>
- Bagchi, S., Yuan, R., & Engleman, E. G. (2021). Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *16*(1), 223–249. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-042020-042741>
- Bastos, M., Abian, O., Johnson, C. M., Ferreira-da-Silva, F., Vega, S., Jimenez-Alesanco, A., Ortega-Alarcon, D., & Velazquez-Campoy, A. (2023). Isothermal titration calorimetry. *Nature Reviews Methods Primers*, *3*(1), 17. <https://doi.org/10.1038/s43586-023-00199-x>
- Basturk, O., Hong, S.-M., Wood, L. D., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Brosens, L. A. A., Fukushima, N., Goggins, M., Hruban, R. H., Kato, Y., Klimstra, D. S., Klöppel, G., Krasinskas, A., Longnecker, D. S., Matthaei, H., Offerhaus, G. J. A., Shimizu, M., Takaori, K., ... Furukawa, T. (2015). A Revised Classification System and Recommendations From the Baltimore Consensus Meeting for Neoplastic Precursor Lesions in the Pancreas. *American Journal of Surgical Pathology*, *39*(12), 1730–1741. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000533>
- Baymaz, H. I., Fournier, A., Laget, S., Ji, Z., Jansen, P. W. T. C., Smits, A. H., Ferry, L., Mensinga, A., Poser, I., Sharrocks, A., Defosse, P.-A., & Vermeulen, M. (2014). MBD5 and MBD6 interact with the human PR-DUB complex through their methyl-CpG-binding domain. *PROTEOMICS*, *14*(19), 2179–2189. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400013>
- Bebbington, A., Anderson, A., Ravine, D., Fyfe, S., Pineda, M., de Klerk, N., Ben-Zeev, B., Yatawara, N., Percy, A., Kaufmann, W. E., & Leonard, H. (2008). Investigating genotype-phenotype relationships in Rett syndrome using an international data set. *Neurology*, *70*(11), 868–875. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000304752.50773.ec>
- Becker, A., Allmann, L., Hofstätter, M., Casà, V., Weber, P., Lehmkuhl, A., Herce, H. D., & Cardoso, M. C. (2013). Direct Homo- and Hetero-Interactions of MeCP2 and MBD2. *PLoS ONE*, *8*(1), e53730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053730>
- Becker, H., Pfeifer, D., Ihorst, G., Pantic, M., Wehrle, J., Rüter, B. H., Bullinger, L., Hackanson, B., Germing, U., Kuendgen, A., Platzbecker, U., Döhner, K., Ganser, A., Hagemeijer, A., Wijermans, P. W., Döhner, H., Duyster, J., & Lübbert, M. (2020). Monosomal karyotype and chromosome 17p loss or TP53 mutations in decitabine-treated patients with acute myeloid leukemia. *Annals of Hematology*, *99*(7), 1551–1560. <https://doi.org/10.1007/s00277-020-04082-7>
- Bedogni, F., Rossi, R. L., Galli, F., Cobolli Gigli, C., Gandaglia, A., Kilstrup-Nielsen, C., & Landsberger, N. (2014). Rett syndrome and the urge of novel approaches to study MeCP2 functions and mechanisms of action. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *46*, 187–201. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.011>
- Benitz, S., Straub, T., Mahajan, U. M., Mutter, J., Czernik, S., Unruh, T., Wingerath, B., Deubler, S., Fahr, L., Cheng, T., Nahnsen, S., Bruns, P., Kong, B., Raulefs, S., Ceyhan, G. O., Mayerle, J., Steiger, K., Esposito, I., Kleff, J., ... Regel, I. (2019). Ring1b-dependent epigenetic remodelling is an essential prerequisite for pancreatic carcinogenesis. *Gut*, *68*(11), 2007–2018. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317208>
- Ben-Shachar, S., Chahrour, M., Thaller, C., Shaw, C. A., & Zoghbi, H. Y. (2009). Mouse models of MeCP2 disorders share gene expression changes in the cerebellum and hypothalamus. *Human Molecular Genetics*, *18*(13), 2431–2442. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp181>

- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S. L., & Lander, E. S. (2006). A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell*, *125*(2), 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>
- Bhutani, N., Burns, D. M., & Blau, H. M. (2011). DNA Demethylation Dynamics. *Cell*, *146*(6), 866–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.042>
- Bird, A. (2011). The Dinucleotide CG as a Genomic Signalling Module. *Journal of Molecular Biology*, *409*(1), 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.01.056>
- Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O. J., & Macleod, D. (1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell*, *40*(1), 91–99. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90312-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90312-5)
- Black, J. C., Van Rechem, C., & Whetstone, J. R. (2012). Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact. *Molecular Cell*, *48*(4), 491–507. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.006>
- Boeke, J., Ammerpohl, O., Kegel, S., Moehren, U., & Renkawitz, R. (2000). The Minimal Repression Domain of MBD2b Overlaps with the Methyl-CpG-binding Domain and Binds Directly to Sin3A. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(45), 34963–34967. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005929200>
- Breiling, A., & Lyko, F. (2015). Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics & Chromatin*, *8*(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13072-015-0016-6>
- Brink, M. C., Piebes, D. G. E., de Groote, M. L., Luijsterburg, M. S., Casas-Delucchi, C. S., van Driel, R., Rots, M. G., Cardoso, M. C., & Verschure, P. J. (2013). A Role for MeCP2 in Switching Gene Activity via Chromatin Unfolding and HP1 γ Displacement. *PLoS ONE*, *8*(7), e69347. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069347>
- Bryant, K. L., Mancias, J. D., Kimmelman, A. C., & Der, C. J. (2014). KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends in Biochemical Sciences*, *39*(2), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.004>
- Buck-Koehntop, B. A., & Defossez, P.-A. (2013). On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA. *Epigenetics*, *8*(2), 131–137. <https://doi.org/10.4161/epi.23632>
- Buschdorf, J. P., & Strötmann, W. H. (2004). A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein MeCP2: impact on Rett syndrome. *Journal of Molecular Medicine*, *82*(2), 135–143. <https://doi.org/10.1007/s00109-003-0497-9>
- Carter, J. C., Lanham, D. C., Pham, D., Bibat, G., Naidu, S., & Kaufmann, W. E. (2008). Selective Cerebral Volume Reduction in Rett Syndrome: A Multiple-Approach MR Imaging Study. *American Journal of Neuroradiology*, *29*(3), 436–441. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A0857>
- Castello, A., Fischer, B., Frese, C. K., Horos, R., Alleaume, A.-M., Foehr, S., Curk, T., Krijgsveld, J., & Hentze, M. W. (2016). Comprehensive Identification of RNA-Binding Domains in Human Cells. *Molecular Cell*, *63*(4), 696–710. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.029>
- Chahrouh, M., Jung, S. Y., Shaw, C., Zhou, X., Wong, S. T. C., Qin, J., & Zoghbi, H. Y. (2008). MeCP2, a Key Contributor to Neurological Disease, Activates and Represses Transcription. *Science*, *320*(5880), 1224–1229. <https://doi.org/10.1126/science.1153252>
- Chahrouh, M., & Zoghbi, H. Y. (2007). The Story of Rett Syndrome: From Clinic to Neurobiology. *Neuron*, *56*(3), 422–437. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.10.001>

- Charlet, J., Duymich, C. E., Lay, F. D., Mundbjerg, K., Dalsgaard Sørensen, K., Liang, G., & Jones, P. A. (2016). Bivalent Regions of Cytosine Methylation and H3K27 Acetylation Suggest an Active Role for DNA Methylation at Enhancers. *Molecular Cell*, *62*(3), 422–431. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.033>
- Cheng, T.-L., Chen, J., Wan, H., Tang, B., Tian, W., Liao, L., & Qiu, Z. (2017). Regulation of mRNA splicing by MeCP2 via epigenetic modifications in the brain. *Scientific Reports*, *7*(1), 42790. <https://doi.org/10.1038/srep42790>
- Cheng, T.-L., Wang, Z., Liao, Q., Zhu, Y., Zhou, W.-H., Xu, W., & Qiu, Z. (2014). MeCP2 Suppresses Nuclear MicroRNA Processing and Dendritic Growth by Regulating the DGCR8/Drosha Complex. *Developmental Cell*, *28*(5), 547–560. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.032>
- Chen, L., Chen, K., Lavery, L. A., Baker, S. A., Shaw, C. A., Li, W., & Zoghbi, H. Y. (2015). MeCP2 binds to non-CG methylated DNA as neurons mature, influencing transcription and the timing of onset for Rett syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(17), 5509–5514. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505909112>
- Chen, R. Z., Akbarian, S., Tudor, M., & Jaenisch, R. (2001). Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nature Genetics*, *27*(3), 327–331. <https://doi.org/10.1038/85906>
- Chong, P. A., Vernon, R. M., & Forman-Kay, J. D. (2018). RGG/RG Motif Regions in RNA Binding and Phase Separation. *Journal of Molecular Biology*, *430*(23), 4650–4665. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.014>
- Chou, W.-C., Chou, S.-C., Liu, C.-Y., Chen, C.-Y., Hou, H.-A., Kuo, Y.-Y., Lee, M.-C., Ko, B.-S., Tang, J.-L., Yao, M., Tsay, W., Wu, S.-J., Huang, S.-Y., Hsu, S.-C., Chen, Y.-C., Chang, Y.-C., Kuo, Y.-Y., Kuo, K.-T., Lee, F.-Y., ... Tien, H.-F. (2011). TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood*, *118*(14), 3803–3810. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-339747>
- Ciernikova, S., Earl, J., García Bermejo, M. L., Stevurkova, V., Carrato, A., & Smolkova, B. (2020). Epigenetic Landscape in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: On the Way to Overcoming Drug Resistance? *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(11), 4091. <https://doi.org/10.3390/ijms21114091>
- Claveria-Gimeno, R., Vega, S., Abian, O., & Velazquez-Campoy, A. (2019). *Tinkering with Binding Polynomials in Isothermal Titration Calorimetry* (pp. 185–213). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9179-2_14
- Cohen, S., Gabel, H. W., Hemberg, M., Hutchinson, A. N., Sadacca, L. A., Ebert, D. H., Harmin, D. A., Greenberg, R. S., Verdine, V. K., Zhou, Z., Wetsel, W. C., West, A. E., & Greenberg, M. E. (2011). Genome-Wide Activity-Dependent MeCP2 Phosphorylation Regulates Nervous System Development and Function. *Neuron*, *72*(1), 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.022>
- Conde-Giménez, M., Galano-Frutos, J. J., Galiana-Cameo, M., Mahía, A., Victor, B. L., Salillas, S., Velázquez-Campoy, A., Brito, R. M. M., Gálvez, J. A., Díaz-de-Villegas, M. D., & Sancho, J. (2022). Alchemical Design of Pharmacological Chaperones with Higher Affinity for Phenylalanine Hydroxylase. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(9), 4502. <https://doi.org/10.3390/ijms23094502>
- Constância, M., Pickard, B., Kelsey, G., & Reik, W. (1998). Imprinting Mechanisms. *Genome Research*, *8*(9), 881–900. <https://doi.org/10.1101/gr.8.9.881>

