



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

*Identificación de
compuestos
inhibidores dirigidos
contra la flavodoxina
de Streptococcus
pneumoniae*

**Directores: Javier Sancho,
Adrián Velázquez**

Autor: Sara Prieto Rodríguez

**Máster en Biología Molecular y Celular
2017/18**

Índice

Resumen	4
1. Antecedentes	
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6
1.2. Genes implicados en la patogenicidad de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6-9
1.3. Flavodoxina	9
1.3.1. Propiedades espectroscópicas de SpFld	9-10
1.3.2. Estudio de estabilidad de SpFld	10-11
1.3.3. Estudio de la interacción de flavodoxina y su co-factor, FMN	11-12
1.3.4. Estudio de las estructuras de la forma apo y holo de flavodoxina a través de rayos X	12
1.4. SpFld: posible diana terapéutica	13-14
2. Objetivos	14
3. Métodos	15
3.1. Expresión de SpFld en células BL21	15-17
3.2. Purificación de SpFld	17
3.2.1. Cromatografía de afinidad	17-18
3.2.2. Cromatografía de filtración en gel	18-19
3.3. Análisis cuantitativo de expresión y purificación de SpFld	19
3.4. Optimización del cribado de compuestos: curvas de desnaturalización térmica	20-21

3.5. Ensayo de desnaturalización térmica de SpFld frente a los compuestos de estudio: selección de compuestos	22
3.6. Estudio de la interacción entre SpFld y los compuestos seleccionados: ITC	22-23
3.7. Análisis de datos	24
3.7.1. Obtención de curvas de desnaturalización térmica a partir de la detección de fluorescencia. Cálculo de T_m .	24-25
3.7.2. Análisis de parámetros que caracterizan la interacción proteína-ligando: ITC	25-26
4. Resultados	27
4.1. Expresión de SpFld en células BL21	27-28
4.2. Purificación de SpFld	28-29
4.2.1. Análisis cuantitativo y cualitativo tras columna de afinidad	29-30
4.2.2. Análisis cuantitativo y cualitativo tras columna de filtración en gel, última fase de purificación	30-31
4.3. Optimización del cribado de compuestos	32-33
4.4. Análisis de curvas de desnaturalización térmica: selección de compuestos que aumenten la estabilidad proteica (T_m)	34-51
4.5. Re-análisis de los compuestos que aumentan la estabilidad de SpFld	52-53
4.6. Estudio de interacción entre flavodoxina y los compuestos seleccionados	53-54
5. Discusión	55-60
6. Conclusiones	60-63
7. Bibliografía	63-65

Resumen

Streptococcus pneumoniae, causante de neumonía, otitis media, meningitis y bacteremia provoca más de un millón de muertes anuales y en un 25% de los casos, secuelas a nivel neurológico.

Actualmente, la terapia contra este patógeno se basa en la administración de antibióticos y vacunas polivalentes dirigidas contra los serotipos más comunes, conocidos como “serotipos pediátricos”.

La elevada diversidad genotípica y fenotípica de *Streptococcus pneumoniae* impide su erradicación, por ello es necesaria la búsqueda de una nueva diana terapéutica para combatir las infecciones causadas por este patógeno.

En este proyecto de investigación, se realiza un cribado de 1120 compuestos dirigidos contra una proteína implicada en el metabolismo de metionina de *Streptococcus*, flavodoxina.

La expresión del gen de flavodoxina se ha reportado como esencial en la supervivencia e invasividad de la bacteria a través de estudios de expresión génica durante la fase infectiva de *Streptococcus*.

Su función esencial en el metabolismo bacteriano, la inexistencia de un homólogo proteico en humanos y la ausencia de variabilidad genotípica conducen a la elección de flavodoxina como posible diana terapéutica.

A través del estudio de interacción proteína-ligando efectuado mediante el análisis de sus curvas de desnaturalización térmica (thermal-shift assay) se consigue identificar un compuesto que aumenta la estabilidad proteica de flavodoxina (T_m), L-Tiroxina.

Los estudios de ITC (isothermal titration calorimetry) realizados para confirmar la interacción entre L-Tiroxina – SpFId fueron favorables, obteniendo valores de K_D razonablemente buenos.

Abstract

Streptococcus pneumoniae is the cause of pneumonia, otitis media, meningitis and bacteremia. It causes neurological affectations in 25% of all cases and more than one million deaths each year.

Currently, the therapy against this pathogen is based on the administration of antibiotics and polyvalent vaccines to tackle the most common serotypes, known as “pediatric serotypes”.

The high genotypic and phenotypic diversity of the *Streptococcus pneumoniae* hampers its eradication. Therefore, a new therapeutic approach is needed in order to fight the infections caused by this pathogen.

In this research project, we carried out a screening of 1120 compounds aimed to fight against a protein involved in the *Streptococcus* metabolism, flavodoxin.

The expression of the flavodoxin gene is considered essential to the survival and infectivity of the bacteria in gene expression studies during the invasive state of *Streptococcus*.

Its key role in the bacterial metabolism, the absence of a homologous protein in humans and the lack of genotypic variation lead to the choice of flavodoxin as a potential therapeutic approach.

Through the study of protein-ligand interactions by its thermal-shift assay, we have identified a compound that increases the protein stability (T_m), L-Thyroxine.

The ITC analysis carried out to confirm the interaction between L-Thyroxine and SpFld were favorable and we obtained great values of K_D .

1. Antecedentes

1.1. *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae es el principal causante de enfermedades como otitis, sinusitis, bronquitis, neumonía adquirida, meningitis y bacteremia.

Causante de muerte en un 25% de los casos (más de un millón de muertes al año a nivel mundial) y secuelas neurológicas en la mitad de los supervivientes a pesar de aplicar tratamientos antibióticos o vacunas.

Existen 92 serotipos diferentes, siendo los serotipos 6B, 6A, 9V, 14, 15A, 19F, 19A y 23F, conocidos como serotipos pediátricos, los que mayor resistencia presentan a antibióticos. La administración de vacunas polivalentes dirigidas contra glucoproteínas de membrana de *Streptococcus pneumoniae* incluyen los serotipos más comunes: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Su administración se asocia con una disminución de la resistencia de la bacteria a penicilina.

Sin embargo, el incremento en la incidencia de serotipos diferentes a los contenidos en la vacuna, especialmente 19 A, dificulta su tratamiento.

Una vacuna o fármaco ideal para combatir este patógeno debería dirigirse contra componentes bacterianos presentes en todos los serotipos existentes y que no sufriese variabilidad. (1, 2, 3, 4).

1.2. Genes implicados en la patogenicidad de *Streptococcus pneumoniae*

La resistencia a antibióticos y vacunas dirigidas contra factores virulentos definidos, como polisacáridos de membrana, neumolisina o proteínas de unión a colina dificulta el tratamiento de *Streptococcus*, debido a la variabilidad existente en los diferentes serotipos, por ello, es necesaria la búsqueda de nuevos genes codificantes de factores virulentos diferentes a los citados. (1, 2, 3, 4, 5).

La detección de la expresión de genes esenciales en la virulencia del patógeno debe realizarse durante su invasión en el huésped, de esta manera, no sólo

puede confirmarse su expresión, sino que permite diferenciar su contribución en las diferentes enfermedades causadas, así como informar del estado de la bacteria y su respuesta contra el sistema inmunológico.

La detección de la expresión de estos genes es interesante para el diseño de fármacos o vacunas dirigidas contra ellos, ya que su transcripción es requerida por el patógeno para sobrevivir.