- Cronk, J. C., Derecki, N. C., Litvak, V., & Kipnis, J. (2016). Unexpected cellular players in Rett syndrome pathology. *Neurobiology of Disease*, *92*, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.05.005>
- del Gaudio, D., Fang, P., Scaglia, F., Ward, P. A., Craigen, W. J., Glaze, D. G., Neul, J. L., Patel, A., Lee, J. A., Irons, M., Berry, S. A., Pursley, A. A., Grebe, T. A., Freedenberg, D., Martin, R. A., Hsich, G. E., Khera, J. R., Friedman, N. R., Zoghbi, H. Y., ... Roa, B. B. (2006). Increased MECP2 gene copy number as the result of genomic duplication in neurodevelopmentally delayed males. *Genetics in Medicine*, *8*(12), 784–792. <https://doi.org/10.1097/01.gim.0000250502.28516.3c>
- De Vita, F., Ventriglia, J., Febbraro, A., Laterza, M. M., Fabozzi, A., Savastano, B., Petrillo, A., Diana, A., Giordano, G., Troiani, T., Conzo, G., Galizia, G., Ciardiello, F., & Oritura, M. (2016). NAB-paclitaxel and gemcitabine in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): from clinical trials to clinical practice. *BMC Cancer*, *16*(1), 709. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2671-9>
- Deyme, L., Barbolosi, D., & Gattacceca, F. (2019). Population pharmacokinetics of FOLFIRINOX: a review of studies and parameters. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *83*(1), 27–42. <https://doi.org/10.1007/s00280-018-3722-5>
- Dhasarathy, A., & Wade, P. A. (2008). The MBD protein family—Reading an epigenetic mark? *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *647*(1–2), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.07.007>
- Du, Q., Luu, P.-L., Storzaker, C., & Clark, S. J. (2015). Methyl-CpG-binding domain proteins: readers of the epigenome. *Epigenomics*, *7*(6), 1051–1073. <https://doi.org/10.2217/epi.15.39>
- Ebert, D. H., Gabel, H. W., Robinson, N. D., Kastan, N. R., Hu, L. S., Cohen, S., Navarro, A. J., Lyst, M. J., Ekiert, R., Bird, A. P., & Greenberg, M. E. (2013). Activity-dependent phosphorylation of MeCP2 threonine 308 regulates interaction with NCoR. *Nature*, *499*(7458), 341–345. <https://doi.org/10.1038/nature12348>
- Ego, T., Tanaka, Y., & Shimotohno, K. (2005). Interaction of HTLV-1 Tax and methyl-CpG-binding domain 2 positively regulates the gene expression from the hypermethylated LTR. *Oncogene*, *24*(11), 1914–1923. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208394>
- Ehrhart, F., Coort, S. L. M., Cirillo, E., Smeets, E., Evelo, C. T., & Curfs, L. M. G. (2016). Rett syndrome – biological pathways leading from MECP2 to disorder phenotypes. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *11*(1), 158. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0545-5>
- Ezeonwuka, C., & Rastegar, M. (2014). MeCP2-Related Diseases and Animal Models. *Diseases*, *2*(1), 45–70. <https://doi.org/10.3390/diseases2010045>
- Faghfuri, E., Faramarzi, M. A., Nikfar, S., & Abdollahi, M. (2015). Nivolumab and pembrolizumab as immune-modulating monoclonal antibodies targeting the PD-1 receptor to treat melanoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *15*(9), 981–993. <https://doi.org/10.1586/14737140.2015.1074862>
- Fehr, S., Bebbington, A., Ellaway, C., Rowe, P., Leonard, H., & Downs, J. (2011). Altered Attainment of Developmental Milestones Influences the Age of Diagnosis of Rett Syndrome. *Journal of Child Neurology*, *26*(8), 980–987. <https://doi.org/10.1177/0883073811401396>
- Fehr, S., Downs, J., Bebbington, A., & Leonard, H. (2010). Atypical presentations and specific genotypes are associated with a delay in diagnosis in females with Rett syndrome.

American Journal of Medical Genetics Part A, 152A(10), 2535–2542.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33640>

- Feng, M., Xiong, G., Cao, Z., Yang, G., Zheng, S., Song, X., You, L., Zheng, L., Zhang, T., & Zhao, Y. (2017). PD-1/PD-L1 and immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancer Letters*, 407, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.08.006>
- Filosa, S., Pecorelli, A., D'Esposito, M., Valacchi, G., & Hajek, J. (2015). Exploring the possible link between MeCP2 and oxidative stress in Rett syndrome. *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.019>
- Fong, Y. W., Cattoglio, C., & Tjian, R. (2013). The Intertwined Roles of Transcription and Repair Proteins. *Molecular Cell*, 52(3), 291–302. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.018>
- Fraga, M. F. (2003). The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties. *Nucleic Acids Research*, 31(6), 1765–1774. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg249>
- Frauer, C., Hoffmann, T., Bultmann, S., Casa, V., Cardoso, M. C., Antes, I., & Leonhardt, H. (2011). Recognition of 5-Hydroxymethylcytosine by the Uhrf1 SRA Domain. *PLoS ONE*, 6(6), e21306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021306>
- Freire, E. (1997). Thermodynamics of protein folding and molecular recognition. *Pure and Applied Chemistry*, 69(11), 2253–2262. <https://doi.org/10.1351/pac199769112253>
- Freire, E., Schön, A., & Velazquez-Campoy, A. (2009). *Chapter 5 Isothermal Titration Calorimetry* (pp. 127–155). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)04205-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)04205-5)
- Fuks, F. (2003). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 31(9), 2305–2312. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg332>
- Fuks, F., Hurd, P. J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A. P., & Kouzarides, T. (2003). The Methyl-CpG-binding Protein MeCP2 Links DNA Methylation to Histone Methylation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 4035–4040. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210256200>
- Gabel, H. W., Kinde, B., Stroud, H., Gilbert, C. S., Harmin, D. A., Kastan, N. R., Hemberg, M., Ebert, D. H., & Greenberg, M. E. (2015). Disruption of DNA-methylation-dependent long gene repression in Rett syndrome. *Nature*, 522(7554), 89–93. <https://doi.org/10.1038/nature14319>
- Gadalla, K. K. E., Bailey, M. E. S., & Cobb, S. R. (2011). MeCP2 and Rett syndrome: reversibility and potential avenues for therapy. *Biochemical Journal*, 439(1), 1–14. <https://doi.org/10.1042/BJ20110648>
- Georgel, P. T., Horowitz-Scherer, R. A., Adkins, N., Woodcock, C. L., Wade, P. A., & Hansen, J. C. (2003). Chromatin Compaction by Human MeCP2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 32181–32188. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305308200>
- Ghosh, R. P., Horowitz-Scherer, R. A., Nikitina, T., Gierasch, L. M., & Woodcock, C. L. (2008). Rett Syndrome-causing Mutations in Human MeCP2 Result in Diverse Structural Changes That Impact Folding and DNA Interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 283(29), 20523–20534. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803021200>
- Ghosh, R. P., Horowitz-Scherer, R. A., Nikitina, T., Shlyakhtenko, L. S., & Woodcock, C. L. (2010). MeCP2 Binds Cooperatively to Its Substrate and Competes with Histone H1 for Chromatin Binding Sites. *Molecular and Cellular Biology*, 30(19), 4656–4670. <https://doi.org/10.1128/MCB.00379-10>

- Ghosh, R. P., Nikitina, T., Horowitz-Scherer, R. A., Gierasch, L. M., Uversky, V. N., Hite, K., Hansen, J. C., & Woodcock, C. L. (2010). Unique Physical Properties and Interactions of the Domains of Methylated DNA Binding Protein 2. *Biochemistry*, *49*(20), 4395–4410. <https://doi.org/10.1021/bi9019753>
- Globisch, D., Münzel, M., Müller, M., Michalakis, S., Wagner, M., Koch, S., Brückl, T., Biel, M., & Carell, T. (2010). Tissue Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine and Search for Active Demethylation Intermediates. *PLoS ONE*, *5*(12), e15367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015367>
- Goffin, D., Allen, M., Zhang, L., Amorim, M., Wang, I.-T. J., Reyes, A.-R. S., Mercado-Berton, A., Ong, C., Cohen, S., Hu, L., Blendy, J. A., Carlson, G. C., Siegel, S. J., Greenberg, M. E., & Zhou, Z. (2012). Rett syndrome mutation MeCP2 T158A disrupts DNA binding, protein stability and ERP responses. *Nature Neuroscience*, *15*(2), 274–283. <https://doi.org/10.1038/nn.2997>
- Gogliotti, R. G., & Niswender, C. M. (2019). A Coordinated Attack: Rett Syndrome Therapeutic Development. *Trends in Pharmacological Sciences*, *40*(4), 233–236. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.02.007>
- Golan, T., Atias, D., Barshack, I., Avivi, C., Goldstein, R. S., & Berger, R. (2014). Ascites-derived pancreatic ductal adenocarcinoma primary cell cultures as a platform for personalised medicine. *British Journal of Cancer*, *110*(9), 2269–2276. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.123>
- Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*, *128*(4), 635–638. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.006>
- Goldberg, R. N., Kishore, N., & Lennen, R. M. (2002). Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, *31*(2), 231–370. <https://doi.org/10.1063/1.1416902>
- Gold, W. A., & Christodoulou, J. (2015). The Utility of Next-Generation Sequencing in Gene Discovery for Mutation-Negative Patients with Rett Syndrome. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00266>
- Gomathi, M., Padmapriya, S., & Balachandar, V. (2020). Drug Studies on Rett Syndrome: From Bench to Bedside. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *50*(8), 2740–2764. <https://doi.org/10.1007/s10803-020-04381-y>
- Gómez, J., & Freire, E. (1995a). Thermodynamic Mapping of the Inhibitor Site of the Aspartic Protease Endothiapepsin. *Journal of Molecular Biology*, *252*(3), 337–350. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0501>
- Gómez, J., & Freire, E. (1995b). Thermodynamic Mapping of the Inhibitor Site of the Aspartic Protease Endothiapepsin. *Journal of Molecular Biology*, *252*(3), 337–350. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0501>
- Good, K. V., Vincent, J. B., & Ausió, J. (2021). MeCP2: The Genetic Driver of Rett Syndrome Epigenetics. *Frontiers in Genetics*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.620859>
- Greer, E. L., & Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics*, *13*(5), 343–357. <https://doi.org/10.1038/nrg3173>
- Guo, J. U., Su, Y., Shin, J. H., Shin, J., Li, H., Xie, B., Zhong, C., Hu, S., Le, T., Fan, G., Zhu, H., Chang, Q., Gao, Y., Ming, G., & Song, H. (2014). Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nature Neuroscience*, *17*(2), 215–222. <https://doi.org/10.1038/nn.3607>

- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G., & Song, H. (2011). Hydroxylation of 5-Methylcytosine by TET1 Promotes Active DNA Demethylation in the Adult Brain. *Cell*, *145*(3), 423–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.022>
- Guy, J., Cheval, H., Selfridge, J., & Bird, A. (2011). The Role of MeCP2 in the Brain. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *27*(1), 631–652. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154121>
- Guy, J., Gan, J., Selfridge, J., Cobb, S., & Bird, A. (2007). Reversal of Neurological Defects in a Mouse Model of Rett Syndrome. *Science*, *315*(5815), 1143–1147. <https://doi.org/10.1126/science.1138389>
- Gu, Z., Du, Y., Zhao, X., & Wang, C. (2021). Tumor microenvironment and metabolic remodeling in gemcitabine-based chemoresistance of pancreatic cancer. *Cancer Letters*, *521*, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.08.029>
- Hadzi, S., & Lah, J. (2022). The free energy folding penalty accompanying binding of intrinsically disordered α -helical motifs. *Protein Science*, *31*(7). <https://doi.org/10.1002/pro.4370>
- HAGBERG, B. (1985). Rett's Syndrome: Prevalence and Impact on Progressive Severe Mental Retardation in Girls. *Acta Paediatrica*, *74*(3), 405–408. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1985.tb10993.x>
- Hagberg, B. (2002). Clinical manifestations and stages of rett syndrome. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, *8*(2), 61–65. <https://doi.org/10.1002/mrdd.10020>
- Hagberg, B., Aicardi, J., Dias, K., & Ramos, O. (1983). A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: Report of 35 cases. *Annals of Neurology*, *14*(4), 471–479. <https://doi.org/10.1002/ana.410140412>
- Hahn, M. A., Qiu, R., Wu, X., Li, A. X., Zhang, H., Wang, J., Jui, J., Jin, S.-G., Jiang, Y., Pfeifer, G. P., & Lu, Q. (2013). Dynamics of 5-Hydroxymethylcytosine and Chromatin Marks in Mammalian Neurogenesis. *Cell Reports*, *3*(2), 291–300. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.011>
- Hansen, J. C., Ghosh, R. P., & Woodcock, C. L. (2010). Binding of the Rett syndrome protein, MeCP2, to methylated and unmethylated DNA and chromatin. *IUBMB Life*, *62*(10), 732–738. <https://doi.org/10.1002/iub.386>
- Harris, E. (2023). Trofinetide Receives FDA Approval as First Drug for Rett Syndrome. *JAMA*, *329*(14), 1142. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.4003>
- He, C., Sidoli, S., Warneford-Thomson, R., Tatomer, D. C., Wilusz, J. E., Garcia, B. A., & Bonasio, R. (2016). High-Resolution Mapping of RNA-Binding Regions in the Nuclear Proteome of Embryonic Stem Cells. *Molecular Cell*, *64*(2), 416–430. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.034>
- Hendrich, B., & Bird, A. (1998). Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl-CpG Binding Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(11), 6538–6547. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.11.6538>
- Hermann, A., Goyal, R., & Jeltsch, A. (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase Methylates DNA Processively with High Preference for Hemimethylated Target Sites. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(46), 48350–48359. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403427200>
- Heyn, H., & Esteller, M. (2015). An Adenine Code for DNA: A Second Life for N6-Methyladenine. *Cell*, *161*(4), 710–713. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.021>

- Hite, K. C., Adams, V. H., & Hansen, J. C. (2009). Recent advances in MeCP2 structure and function This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 29th Annual International Asilomar Chromatin and Chromosomes Conference, and has undergone the Journal's usual peer review process. *Biochemistry and Cell Biology*, 87(1), 219–227. <https://doi.org/10.1139/O08-115>
- Hite, K. C., Kalashnikova, A. A., & Hansen, J. C. (2012). Coil-to-helix transitions in intrinsically disordered methyl CpG binding protein 2 and its isolated domains. *Protein Science*, 21(4), 531–538. <https://doi.org/10.1002/pro.2037>
- Ho, K. L., McNae, I. W., Schmiedeberg, L., Klose, R. J., Bird, A. P., & Walkinshaw, M. D. (2008a). MeCP2 Binding to DNA Depends upon Hydration at Methyl-CpG. *Molecular Cell*, 29(4), 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.12.028>
- Ho, K. L., McNae, I. W., Schmiedeberg, L., Klose, R. J., Bird, A. P., & Walkinshaw, M. D. (2008b). MeCP2 Binding to DNA Depends upon Hydration at Methyl-CpG. *Molecular Cell*, 29(4), 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.12.028>
- Holliday, R., & Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science (New York, N.Y.)*, 187(4173), 226–232.
- Ho, W. J., Jaffee, E. M., & Zheng, L. (2020). The tumour microenvironment in pancreatic cancer — clinical challenges and opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(9), 527–540. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0363-5>
- Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., Kern, S. E., Klimstra, D. S., Klöppel, G., Longnecker, D. S., Lüttges, J., & Offerhaus, G. J. A. (2001). Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *The American Journal of Surgical Pathology*, 25(5), 579–586. <https://doi.org/10.1097/00000478-200105000-00003>
- Hudson, W. H., & Ortlund, E. A. (2014). The structure, function and evolution of proteins that bind DNA and RNA. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(11), 749–760. <https://doi.org/10.1038/nrm3884>
- Hu, Y., & Guo, M. (2020). Synthetic lethality strategies: Beyond BRCA1/2 mutations in pancreatic cancer. *Cancer Science*, 111(9), 3111–3121. <https://doi.org/10.1111/cas.14565>
- Hyun, K., Jeon, J., Park, K., & Kim, J. (2017). Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Experimental & Molecular Medicine*, 49(4), e324–e324. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.11>
- Ibrahim, A., Papin, C., Mohideen-Abdul, K., Le Gras, S., Stoll, I., Bronner, C., Dimitrov, S., Klaholz, B. P., & Hamiche, A. (2021). MeCP2 is a microsatellite binding protein that protects CA repeats from nucleosome invasion. *Science*, 372(6549). <https://doi.org/10.1126/science.abd5581>
- Illingworth, R. S., Gruenewald-Schneider, U., Webb, S., Kerr, A. R. W., James, K. D., Turner, D. J., Smith, C., Harrison, D. J., Andrews, R., & Bird, A. P. (2010). Orphan CpG Islands Identify Numerous Conserved Promoters in the Mammalian Genome. *PLoS Genetics*, 6(9), e1001134. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001134>
- Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C., & Zhang, Y. (2010). Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466(7310), 1129–1133. <https://doi.org/10.1038/nature09303>
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., He, C., & Zhang, Y. (2011). Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science*, 333(6047), 1300–1303. <https://doi.org/10.1126/science.1210597>

- Järvelin, A. I., Noerenberg, M., Davis, I., & Castello, A. (2016). The new (dis)order in RNA regulation. *Cell Communication and Signaling*, *14*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0132-3>
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the Histone Code. *Science*, *293*(5532), 1074–1080. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>
- Jones, P. L., Veenstra, G. J. C., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., & Wolffe, A. P. (1998a). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*, *19*(2), 187–191. <https://doi.org/10.1038/561>
- Jones, P. L., Veenstra, G. J. C., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., & Wolffe, A. P. (1998b). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*, *19*(2), 187–191. <https://doi.org/10.1038/561>
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., Hong, S.-M., Fu, B., Lin, M.-T., Calhoun, E. S., Kamiyama, M., Walter, K., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Hartigan, J., ... Kinzler, K. W. (2008). Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science*, *321*(5897), 1801–1806. <https://doi.org/10.1126/science.1164368>
- Kaufmann, W. E., Tierney, E., Rohde, C. A., Suarez-Pedraza, M. C., Clarke, M. A., Salorio, C. F., Bibat, G., Bukelis, I., Naram, D., Lanham, D. C., & Naidu, S. (2012). Social impairments in Rett syndrome: characteristics and relationship with clinical severity. *Journal of Intellectual Disability Research*, *56*(3), 233–247. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2011.01404.x>
- Kernohan, K. D., Vernimmen, D., Gloor, G. B., & Bérubé, N. G. (2014). Analysis of neonatal brain lacking ATRX or MeCP2 reveals changes in nucleosome density, CTCF binding and chromatin looping. *Nucleic Acids Research*, *42*(13), 8356–8368. <https://doi.org/10.1093/nar/gku564>
- Khare, T., Pai, S., Koncovicus, K., Pal, M., Kriukiene, E., Liutkeviciute, Z., Irimia, M., Jia, P., Ptak, C., Xia, M., Tice, R., Tochigi, M., Moréra, S., Nazarians, A., Belsham, D., Wong, A. H. C., Blencowe, B. J., Wang, S. C., Kapranov, P., ... Petronis, A. (2012). 5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(10), 1037–1043. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2372>
- Khrapunov, S., Warren, C., Cheng, H., Berko, E. R., Grealley, J. M., & Brenowitz, M. (2014). Unusual Characteristics of the DNA Binding Domain of Epigenetic Regulatory Protein MeCP2 Determine Its Binding Specificity. *Biochemistry*, *53*(21), 3379–3391. <https://doi.org/10.1021/bi500424z>
- Kinde, B., Gabel, H. W., Gilbert, C. S., Griffith, E. C., & Greenberg, M. E. (2015). Reading the unique DNA methylation landscape of the brain: Non-CpG methylation, hydroxymethylation, and MeCP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(22), 6800–6806. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411269112>
- Kinkley, S., Helmuth, J., Polansky, J. K., Dunkel, I., Gasparoni, G., Fröhler, S., Chen, W., Walter, J., Hamann, A., & Chung, H.-R. (2016). reChIP-seq reveals widespread bivalency of H3K4me3 and H3K27me3 in CD4+ memory T cells. *Nature Communications*, *7*(1), 12514. <https://doi.org/10.1038/ncomms12514>

- Kinney, S. M., Chin, H. G., Vaisvila, R., Bitinaite, J., Zheng, Y., Estève, P.-O., Feng, S., Stroud, H., Jacobsen, S. E., & Pradhan, S. (2011). Tissue-specific Distribution and Dynamic Changes of 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian Genomes. *Journal of Biological Chemistry*, 286(28), 24685–24693. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.217083>
- Klein, M. E., Lioy, D. T., Ma, L., Impey, S., Mandel, G., & Goodman, R. H. (2007). Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nature Neuroscience*, 10(12), 1513–1514. <https://doi.org/10.1038/nn2010>
- Klinker, H., Haas, C., Harrer, N., Becker, P. B., & Mueller-Planitz, F. (2014). Rapid Purification of Recombinant Histones. *PLoS ONE*, 9(8), e104029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104029>
- Klose, R. J., Sarraf, S. A., Schmiedeberg, L., McDermott, S. M., Stancheva, I., & Bird, A. P. (2005). DNA Binding Selectivity of MeCP2 Due to a Requirement for A/T Sequences Adjacent to Methyl-CpG. *Molecular Cell*, 19(5), 667–678. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.07.021>
- Kordes, M., Larsson, L., Engstrand, L., & Löhr, J.-M. (2021). Pancreatic cancer cachexia: three dimensions of a complex syndrome. *British Journal of Cancer*, 124(10), 1623–1636. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01301-4>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2009). The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain. *Science*, 324(5929), 929–930. <https://doi.org/10.1126/science.1169786>
- Krishnaraj, R., Ho, G., & Christodoulou, J. (2017). RettBASE: Rett syndrome database update. *Human Mutation*, 38(8), 922–931. <https://doi.org/10.1002/humu.23263>
- Kucukkal, T. G., Yang, Y., Uvarov, O., Cao, W., & Alexov, E. (2015). Impact of Rett Syndrome Mutations on MeCP2 MBD Stability. *Biochemistry*, 54(41), 6357–6368. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00790>
- Laget, S., Joulie, M., Le Masson, F., Sasai, N., Christians, E., Pradhan, S., Roberts, R. J., & Defossez, P.-A. (2010). The Human Proteins MBD5 and MBD6 Associate with Heterochromatin but They Do Not Bind Methylated DNA. *PLoS ONE*, 5(8), e11982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011982>
- Lamonica, J. M., Kwon, D. Y., Goffin, D., Fenik, P., Johnson, B. S., Cui, Y., Guo, H., Veasey, S., & Zhou, Z. (2017). Elevating expression of MeCP2 T158M rescues DNA binding and Rett syndrome-like phenotypes. *Journal of Clinical Investigation*, 127(5), 1889–1904. <https://doi.org/10.1172/JCI90967>
- Lebrun, N., Delépine, C., Selloum, M., Meziane, H., Nectoux, J., Herault, Y., & Bienvenu, T. (2021). HDAC inhibitor ameliorates behavioral deficits in Mecp2308/y mouse model of Rett syndrome. *Brain Research*, 1772, 147670. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2021.147670>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Lee, W., Kim, J., Yun, J.-M., Ohn, T., & Gong, Q. (2020). MeCP2 regulates gene expression through recognition of H3K27me3. *Nature Communications*, 11(1), 3140. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16907-0>