Un estudio basado en la inactivación de genes de *Streptococcus* utilizando una librería compuesta por fragmentos cromosómicos de la bacteria y clonada en un plásmido suicida ha permitido aislar 1250 genes candidatos en ratones modelo de neumonía, de los cuales 200 no estaban presentes en los pulmones, indicando una disminución en la invasividad del patógeno tras su inactivación (6).

Estos 200 mutantes generados habían padecido inserciones en 126 genes diferentes, pudiendo clasificarse en seis clases:

1. Genes virulentos conocidos, como hialuronidasa, neuraminidasa, autolisina e IgA proteasa.
2. Genes implicados en vías metabólicas como la síntesis de purina, asimilación de fosfato, síntesis de glutamina y metabolismo anaerobio.
3. Genes codificantes de proteasas dependientes de ATP
4. Genes codificantes de transportadores ABC (ATP-binding-cassette)
5. Genes codificantes de proteínas implicadas en la recombinación y reparación del DNA, identificados anteriormente como esenciales en la supervivencia de *S. typhimurium* y *S. aureus*.
6. Genes de función desconocida.

Se realizó un estudio en el que se determinaba la expresión génica de *Streptococcus pneumoniae* a partir de la detección de sus RNAm.

Los RNAm se obtuvieron durante la fase invasiva del patógeno *in vivo*, a nivel sanguíneo y fluido cerebroespinal *in vitro*, a partir de bacterias adheridas a células epiteliales, permitiendo estudiar la expresión génica durante el desarrollo de bacteremia, meningitis y células epiteliales de contacto.

Los patrones de expresión que obtuvieron para cada condición fueron diferentes y únicos.

Los genes expresados fueron identificados como factores de virulencia, transportadores, factores de transcripción, proteínas implicadas en el metabolismo así como genes de función desconocida (7).

Otro estudio génico de *Streptococcus pneumoniae* basado en la técnica GAF (Genomic Array Footprinting) logra identificar genes fundamentales en el desarrollo de meningitis. El fundamento de la técnica es generar una librería de genes que incorporan un transposón. El DNA se aísla, se fragmenta y se transcribe a RNA con ayuda de una retrotranscriptasa (T7). A través de hibridación de estos fragmentos génicos en un microarray determinan qué genes aumentan o disminuyen su expresión durante la infección.

El experimento se llevó a cabo en conejos, a los que se les inoculó células de Sp mutadas directamente en la cisterna magna, obteniendo un modelo experimental de meningitis. Consiguieron identificar 82 genes esenciales para la replicación de Sp y 11 genes cuya disrupción por el transposón promovían el crecimiento bacteriano. Entre ellos, encontraron genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos, proteínas de unión y transportadores.

Uno de los genes identificados fue el correspondiente a flavodoxina (fld). Para contrastar el resultado obtenido en conejos, los autores del experimento inocularon de nuevo en la cisterna magna, esta vez de ratones, la misma proporción de células de Sp mutadas (delecionaron previamente el gen de estudio) y wt generando un modelo de infección competitivo. Por último, estos genes seleccionados se inocularon en ratones, de nuevo en la cisterna magna, pero esta vez de manera no competitiva, es decir, en algunos animales se inoculó el gen delecionado y en otros el wt.

El resultado obtenido para el gen de Fld fue el siguiente: observaron una disminución de la severidad de la infección en el caso de ratones que sólo poseían el gen delecionado (infección no competitiva) comparado con conejos y con la infección competitiva en ratones, por tanto, llegaron a la conclusión de que este gen era esencial para el crecimiento bacteriano y la progresión de la enfermedad. (8, 9)

Fld es una proteína que transfiere electrones durante las reacciones redox. Se sabe que es esencial en la descarboxilación de piruvato en el caso de *Helicobacter Pylori* y muestra sobreexpresión cuando la concentración de

hierro en el medio disminuye. En *E. Coli*, flavodoxina está implicada en la síntesis de metionina y en respuestas frente a estrés oxidativo. En el caso de *Sp* parece que flavodoxina está implicado en la síntesis de metionina.