- Leonard, H., Cobb, S., & Downs, J. (2017). Clinical and biological progress over 50 years in Rett syndrome. *Nature Reviews Neurology*, *13*(1), 37–51. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.186>
- Lewis, J. D., Meehan, R. R., Henzel, W. J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., & Bird, A. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to Methylated DNA. *Cell*, *69*(6), 905–914. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90610-O](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90610-O)
- Liang, C., Shi, S., Meng, Q., Liang, D., Ji, S., Zhang, B., Qin, Y., Xu, J., Ni, Q., & Yu, X. (2017). Complex roles of the stroma in the intrinsic resistance to gemcitabine in pancreatic cancer: where we are and where we are going. *Experimental & Molecular Medicine*, *49*(12), e406–e406. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.255>
- Li, R., Dong, Q., Yuan, X., Zeng, X., Gao, Y., Chiao, C., Li, H., Zhao, X., Keles, S., Wang, Z., & Chang, Q. (2016). Misregulation of Alternative Splicing in a Mouse Model of Rett Syndrome. *PLOS Genetics*, *12*(6), e1006129. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006129>
- Lister, R., Mukamel, E. A., Nery, J. R., Urich, M., Puddifoot, C. A., Johnson, N. D., Lucero, J., Huang, Y., Dwork, A. J., Schultz, M. D., Yu, M., Tonti-Filippini, J., Heyn, H., Hu, S., Wu, J. C., Rao, A., Esteller, M., He, C., Haghghi, F. G., ... Ecker, J. R. (2013). Global Epigenomic Reconfiguration During Mammalian Brain Development. *Science*, *341*(6146). <https://doi.org/10.1126/science.1237905>
- Liutkevičiūtė, Z., Lukinavičius, G., Masevičius, V., Daujotytė, D., & Klimašauskas, S. (2009). Cytosine-5-methyltransferases add aldehydes to DNA. *Nature Chemical Biology*, *5*(6), 400–402. <https://doi.org/10.1038/nchembio.172>
- Li, W., & Liu, M. (2011). Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine in Different Human Tissues. *Journal of Nucleic Acids*, *2011*, 1–5. <https://doi.org/10.4061/2011/870726>
- Lombardi, L. M., Baker, S. A., & Zoghbi, H. Y. (2015). MECP2 disorders: from the clinic to mice and back. *Journal of Clinical Investigation*, *125*(8), 2914–2923. <https://doi.org/10.1172/JCI78167>
- Long, S. W., Ooi, J. Y. Y., Yau, P. M., & Jones, P. L. (2011). A brain-derived MeCP2 complex supports a role for MeCP2 in RNA processing. *Bioscience Reports*, *31*(5), 333–343. <https://doi.org/10.1042/BSR20100124>
- Lowery, M. A., Jordan, E. J., Basturk, O., Ptashkin, R. N., Zehir, A., Berger, M. F., Leach, T., Herbst, B., Askan, G., Maynard, H., Glassman, D., Covington, C., Schultz, N., Abou-Alfa, G. K., Harding, J. J., Klimstra, D. S., Hechtman, J. F., Hyman, D. M., Allen, P. J., ... O'Reilly, E. M. (2017). Real-Time Genomic Profiling of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Potential Actionability and Correlation with Clinical Phenotype. *Clinical Cancer Research*, *23*(20), 6094–6100. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0899>
- Lucariello, M., Vidal, E., Vidal, S., Saez, M., Roa, L., Huertas, D., Pineda, M., Dalfó, E., Dopazo, J., Jurado, P., Armstrong, J., & Esteller, M. (2016). Whole exome sequencing of Rett syndrome-like patients reveals the mutational diversity of the clinical phenotype. *Human Genetics*, *135*(12), 1343–1354. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1721-3>
- Lyst, M. J., & Bird, A. (2015). Rett syndrome: a complex disorder with simple roots. *Nature Reviews Genetics*, *16*(5), 261–275. <https://doi.org/10.1038/nrg3897>

- Macrae, T. A., Fothergill-Robinson, J., & Ramalho-Santos, M. (2023). Regulation, functions and transmission of bivalent chromatin during mammalian development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(1), 6–26. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00518-2>
- Maietta, I., Martínez-Pérez, A., Álvarez, R., De Lera, Á. R., González-Fernández, Á., & Simón-Vázquez, R. (2022). Synergistic Antitumoral Effect of Epigenetic Inhibitors and Gemcitabine in Pancreatic Cancer Cells. *Pharmaceuticals*, 15(7), 824. <https://doi.org/10.3390/ph15070824>
- Mari, F., Azimonti, S., Bertani, I., Bolognese, F., Colombo, E., Caselli, R., Scala, E., Longo, I., Grosso, S., Pescucci, C., Ariani, F., Hayek, G., Balestri, P., Bergo, A., Badaracco, G., Zappella, M., Broccoli, V., Renieri, A., Kilstrup-Nielsen, C., & Landsberger, N. (2005). CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Human Molecular Genetics*, 14(14), 1935–1946. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi198>
- Maron, R., Schechter, B., Nataraj, N. B., Ghosh, S., Romaniello, D., Marrocco, I., Noronha, A., Carvalho, S., Yarden, Y., & Sela, M. (2019). Inhibition of a pancreatic cancer model by cooperative pairs of clinically approved and experimental antibodies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 513(1), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.03.204>
- Martínez de Paz, A., Khajavi, L., Martin, H., Claveria-Gimeno, R., Tom Dieck, S., Cheema, M. S., Sanchez-Mut, J. V., Moksa, M. M., Carles, A., Brodie, N. I., Sheikh, T. I., Freeman, M. E., Petrotchenko, E. V., Borchers, C. H., Schuman, E. M., Zytynicki, M., Velazquez-Campoy, A., Abian, O., Hirst, M., ... Ausió, J. (2019). MeCP2-E1 isoform is a dynamically expressed, weakly DNA-bound protein with different protein and DNA interactions compared to MeCP2-E2. *Epigenetics & Chromatin*, 12(1), 63. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0298-1>
- Matsumura, S., Persson, L. M., Wong, L., & Wilson, A. C. (2010). The Latency-Associated Nuclear Antigen Interacts with MeCP2 and Nucleosomes through Separate Domains. *Journal of Virology*, 84(5), 2318–2330. <https://doi.org/10.1128/JVI.01097-09>
- Maunakea, A. K., Chepelev, I., Cui, K., & Zhao, K. (2013). Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Research*, 23(11), 1256–1269. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.110>
- Maxwell, S. S., Pelka, G. J., Tam, P. P., & El-Osta, A. (2013). Chromatin context and ncRNA highlight targets of MeCP2 in brain. *RNA Biology*, 10(11), 1741–1757. <https://doi.org/10.4161/rna.26921>
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., & Haaf, T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 403(6769), 501–502. <https://doi.org/10.1038/35000656>
- McGranahan, N., & Swanton, C. (2017). Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell*, 168(4), 613–628. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.018>
- Mellén, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2012). MeCP2 Binds to 5hmC Enriched within Active Genes and Accessible Chromatin in the Nervous System. *Cell*, 151(7), 1417–1430. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.022>
- Michaeli, Y., Shahal, T., Torchinsky, D., Grunwald, A., Hoch, R., & Ebenstein, Y. (2013). Optical detection of epigenetic marks: sensitive quantification and direct imaging of individual hydroxymethylcytosine bases. *Chemical Communications*, 49(77), 8599. <https://doi.org/10.1039/c3cc42543f>

- Michaels, A. D., Newhook, T. E., Adair, S. J., Morioka, S., Goudreau, B. J., Nagdas, S., Mullen, M. G., Persily, J. B., Bullock, T. N. J., Slingluff, C. L., Ravichandran, K. S., Parsons, J. T., & Bauer, T. W. (2018). CD47 Blockade as an Adjuvant Immunotherapy for Resectable Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*, 24(6), 1415–1425. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2283>
- Miltenberger-Miltenyi, G., & Laccone, F. (2003). Mutations and polymorphisms in the human methyl CpG-binding protein MECP2. *Human Mutation*, 22(2), 107–115. <https://doi.org/10.1002/humu.10243>
- Mnatzakanian, G. N., Lohi, H., Munteanu, I., Alfred, S. E., Yamada, T., MacLeod, P. J. M., Jones, J. R., Scherer, S. W., Schanen, N. C., Friez, M. J., Vincent, J. B., & Minassian, B. A. (2004). A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nature Genetics*, 36(4), 339–341. <https://doi.org/10.1038/ng1327>
- Monrós, E., Armstrong, J., Aibar, E., Poo, P., Canós, I., & Pineda, M. (2001). Rett syndrome in Spain: mutation analysis and clinical correlations. *Brain and Development*, 23, S251–S253. [https://doi.org/10.1016/S0387-7604\(01\)00374-6](https://doi.org/10.1016/S0387-7604(01)00374-6)
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Mortusewicz, O., Schermelleh, L., Walter, J., Cardoso, M. C., & Leonhardt, H. (2005). Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(25), 8905–8909. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501034102>
- Münzel, M., Globisch, D., & Carell, T. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine, the Sixth Base of the Genome. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(29), 6460–6468. <https://doi.org/10.1002/anie.201101547>
- Naidu, S., Bibat, G., Kratz, L., Kelley, R. I., Pevsner, J., Hoffman, E., Cuffari, C., Rohde, C., Blue, M. E., & Johnston, M. V. (2003). Clinical Variability in Rett Syndrome. *Journal of Child Neurology*, 18(10), 662–668. <https://doi.org/10.1177/08830738030180100801>
- Nan, X., Campoy, F. J., & Bird, A. (1997). MeCP2 Is a Transcriptional Repressor with Abundant Binding Sites in Genomic Chromatin. *Cell*, 88(4), 471–481. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81887-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81887-5)
- Nan, X., Meehan, R. R., & Bird, A. (1993). Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Research*, 21(21), 4886–4892. <https://doi.org/10.1093/nar/21.21.4886>
- Nan, X., Ng, H.-H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., & Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393(6683), 386–389. <https://doi.org/10.1038/30764>
- Nejati-Koshki, K., Roberts, C.-T., Babaei, G., & Rastegar, M. (2023). The Epigenetic Reader Methyl-CpG-Binding Protein 2 (MeCP2) Is an Emerging Oncogene in Cancer Biology. *Cancers*, 15(10), 2683. <https://doi.org/10.3390/cancers15102683>
- Neul, J. L., Fang, P., Barrish, J., Lane, J., Caeg, E. B., Smith, E. O., Zoghbi, H., Percy, A., & Glaze, D. G. (2008). Specific mutations in Methyl-CpG-Binding Protein 2 confer different severity in Rett syndrome. *Neurology*, 70(16), 1313–1321. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000291011.54508.aa>
- Neul, J. L., Lane, J. B., Lee, H.-S., Geerts, S., Barrish, J. O., Annese, F., Baggett, L. M., Barnes, K., Skinner, S. A., Motil, K. J., Glaze, D. G., Kaufmann, W. E., & Percy, A. K. (2014).