1.3. Flavodoxina

Las flavodoxinas son esenciales en la supervivencia de diferentes tipos bacterianos como *Escherichia coli* (10, 11), *Salmonella entérica* (12), *Haemophilus influenzae* (13), *Vibrio cholerae*(14) y *Helicobacter pylori* (15).

En el caso de *Streptococcus pneumoniae* parece estar implicada en la síntesis de metionina, y su presencia y funcionalidad es esencial para la infectividad de la bacteria. Por ello, es necesario conocer cuáles son sus propiedades, conformación y composición aminoacídica para poder diseñar una terapia dirigida contra ella.

SpFld pertenece al grupo de flavodoxinas de cadena corta, así definidas por la falta de un bucle formado por 20 residuos que sí aparece en las flavodoxinas de cadena larga, como es el caso de *Helicobacter pylori*. La caracterización de ésta última se ha llevado a cabo de manera minuciosa, y su estudio ha facilitado el cribado de compuestos dirigidos contra ella. (1, 9, 15).

1.3.1. Propiedades espectroscópicas de *SpFld*

SpFld presenta dos conformaciones diferentes, la forma apo (sin co-factor) y la forma holo (unida a FMN). La forma holo, activa, es la que interesa a la hora de realizar el cribado de compuestos ya que es la que lleva a cabo la transferencia de electrones debido a la unión de su co-factor.

Su espectro de absorción en el UV-visible muestra dos picos de absorbancia a 371 y 456 nm y un máximo de absorbancia a 480 nm.

En el caso de la forma apo, muestra un máximo de absorbancia a 277 nm, siendo su coeficiente de extinción a esta longitud de onda de 7,2 mM⁻¹cm⁻¹.

En el caso de la forma holo, cuyo máximo de absorbancia se detecta a 456 nm, es de 9,1 mM⁻¹ cm⁻¹.

La forma holo, unida a co-factor, puede presentar tres estados de oxidación: forma oxidada, semiquinona o reducida dependiendo de la aceptación o cesión

de electrones a través de FMN. En la forma semiquinona, presenta un máximo de absorbancia a 592 nm, perdiéndose la señal en su estado reducido.

Referente al espectro de emisión de fluorescencia, la forma holo presenta los picos característicos correspondientes a la presencia de residuos de tirosina y presencia de co-factor, FMN. La forma apo, muestra un máximo de emisión a 310 nm.

Los resultados que obtuvieron los autores a través del estudio de la forma apo y holo mediante dicroísmo circular (UV-lejano) mostró una menor proporción de estructura secundaria para la forma apo comparada con la holo. En el UV-cercano, la forma apo se caracteriza por un pico de carácter negativo a 280 nm, indicando que al menos un residuo de tirosina se encuentra en una región de plegamiento proteico bien definida.

En el caso de la forma holo, en UV-cercano, apreciaron las contribuciones de la presencia de su co-factor, FMN. Su interacción fue representada por picos prominentes en la región del visible y longitudes de onda máximas.

Los resultados que obtuvieron a través de DC demostraron que tanto la forma apo como la holo presentan estructuras terciarias bien definidas en disolución.

(1)

1.3.2. Estudio de estabilidad de *SpFlid*

La estabilidad proteica se determina a partir de la red de interacciones intramoleculares entre los aminoácidos constituyentes e interacciones intramoleculares con otras moléculas (agua, iones, solutos, co-factores, y su cuantificación se realiza a través de la energía de Gibbs y una serie de parámetros asociados: temperatura de desplegamiento (T_m), entalpía ΔH y capacidad calorífica, ΔC_p .

A través de herramientas experimentales, como las curvas de desnaturalización térmica pudieron determinarse los factores mencionados, determinando la estabilidad proteica.