Developmental delay in Rett syndrome: data from the natural history study. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 6(1), 20. <https://doi.org/10.1186/1866-1955-6-20>

- Neul, J. L., Percy, A. K., Benke, T. A., Berry-Kravis, E. M., Glaze, D. G., Marsh, E. D., Lin, T., Stankovic, S., Bishop, K. M., & Youakim, J. M. (2023). Trofinetide for the treatment of Rett syndrome: a randomized phase 3 study. *Nature Medicine*, 29(6), 1468–1475. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02398-1>
- Neupane, M., Clark, A. P., Landini, S., Birkbak, N. J., Eklund, A. C., Lim, E., Culhane, A. C., Barry, W. T., Schumacher, S. E., Beroukhi, R., Szallasi, Z., Vidal, M., Hill, D. E., & Silver, D. P. (2016). MECP2 Is a Frequently Amplified Oncogene with a Novel Epigenetic Mechanism That Mimics the Role of Activated RAS in Malignancy. *Cancer Discovery*, 6(1), 45–58. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0341>
- Nikitina, T., Shi, X., Ghosh, R. P., Horowitz-Scherer, R. A., Hansen, J. C., & Woodcock, C. L. (2007). Multiple Modes of Interaction between the Methylated DNA Binding Protein MeCP2 and Chromatin. *Molecular and Cellular Biology*, 27(3), 864–877. <https://doi.org/10.1128/MCB.01593-06>
- Ohki, I., Shimotake, N., Fujita, N., Jee, J.-G., Ikegami, T., Nakao, M., & Shirakawa, M. (2001). Solution Structure of the Methyl-CpG Binding Domain of Human MBD1 in Complex with Methylated DNA. *Cell*, 105(4), 487–497. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00324-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00324-5)
- Orth, M., Metzger, P., Gerum, S., Mayerle, J., Schneider, G., Belka, C., Schnurr, M., & Lauber, K. (2019). Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. *Radiation Oncology*, 14(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1345-6>
- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W., & Walter, J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current Biology*, 10(8), 475–478. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00448-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00448-6)
- Panni, R. Z., Herndon, J. M., Zuo, C., Hegde, S., Hogg, G. D., Knolhoff, B. L., Breden, M. A., Li, X., Krisnawan, V. E., Khan, S. Q., Schwarz, J. K., Rogers, B. E., Fields, R. C., Hawkins, W. G., Gupta, V., & DeNardo, D. G. (2019). Agonism of CD11b reprograms innate immunity to sensitize pancreatic cancer to immunotherapies. *Science Translational Medicine*, 11(499). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau9240>
- Paroush, Z., Keshet, I., Yisraeli, J., & Cedar, H. (1990). Dynamics of demethylation and activation of the α -actin gene in myoblasts. *Cell*, 63(6), 1229–1237. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90418-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90418-E)
- Patil, S., Steuber, B., Kopp, W., Kari, V., Urbach, L., Wang, X., Küffer, S., Bohnenberger, H., Spyropoulou, D., Zhang, Z., Versemann, L., Bösherz, M. S., Brunner, M., Gaedcke, J., Ströbel, P., Zhang, J.-S., Neesse, A., Ellenrieder, V., Singh, S. K., ... Hessmann, E. (2020). EZH2 Regulates Pancreatic Cancer Subtype Identity and Tumor Progression via Transcriptional Repression of *GATA6*. *Cancer Research*, 80(21), 4620–4632. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0672>
- Perera, R. M., & Bardeesy, N. (2015). Pancreatic Cancer Metabolism: Breaking It Down to Build It Back Up. *Cancer Discovery*, 5(12), 1247–1261. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0671>
- Petazzi, P., Akizu, N., García, A., Estarás, C., Martínez de Paz, A., Rodríguez-Paredes, M., Martínez-Balbás, M. A., Huertas, D., & Esteller, M. (2014). An increase in MECP2 dosage impairs neural tube formation. *Neurobiology of Disease*, 67, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.03.009>

- Petazzi, P., Sandoval, J., Szczesna, K., Jorge, O. C., Roa, L., Sayols, S., Gomez, A., Huertas, D., & Esteller, M. (2013). Dysregulation of the long non-coding RNA transcriptome in a Rett syndrome mouse model. *RNA Biology*, *10*(7), 1197–1203. <https://doi.org/10.4161/rna.24286>
- Pozzo-Miller, L., Pati, S., & Percy, A. K. (2015). Rett Syndrome: Reaching for Clinical Trials. *Neurotherapeutics*, *12*(3), 631–640. <https://doi.org/10.1007/s13311-015-0353-y>
- Pradhan, S., Bacolla, A., Wells, R. D., & Roberts, R. J. (1999). Recombinant Human DNA (Cytosine-5) Methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(46), 33002–33010. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.33002>
- Prasad, S. et al. (2022). Safety and Biodistribution Assessment in Non-Human Primates (NHPs) of a miniMECP2 AAV9 Vector for Gene-Replacement Therapy of Rett Syndrome. In *American Society of Gene and Cell Therapy Annual Meeting 2022; International Rett Syndrome Foundation Rett Syndrome Scientific Meeting 2022*.
- Qiu, Z., Sylwestrak, E. L., Lieberman, D. N., Zhang, Y., Liu, X.-Y., & Ghosh, A. (2012). The Rett Syndrome Protein MeCP2 Regulates Synaptic Scaling. *The Journal of Neuroscience*, *32*(3), 989–994. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0175-11.2012>
- Quenneville, S., Verde, G., Corsinotti, A., Kapopoulou, A., Jakobsson, J., Offner, S., Baglivo, I., Pedone, P. V., Grimaldi, G., Riccio, A., & Trono, D. (2011). In Embryonic Stem Cells, ZFP57/KAP1 Recognize a Methylated Hexanucleotide to Affect Chromatin and DNA Methylation of Imprinting Control Regions. *Molecular Cell*, *44*(3), 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.032>
- Radulovich, N., Qian, J., & Tsao, M. (2008). *Human Pancreatic Duct Epithelial Cell Model for KRAS Transformation* (pp. 1–13). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)00401-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)00401-6)
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Research*, *74*(11), 2913–2921. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- Raiber, E.-A., Beraldi, D., Ficiz, G., Burgess, H. E., Branco, M. R., Murat, P., Oxley, D., Booth, M. J., Reik, W., & Balasubramanian, S. (2012). Genome-wide distribution of 5-formylcytosine in embryonic stem cells is associated with transcription and depends on thymine DNA glycosylase. *Genome Biology*, *13*(8), R69. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-8-r69>
- Rai, K., Huggins, I. J., James, S. R., Karpf, A. R., Jones, D. A., & Cairns, B. R. (2008). DNA Demethylation in Zebrafish Involves the Coupling of a Deaminase, a Glycosylase, and Gadd45. *Cell*, *135*(7), 1201–1212. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.042>
- Ramakrishnan, S. (2017). Sno(RNA)wing and Pancreatic Cancer Metastasis. *Gastroenterology*, *153*(1), 12–14. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.05.039>
- Ramsahoye, B. H., Biniszkiwicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A. P., & Jaenisch, R. (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(10), 5237–5242. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5237>
- Reichow, B., George-Puskar, A., Lutz, T., Smith, I. C., & Volkmar, F. R. (2015). Brief Report: Systematic Review of Rett Syndrome in Males. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *45*(10), 3377–3383. <https://doi.org/10.1007/s10803-015-2519-1>
- Rett, A. (1966). [On a unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood]. *Wiener Medizinische Wochenschrift (1946)*, *116*(37), 723–726.

- Riggs, A. D. (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetic and Genome Research*, *14*(1), 9–25. <https://doi.org/10.1159/000130315>
- Robertson, A. D., & Murphy, K. P. (1997). Protein Structure and the Energetics of Protein Stability. *Chemical Reviews*, *97*(5), 1251–1268. <https://doi.org/10.1021/cr960383c>
- Ryan, D. P., Hong, T. S., & Bardeesy, N. (2014). Pancreatic Adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*, *371*(11), 1039–1049. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1404198>
- Sally, Á., McGowan, R., Finn, K., & Moran, B. M. (2022). Current and Future Therapies for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers*, *14*(10), 2417. <https://doi.org/10.3390/cancers14102417>
- Salomão Schwartzman, J., Zatz, M., dos Reis Vasquez, L., Ribeiro Gomes, R., Koiffmann, C. P., Fridman, C., & Guimarães Otto, P. (1999). Rett Syndrome in a Boy with a 47,XXY Karyotype. *The American Journal of Human Genetics*, *64*(6), 1781–1784. <https://doi.org/10.1086/302424>
- Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(5), 1412–1417. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510310103>
- Schellens, J. H. M. (2007). Capecitabine. *The Oncologist*, *12*(2), 152–155. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.12-2-152>
- Shahbazian, M. D., Sun, Y., & Zoghbi, H. Y. (2002). Balanced X chromosome inactivation patterns in the Rett syndrome brain. *American Journal of Medical Genetics*, *111*(2), 164–168. <https://doi.org/10.1002/ajmg.10557>
- Sharifi, O., & Yasui, D. H. (2021). The Molecular Functions of MeCP2 in Rett Syndrome Pathology. *Frontiers in Genetics*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.624290>
- Shi, D.-Q., Ali, I., Tang, J., & Yang, W.-C. (2017). New Insights into 5hmC DNA Modification: Generation, Distribution and Function. *Frontiers in Genetics*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00100>
- Simon, M. D., Chu, F., Racki, L. R., de la Cruz, C. C., Burlingame, A. L., Panning, B., Narlikar, G. J., & Shokat, K. M. (2007). The Site-Specific Installation of Methyl-Lysine Analogs into Recombinant Histones. *Cell*, *128*(5), 1003–1012. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.041>
- Sirianni, N., Naidu, S., Pereira, J., Pillotto, R. F., & Hoffman, E. P. (1998). Rett Syndrome: Confirmation of X-Linked Dominant Inheritance, and Localization of the Gene to Xq28. *The American Journal of Human Genetics*, *63*(5), 1552–1557. <https://doi.org/10.1086/302105>
- Skene, P. J., Illingworth, R. S., Webb, S., Kerr, A. R. W., James, K. D., Turner, D. J., Andrews, R., & Bird, A. P. (2010). Neuronal MeCP2 Is Expressed at Near Histone-Octamer Levels and Globally Alters the Chromatin State. *Molecular Cell*, *37*(4), 457–468. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.030>
- SOHN, T., YEO, C., CAMERON, J., KONIARIS, L., KAUSHAL, S., ABRAMS, R., SAUTER, P., COLEMAN, J., HRUBAN, R., & LILLEMOE, K. (2000). Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, *4*(6), 567–579. [https://doi.org/10.1016/S1091-255X\(00\)80105-5](https://doi.org/10.1016/S1091-255X(00)80105-5)
- Song, C., Feodorova, Y., Guy, J., Peichl, L., Jost, K. L., Kimura, H., Cardoso, M. C., Bird, A., Leonhardt, H., Joffe, B., & Solovei, I. (2014). DNA methylation reader MECP2: cell type-

and differentiation stage-specific protein distribution. *Epigenetics & Chromatin*, 7(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-17>

- Song, C.-X., Szulwach, K. E., Dai, Q., Fu, Y., Mao, S.-Q., Lin, L., Street, C., Li, Y., Poidevin, M., Wu, H., Gao, J., Liu, P., Li, L., Xu, G.-L., Jin, P., & He, C. (2013). Genome-wide Profiling of 5-Formylcytosine Reveals Its Roles in Epigenetic Priming. *Cell*, 153(3), 678–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.001>
- Spruijt, C. G., Gnerlich, F., Smits, A. H., Pfaffeneder, T., Jansen, P. W. T. C., Bauer, C., Münzel, M., Wagner, M., Müller, M., Khan, F., Eberl, H. C., Mensinga, A., Brinkman, A. B., Lephikov, K., Müller, U., Walter, J., Boelens, R., van Ingen, H., Leonhardt, H., ... Vermeulen, M. (2013). Dynamic Readers for 5-(Hydroxy)Methylcytosine and Its Oxidized Derivatives. *Cell*, 152(5), 1146–1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.004>
- Spruijt, C. G., & Vermeulen, M. (2014). DNA methylation: old dog, new tricks? *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(11), 949–954. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2910>
- Stearns, N. A., Schaevitz, L. R., Bowling, H., Nag, N., Berger, U. V., & Berger-Sweeney, J. (2007). Behavioral and anatomical abnormalities in Mecp2 mutant mice: A model for Rett syndrome. *Neuroscience*, 146(3), 907–921. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.009>
- Stomper, J., Rotondo, J. C., Greve, G., & Lübbert, M. (2021). Hypomethylating agents (HMA) for the treatment of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: mechanisms of resistance and novel HMA-based therapies. *Leukemia*, 35(7), 1873–1889. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01218-0>
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41–45. <https://doi.org/10.1038/47412>
- Szulwach, K. E., Li, X., Li, Y., Song, C.-X., Han, J. W., Kim, S., Namburi, S., Hermetz, K., Kim, J. J., Rudd, M. K., Yoon, Y.-S., Ren, B., He, C., & Jin, P. (2011). Integrating 5-Hydroxymethylcytosine into the Epigenomic Landscape of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS Genetics*, 7(6), e1002154. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002154>
- Szulwach, K. E., Li, X., Li, Y., Song, C.-X., Wu, H., Dai, Q., Irier, H., Upadhyay, A. K., Gearing, M., Levey, A. I., Vasanthakumar, A., Godley, L. A., Chang, Q., Cheng, X., He, C., & Jin, P. (2011). 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nature Neuroscience*, 14(12), 1607–1616. <https://doi.org/10.1038/nn.2959>
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., & Rao, A. (2009). Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*, 324(5929), 930–935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>
- Taysha Gene Therapies, Inc. (n.d.). *Safety and Efficacy of TSHA-102 in Adult Females With Rett Syndrome (REVEAL Adult Study)*. <https://ClinicalTrials.gov/Ct2/Show/Study/NCT05606614>.
- Thambirajah, A. A., Ng, M. K., Frehlick, L. J., Li, A., Serpa, J. J., Petrotchenko, E. V., Silva-Moreno, B., Missiaen, K. K., Borchers, C. H., Adam Hall, J., Mackie, R., Lutz, F., Gowen, B. E., Hendzel, M., Georgel, P. T., & Ausió, J. (2012). MeCP2 binds to nucleosome free (linker DNA) regions and to H3K9/H3K27 methylated nucleosomes in the brain. *Nucleic Acids Research*, 40(7), 2884–2897. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1066>
- Thandapani, P., O'Connor, T. R., Bailey, T. L., & Richard, S. (2013). Defining the RGG/RG Motif. *Molecular Cell*, 50(5), 613–623. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.021>

- Torres, I. O., & Fujimori, D. G. (2015). Functional coupling between writers, erasers and readers of histone and DNA methylation. *Current Opinion in Structural Biology*, *35*, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.09.007>
- Trendel, J., Schwarzl, T., Horos, R., Prakash, A., Bateman, A., Hentze, M. W., & Krijgsveld, J. (2019). The Human RNA-Binding Proteome and Its Dynamics during Translational Arrest. *Cell*, *176*(1–2), 391–403.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.004>
- Uversky, V. N., Oldfield, C. J., & Dunker, A. K. (2005). Showing your ID: intrinsic disorder as an ID for recognition, regulation and cell signaling. *Journal of Molecular Recognition*, *18*(5), 343–384. <https://doi.org/10.1002/jmr.747>
- Van Esch, H., Bauters, M., Ignatius, J., Jansen, M., Raynaud, M., Hollanders, K., Lugtenberg, D., Bienvu, T., Jensen, L. R., Gécz, J., Moraine, C., Marynen, P., Fryns, J.-P., & Froyen, G. (2005a). Duplication of the MECP2 Region Is a Frequent Cause of Severe Mental Retardation and Progressive Neurological Symptoms in Males. *The American Journal of Human Genetics*, *77*(3), 442–453. <https://doi.org/10.1086/444549>
- Van Esch, H., Bauters, M., Ignatius, J., Jansen, M., Raynaud, M., Hollanders, K., Lugtenberg, D., Bienvu, T., Jensen, L. R., Gécz, J., Moraine, C., Marynen, P., Fryns, J.-P., & Froyen, G. (2005b). Duplication of the MECP2 Region Is a Frequent Cause of Severe Mental Retardation and Progressive Neurological Symptoms in Males. *The American Journal of Human Genetics*, *77*(3), 442–453. <https://doi.org/10.1086/444549>
- Vashi, N., & Justice, M. J. (2019). Treating Rett syndrome: from mouse models to human therapies. *Mammalian Genome*, *30*(5–6), 90–110. <https://doi.org/10.1007/s00335-019-09793-5>
- Vega, S., Abian, O., & Velazquez-Campoy, A. (2015). A unified framework based on the binding polynomial for characterizing biological systems by isothermal titration calorimetry. *Methods*, *76*, 99–115. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.09.010>
- Vega, S., Abian, O., & Velazquez-Campoy, A. (2016). On the link between conformational changes, ligand binding and heat capacity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1860*(5), 868–878. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.010>
- Velazquez-Campoy, A., Sancho, J., Abian, O., & Vega, S. (2016). Biophysical Screening for Identifying Pharmacological Chaperones and Inhibitors Against Conformational and Infectious Diseases. *Current Drug Targets*, *17*(13), 1492–1505. <https://doi.org/10.2174/1389450117666160201110449>
- Vincent, A., Omura, N., Hong, S.-M., Jaffe, A., Eshleman, J., & Goggins, M. (2011). Genome-Wide Analysis of Promoter Methylation Associated with Gene Expression Profile in Pancreatic Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, *17*(13), 4341–4354. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3431>
- Vuilleumier, S., Sancho, J., Loewenthal, R., & Fersht, A. R. (1993). Circular dichroism studies of barnase and its mutants: Characterization of the contribution of aromatic side chains. *Biochemistry*, *32*(39), 10303–10313. <https://doi.org/10.1021/bi00090a005>
- Wada, R., Akiyama, Y., Hashimoto, Y., Fukamachi, H., & Yuasa, Y. (2009). miR-212 is downregulated and suppresses methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human gastric cancer. *International Journal of Cancer*, *127*(5), 1106–1114. <https://doi.org/10.1002/ijc.25126>
- Waddell, N., Pajic, M., Patch, A.-M., Chang, D. K., Kassahn, K. S., Bailey, P., Johns, A. L., Miller, D., Nones, K., Quek, K., Quinn, M. C. J., Robertson, A. J., Fadlullah, M. Z. H., Bruxner, T. J. C., Christ, A. N., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourse, C., ...

- Grimmond, S. M. (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*, *518*(7540), 495–501. <https://doi.org/10.1038/nature14169>
- Waddington, C. H. (2012). The Epigenotype. *International Journal of Epidemiology*, *41*(1), 10–13. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>
- Wade, P. A., Geggion, A., Jones, P. L., Ballestar, E., Aubry, F., & Wolffe, A. P. (1999). Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. *Nature Genetics*, *23*(1), 62–66. <https://doi.org/10.1038/12664>
- Wakefield, R. I. D., Smith, B. O., Nan, X., Free, A., Soteriou, A., Uhrin, D., Bird, A. P., & Barlow, P. N. (1999). The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA. *Journal of Molecular Biology*, *291*(5), 1055–1065. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3023>
- Wang, H., Li, J., He, J., Liu, Y., Feng, W., Zhou, H., Zhou, M., Wei, H., Lu, Y., Peng, W., Du, F., Gong, A., & Xu, M. (2020). Methyl-CpG-binding protein 2 drives the Furin/TGF- β 1/Smad axis to promote epithelial–mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis*, *9*(8), 76. <https://doi.org/10.1038/s41389-020-00258-y>
- Wang, X., Lang, M., Zhao, T., Feng, X., Zheng, C., Huang, C., Hao, J., Dong, J., Luo, L., Li, X., Lan, C., Yu, W., Yu, M., Yang, S., & Ren, H. (2017). Cancer-FOXP3 directly activated CCL5 to recruit FOXP3+Treg cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, *36*(21), 3048–3058. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.458>
- Wang, X., Li, X., Wei, X., Jiang, H., Lan, C., Yang, S., Wang, H., Yang, Y., Tian, C., Xu, Z., Zhang, J., Hao, J., & Ren, H. (2020). PD-L1 is a direct target of cancer-FOXP3 in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), and combined immunotherapy with antibodies against PD-L1 and CCL5 is effective in the treatment of PDAC. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 38. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0144-8>
- Ward, J. J., Sodhi, J. S., McGuffin, L. J., Buxton, B. F., & Jones, D. T. (2004). Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *Journal of Molecular Biology*, *337*(3), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.02.002>
- Weissmann, S., Alpermann, T., Grossmann, V., Kowarsch, A., Nadarajah, N., Eder, C., Dicker, F., Fasan, A., Haferlach, C., Haferlach, T., Kern, W., Schnittger, S., & Kohlmann, A. (2012). Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *26*(5), 934–942. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.326>
- Wen, L., Li, X., Yan, L., Tan, Y., Li, R., Zhao, Y., Wang, Y., Xie, J., Zhang, Y., Song, C., Yu, M., Liu, X., Zhu, P., Li, X., Hou, Y., Guo, H., Wu, X., He, C., Li, R., ... Qiao, J. (2014). Whole-genome analysis of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine at base resolution in the human brain. *Genome Biology*, *15*(3), R49. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r49>
- Wood, L. D., Canto, M. I., Jaffee, E. M., & Simeone, D. M. (2022). Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology*, *163*(2), 386–402.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.03.056>
- Wu, C. -t., & Morris, J. R. (2001). Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. *Science*, *293*(5532), 1103–1105. <https://doi.org/10.1126/science.293.5532.1103>
- Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics*, *18*(9), 517–534. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>

- Wyman, J. (1964). *Linked Functions and Reciprocal Effects in Hemoglobin: A Second Look* (pp. 223–286). [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60190-4](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60190-4)
- Xiang, F. (2000). Mutation screening in Rett syndrome patients. *Journal of Medical Genetics*, 37(4), 250–255. <https://doi.org/10.1136/jmg.37.4.250>
- Xie, S., Wang, Z., Okano, M., Nogami, M., Li, Y., He, W.-W., Okumura, K., & Li, E. (1999). Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*, 236(1), 87–95. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00252-8)
- Xinhua Bao, Shengling Jiang, Fuying Song, Hong Pan, Meirong Li, & Wu, X.-R. (2008). X Chromosome Inactivation in Rett Syndrome and Its Correlations With MeCP2 Mutations and Phenotype. *Journal of Child Neurology*, 23(1), 22–25. <https://doi.org/10.1177/0883073807307077>
- Yap, K. L., & Zhou, M.-M. (2010). Keeping it in the family: diverse histone recognition by conserved structural folds. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(6), 488–505. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.512001>
- Yasui, D. H., Peddada, S., Bieda, M. C., Vallero, R. O., Hogart, A., Nagarajan, R. P., Thatcher, K. N., Farnham, P. J., & LaSalle, J. M. (2007). Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19416–19421. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707442104>
- Yen, R.-W. C., Vertino, P. M., Nelkin, B. D., Yu, J. J., El-Deiry, W., Cumaraswamy, A., Lennon, G. G., Trask, B. J., Celano, P., & Baylin, S. B. (1992). Isolation and characterization of the cDNA encoding human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 20(9), 2287–2291. <https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2287>
- Yildirim, O., Li, R., Hung, J.-H., Chen, P. B., Dong, X., Ee, L.-S., Weng, Z., Rando, O. J., & Fazio, T. G. (2011). Mbd3/NURD Complex Regulates Expression of 5-Hydroxymethylcytosine Marked Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell*, 147(7), 1498–1510. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.054>
- Young, J. I., Hong, E. P., Castle, J. C., Crespo-Barreto, J., Bowman, A. B., Rose, M. F., Kang, D., Richman, R., Johnson, J. M., Berget, S., & Zoghbi, H. Y. (2005). Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(49), 17551–17558. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507856102>
- Young, J. I., & Zoghbi, H. Y. (2004). X-Chromosome Inactivation Patterns Are Unbalanced and Affect the Phenotypic Outcome in a Mouse Model of Rett Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 74(3), 511–520. <https://doi.org/10.1086/382228>
- Yue, X., Trifari, S., Äijö, T., Tsagaratou, A., Pastor, W. A., Zepeda-Martínez, J. A., Lio, C.-W. J., Li, X., Huang, Y., Vijayanand, P., Lähdesmäki, H., & Rao, A. (2016). Control of Foxp3 stability through modulation of TET activity. *Journal of Experimental Medicine*, 213(3), 377–397. <https://doi.org/10.1084/jem.20151438>
- Yu, M., Hon, G. C., Szulwach, K. E., Song, C.-X., Jin, P., Ren, B., & He, C. (2012). Tet-assisted bisulfite sequencing of 5-hydroxymethylcytosine. *Nature Protocols*, 7(12), 2159–2170. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.137>
- Yusufzai, T. M. (2000). Functional consequences of Rett syndrome mutations on human MeCP2. *Nucleic Acids Research*, 28(21), 4172–4179. <https://doi.org/10.1093/nar/28.21.4172>
- Zachariah, R. M., Olson, C. O., Ezeonwuka, C., & Rastegar, M. (2012). Novel MeCP2 Isoform-Specific Antibody Reveals the Endogenous MeCP2E1 Expression in Murine Brain,

- Primary Neurons and Astrocytes. *PLoS ONE*, 7(11), e49763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049763>
- Zahorakova, D. (2013). Rett Syndrome. In *Chromatin Remodelling*. InTech. <https://doi.org/10.5772/55020>
- Zavrtanik, U., Hadži, S., & Lah, J. (2021). Unraveling the Thermodynamics of Ultra-tight Binding of Intrinsically Disordered Proteins. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.726824>
- Zhang, F., Pomerantz, J. H., Sen, G., Palermo, A. T., & Blau, H. M. (2007). Active tissue-specific DNA demethylation conferred by somatic cell nuclei in stable heterokaryons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(11), 4395–4400. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700181104>
- Zhang, H., Romero, H., Schmidt, A., Gagova, K., Qin, W., Bertulat, B., Lehmkuhl, A., Mildner, M., Eck, M., Meckel, T., Leonhardt, H., & Cardoso, M. C. (2022). MeCP2-induced heterochromatin organization is driven by oligomerization-based liquid–liquid phase separation and restricted by DNA methylation. *Nucleus*, 13(1), 1–34. <https://doi.org/10.1080/19491034.2021.2024691>
- Zhang, Y., Yang, C., Cheng, H., Fan, Z., Huang, Q., Lu, Y., Fan, K., Luo, G., Jin, K., Wang, Z., Liu, C., & Yu, X. (2018). Novel agents for pancreatic ductal adenocarcinoma: emerging therapeutics and future directions. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0551-7>
- Zheng, Y., Fornelli, L., Compton, P. D., Sharma, S., Canterbury, J., Mullen, C., Zabrouskov, V., Fellers, R. T., Thomas, P. M., Licht, J. D., Senko, M. W., & Kelleher, N. L. (2016). Unabridged Analysis of Human Histone H3 by Differential Top-Down Mass Spectrometry Reveals Hypermethylated Proteoforms from MMSET/NSD2 Overexpression. *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(3), 776–790. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.053819>

8. ANEXOS

8.1 Listado de tablas y figuras.

Tabla 1.1 Agentes escritores, borradores y lectores de la metilación de histonas y sus funciones	29
Tabla 3.1 Parámetros de las construcciones proteicas.....	77
Tabla 3.2 Secuencias oligonucleótidos.....	98
Tabla 4.1. Análisis de la señal de dicroísmo circular de las construcciones truncadas de MeCP2	102
Tabla 4.2. Estabilidad térmica de las construcciones de MeCP2 en tampón 50 mM Tris pH 7	105
Tabla 4.3. Parámetros asociados al test de van't Hoff (test de dos estados) de los datos de DSC	107
Tabla 4.4. Parámetros asociados al análisis por DSC del desplegamiento de las construcciones MBD y NTD-MBD-ID a pH	108
Tabla 4.5 Parámetros de desnaturalización química de las construcciones MBD and NTD-MBD-ID a pH7	109
Tabla 4.6 Parámetros de interacción independiente del tampón para las variantes truncadas de MeCP2 con ADN sin metilar (CpG-), metilado (mCpG-) e hidroximetilado (hmCpG-) a pH7	120
Tabla 4.7. Parámetros de estabilidad térmica por fluorescencia para MeCP2 completa y sus dos variantes truncadas MBD y NTD-MBD-ID (5 μ M) en ausencia y presencia de DNA (10 μ M) sin metilar (CpG-), metilado (mCpG-), e hidroximetilado (hmCpG-) a pH 7	123
Tabla 4.8 Parámetros de desnaturalización química de las construcciones MBD and NTD-MBD-ID a pH 7, presencia de DNA sin metilar (CpG-), metilado (mCpG-), e hidroximetilado (hmCpG-)	127
Tabla 4.9 Parámetros de dispersión dinámica de luz de los constructos MBD y NTD-MBD-ID a pH 7 en ausencia presencia de CpG-dsDNA y mCpG-ds DNA.	
Tabla 4.10. MeCP2 interacciona con H3. Parámetros de interacción de MeCP2 (proteína completa) interaccionando con H3 y H3 K27me3 a pH 7, 20 °C	129
Tabla 4.11. MBD interacciona con las cuatro histonas nucleosomales. Parámetros de interacción de MBD interaccionando con con H2A, H2B, H3, y H4 a pH 7, 20 °C	134
Tabla 4.12. MBD interacciona con variantes de H3 trimetiladas en lisinas. Parámetros de interacción de MBD interaccionando con H3 trimetilada en K4, K9, K27, y K36 a pH 7, 20 °C.....	139
Tabla 4.13. Parámetros de estabilidad térmica para los mutantes MeCP2 en sus dos variantes truncadas MBD y NTD-MBD-ID a pH 7	146

Tabla 4.14. Interacción de mutantes MBD con dsDNA por ITC	147
Tabla 4.15. Parámetros de unión independientes del tampón para la interacción de los diferentes mutantes MeCP2 asociados al síndrome de Rett con dsDNA no metilado (CpG-), metilado (mCpG-) e hidroximetilado (hmCpG)	152
Tabla 4.16. MBD interacciona con las cuatro histonas nucleosomales	157
Tabla 4.17. MBD interactúa con las variantes H3 trimetiladas en lisina	157
Tabla 4.18 Datos de estabilización de los compuestos DOA y RAO del HTS para la proteína WT o con mutaciones R106W y R133C	163
Tabla 19. Datos de citotoxicidad de los compuestos RAO y DOA en función de CC50 y CC95 para las líneas celulares Lunet, HACAT y HBL26 y ReNCeLls R133C	172

Figura 1.1 Regulación epigenética de la expresión génica	19
Figura 1.2 Vías de metilación y desmetilación del DNA	23
Figura 1.3 Familia MBD y otras proteínas que contienen dominio MBD ..	26
Figura 1.4 Dominios funcionales de la proteína MeCP2	33
Figura 1.5 Funciones de MeCP2 según su unión a diferentes ligandos moleculares	34
Figura 1.6 Etapas del síndrome de Rett y sintomatología.....	45
Figura 1.7 Mutaciones causantes de síndrome de Rett.....	47
Figura 1.8 Incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer.....	53
Figura 1.9 Fases del desarrollo de PDAC.....	55
Figura 2.1 Representación esquemática de los objetivos 1- 4.....	64
Figura 2.2 Representación esquemática del objetivo 5.....	68
Figura 4.1 Predicción de estructura de MeCP2 indicando secuencia y separación de los diferentes dominios	101
Figura 4.2. Señal de dicróismo circular y fluorescencia intrínseca de las construcciones truncadas de MeCP2.....	102
Figura 4.3. Datos de estabilidad térmica medidos por fluorescencia intrínseca de triptófano de las variantes de MeCP2.....	105
Figura 4.4. Estabilidad de las construcciones MBD y NTD-MBD-ID por DSC y desnaturalización química	108
Figura 4.5 Interacción del constructo MBD con CpG-ADN (A), mCpG-ADN (B) y hmCpG-ADN (C) mediante ITC	110
Figura 4.6. Interacción del constructo MBD (arriba) y NTD-MBD-ID (abajo) con CpG-ADN (A), mCpG-ADN (B) y hmCpG-ADN (C) en condiciones de alta fuerza iónica (150 mM cloruro de sodio) mediante ITC.....	112
Figura 4.7. Parámetros termodinámicos de la interacción del constructo MBD con CpG-ADN (U), mCpG-ADN (M) y hmCpG-ADN (H) independiente del tampón. Energía libre de Gibbs desglosada en sus componentes entálpicas y entrópicas	114
Figura 4.8. Interacción del constructo NTD-MBD-ID con CpG-ADN (A), mCpG-ADN (B) y hmCpG-ADN (C) mediante ITC	115

Figura 4.9. Parámetros termodinámicos de la interacción del constructo NTD-MBD-ID con CpG-ADN (U), mCpG-ADN (M) y hmCpG-ADN (H) independiente del tampón.....	116
Figura 4.10. Interacción del constructo ID con CpG-ADN (A), mCpG-ADN (B) y hmCpG-ADN (C) mediante ITC.	117
Figura 4.11. Interacción de MeCP2 con CpG-DNA (A) y mCpG-DNA (B) mediante ITC.....	119
Figura 4.12. Desnaturalización térmica por fluorescencia de MeCP2 con dsDNA	122
Figura 4.13. Desnaturalizaciones térmicas medidas por calorimetría diferencial de barrido de los constructos truncados de MeCP2	125
Figura 4.14 Estabilización frente a desnaturalización química de los constructos MBD y NTD-MBD-ID en presencia de dsDNA	127
Figura 4.15 Implicación estructural de la formación del complejo MeCP2:dsDNA medido mediante DLS y DC	129
Figura 4.16. Espectros de dicroísmo circular de las variantes de H3	132
Figura 4.17 Interacción de MeCP2 con H3 por DC	133
Figura 4.18 Interacción de MeCP2 con H3 por DC Interacción de MeCP2 con H3 por ITC	135
Figura 4.19. Interacción del MBD con las histonas canónicas por ITC	136
Figura 4.20. Interacción del MBD con H3 trimetilada en lisina en diferentes posiciones por ITC	138
Figura 4.21. Interacción del MBD con péptidos derivados de H3 por ITC ...	140
Figura 4.22. Interacciones ternarias del MBD con H3 y dsDNA por ITC ...	142
Figura 4.23. Efectos estructurales de las mutaciones asociadas a RTT	145
Figura 4.24. Interacción de MBD con mutaciones RTT con el dsADN mediante ITC	148
Figura 4.25. Interacción de NTD-MBD-ID con mutaciones RTT con el dsADN. Interacción del constructo MBD con la mutación R106W con CpG-ADN (A), mCpG-ADN (B) y hmCpG-ADN (C) mediante ITC	149
Figura 4.26. Parámetros termodinámicos de la interacción del constructo NTD-MBD-ID con la mutación R106W con CpG-DNA (U), mCpG-DNA (M) y hmCpG-DNA (H) independiente del tampón	150
Figura 4.27. Interacción de NTD-MBD-ID con mutaciones RTT con el dsADN. Interacción del constructo MBD con la mutación R133C con CpG-ADN (A), mCpG-ADN (B) y hmCpG-ADN (C) mediante ITC	151
Figura 4.28. Parámetros termodinámicos de la interacción del constructo NTD-MBD-ID con la mutación R133C con CpG-DNA (U), mCpG-DNA (M) y hmCpG-DNA (H) independiente del tampón	152
Figura 4.29. Interacción del constructo MBD con la mutación R106W con H2A, H2B, H3, H4 mediante ITC	155
Figura 4.30. Interacción de MBD con mutaciones RTT con las histonas canónicas por ITC. Interacción del constructo MBD con la mutación R133C con	

H2A, H2B, H3, H4 mediante ITC	156
Figura 4.31. Interacción del constructo MBD con la mutación R106W con H3 trimetilada en lisina K4, K9, K27 y K36 mediante ITC	158
Figura 4.32. Interacción del constructo MBD con la mutación R133C con H3 trimetilada en lisina K4, K9, K27 y K36 mediante ITC	159
Figura 4.33 Cribado de alto rendimiento para compuestos estabilizadores e inhibidores del complejo MeCP2:dsDNA	162
Figura 4.34. Datos comparativos de la línea de precursores neuronales RNCells WT y con la mutación R133C	169
Figura 4.35. Estudio de citotoxicidad de los compuestos RAO y DOA	173
Figura 4.36. Estudio de citotoxicidad de los compuestos RAO y DOA en la línea RNCCell con la mutación R133C	173
Figura 4.37. Estudio funcional de los compuestos RAO preseleccionados en la línea celulares linfoblastoides	174
Figura 4.38. Efecto del tratamiento con compuestos RAO seleccionados sobre la expresión de BDNF de células linfoblastoides	175
Figura 4.39. Efecto del tratamiento con compuestos estabilizadores del complejo MeCP2:dsDNA (RAO y DOA) en la expresión de genes de precursores neuronales	177
Figura 4.40. Efecto del tratamiento con compuestos estabilizadores del complejo MeCP2:dsDNA (RAO y DOA) en unión a promotores de genes en precursores neuronales	178
Figura 4.41. Expresión de MeCP2 en PDAC	180
Figura 4.42. Interacción del NTD-MBD-ID con los compuestos ADO por ITC	182
Figura 4.43. Estudio de citotoxicidad de los compuestos ADO en líneas celulares de páncreas	183
Figura 4.44. Estudio de citotoxicidad de los compuestos ADO en líneas provenientes de pacientes PDAC	185
Figura 5.1 Fracción molar de los diferentes estados conformacionales de las construcciones de MeCP2	191
Figura 5.2 Representación esquemática de la interacción de 5-mC y 5-hmC con el dominio MBD de MeCP2	195
Figura 5.3 Modelos estructurales de MBD y H3 dentro del nucleosoma...	203

8.2 Listado de abreviaturas.

5-caC	5-Carboxilcitosina
5-fC	5-Formilcitosina
5-hmC.	5-Hidroximetilcitosina
5-hmU	5-Hidroximetiluracilo
5-mC	5-Metilcitosina
A	Adenina
ADEX	Tumores endocrinos exocrinos aberrantemente diferenciados
AID/APOBEC	Cidina deaminasa inducida por activación/Complejo de enzima de edición del ARNm de apolipoproteína B
ATP	Adenosín trifosfato
ATRX de Alfa-Talasemia	Síndrome de Retraso Mental ligado al Cromosoma X por Deficiencia de Alfa-Talasemia
BAZ	Proteínas Bazooka
BER	Sistema de reparación por escisión de bases
Bdnf	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BPE	Extracto de hipófisis bovina
BRCA1/2.	Gen de susceptibilidad al cáncer de mama 1/2
C	Citosina
Cas-9	Proteína nucleasa-9
CC50	Concentración citotóxica 50%
CC95	Concentración citotóxica 5%
CDH1	Cadherina 1
CDKL5	Quinasa semejante a ciclina 5
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
ChIP-seq	Secuenciación de inmunoprecipitación de cromatina
CpA	Dinucleótido Citosina Adenina
CpG	Dinucleótido Citosina Guanina
CREB1	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
CRISPR Espaciadas	Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente
CTDα	Dominio C-terminal α

CTDβ	Dominio C-terminal β
DLS	Dispersión dinámica de luz
Dlx6	Homeobox Distal-less 6
DMEM	Medio de Águila Modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	Metiltransferasa de DNA
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
dsDNA	DNA de doble cadena
E1, E2 (MeCP2)	Isoformas 1 o 2 de MeCP2
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMT.	Transición epitelio-mesenquimal
FAD.	Dinucleótido de flavina y adenina
FOXA1/2.	Forkhead box protein A1/2
FOXG1.	Forkhead box protein G1
FPLC.	Cromatografía líquida de proteínas rápida
FRET.	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
G.	Guanina
GluR2.	Receptor de glutamato 2
GST.	Transferasa glutatión-S
H1.	Histona 1
H2A.	Histona 2A
H2B.	Histona 2B
H3	Histona 3
H3K4me3	Histona 3 trimetilada en la lisina 4
H3K9me3	Histona 3 trimetilada en la lisina 9
H3K27me3	Histona 3 trimetilada en la lisina 27
H3K36me3	Histona 3 trimetilada en la lisina 36
H3K27C	Histona 3 con sustitución de la lisina 27 por cisteína
H4	Histona 4
HAT	Histona acetiltransferasas
HDAC	Desacetilasa de histona

HDMT	Demetiltransferasas de histona
hmCpA	Dinucleótido CA hidroximetilado
hmCpG	Dinucleótido CG hidroximetilado
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HP1	Proteína de heterocromatina
IPTG	1-Tio- β -D-galactopiranosido
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
ITPN	Neoplasias tubulopapilares intraductales
K	Lisina
Kd	Constante de disociación
LB	Medio Luria-Bertani
MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz - tiempo de vuelo
MBD	Dominio de unión a metil-CpG
MBP	Proteínas de unión a metil
MDS	Síndrome de duplicación de MeCP2
MeCP2	Proteína de unión a metil-CpG 2
MCN	Neoplasia quística mucinosa
NCoR	Receptor corepressor 1
NMR	Resonancia magnética nuclear
NTD	Dominio N-terminal
O/N	Durante la noche
OD₆₀₀	Densidad óptica a 600 nanómetros
PanIN	Neoplasia pancreática intraepitelial
PDAC	Adenocarcinoma pancreático ductal
PD-L1	Ligando de muerte programada 1
PEST	Secuencias ricas en prolina, ácido glutámico, serina y treonina
PIPES	Piperazina-N,N'-bis(2-etanosulfónico)
pKa	Constante de disociación ácida
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PTM	Modificaciones post-traduccionales
R106W	Arginina 106 Triptófano

R133C	Arginina 133 Cisteína
RNA	Ácido ribonucleico
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
RTT	Síndrome de Rett
SFB	Suero fetal bovino
SIRT-1	Proteína sirtuina 1
Sin3A	Miembro regulador de la familia SIN3
ssDNA	DNA de cadena simple
ssRNA	ARN de cadena simple
T158M	Tirosina 158 Metionina
TEA	Trastornos del Espectro Autista
TET	Ten-eleven translocation proteins
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TRD	Dominio represor de transcripción
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
WT	Proteína silvestre, sin mutaciones
YB-1	Proteína de unión a la caja Y-box