La temperatura de desplegamiento o T_m , hace referencia a la temperatura a la cual el 50% de la proteína se encuentra en estado plegado y el otro 50% en estado desplegado. El estado desplegado es un macroestado en el que conviven numerosos microestados conformacionales compatibles con la proteína totalmente desnaturalizada.

SpFId presenta dos estados predominantes en su equilibrio conformacional de desplegamiento: nativo y desplegado, sin intermediarios.

Los resultados que los autores obtienen referentes a la T_m de las formas apo y holo de SpFId fueron de $30,8 \pm 2$ y $44,6 \pm 0,2$ °C respectivamente. El aumento de la T_m en el caso de la forma holo es consistente con cualquier proteína que una un co-factor determinado ya que esta interacción aumenta la estabilidad proteica. Los valores de ΔH que obtuvieron fueron 41 ± 5 kcal/mol y 51 ± 1 kcal/mol, para apo y holo respectivamente.

Los estados de desnaturalización difieren entre flavodoxinas de cadena larga y corta, en el caso de *Helicobacter pylori* la forma apo presenta cuatro estados en el equilibrio de desplegamiento. El mayor número de estados de desnaturalización en el caso de flavodoxinas de cadena larga se debe al desplegamiento del bucle mencionado anteriormente.

La estabilidad de la forma apo de SpFId es mucho menor que en el caso de *Anabaena* ó *Hp*, las condiciones de pH y fuerza iónica fueron modificadas para conseguir una estabilidad mayor a baja temperatura que permitiera observar de manera adecuada la transición de desnaturalización.

Para el estudio de SpFId el pH fijado fue mucho más ácido y la composición iónica del buffer mucho mayor que en caso de flavodoxinas de cadena larga. Esta disminución de estabilidad de nuevo recae en la ausencia del bucle, además de la composición aminoacídica de SpFId. La disminución de estabilidad en el caso de ambos tipos de flavodoxina depende de la cantidad de cargas negativas que poseen sus aminoácidos (ácidos), por lo tanto una disminución de la carga negativa aumentaría la estabilidad de la proteína. (16)

1.3.3. Estudio de la interacción de flavodoxina y su co-factor, FMN

Para estudiar la interacción entre proteínas y ligandos utilizaron la técnica de ITC (isothermal titration calorimetry). Esta técnica permite obtener datos como la energía libre de Gibbs, la entalpía, entropía, estequiometría, constante de disociación... que definen la reacción.

Demuestran que la interacción entre SpFId-FMN se produce de manera exotérmica, con una entalpía favorable, $-9,7 \pm 0,1$, entropía desfavorable, $-\Delta S =$

1.9±0.3 y una $C_p = -0.5$ kcal/K/mol. La pérdida de entropía conformacional fue relacionada con la estructura del co-factor. FMN posee regiones hidrofóbicas (anillos de isoaloxazina) que no se sitúan en el interior del sitio activo, a diferencia de las regiones que contienen aminoácidos polares que sí lo hacen, situándose en el interior de éste dificultando su desolvatación. Esto se traduce en una pérdida de entropía de deshidratación, que junto con la pérdida de entropía conformacional y roto-translacional resultan en una pérdida global de entropía durante la interacción ($-T\Delta S > 0$).

La K_D obtenida a 25°C fue de 83 nM para SpFId, 27 nM para *Helicobacter* y 0,26 nM para *Anabaena*, considerando moderada la afinidad de SpFId por su co-factor. (16)

1.3.4. Estudio de las estructuras de la forma apo y holo de FId a través de rayos X

Para el estudio de posibles inhibidores de flavodoxina es necesario conocer su estructura de manera detallada. Para ello, los autores del ensayo (16) proceden a la cristalización y posterior estudio mediante rayos X de ambas conformaciones, la forma apo y la forma holo.

Obtuvieron una estructura típica de flavodoxinas, (α/β , 5 hélices alfa enfrentadas con 5 láminas betas). En flavodoxinas de cadena corta, observan una protuberancia situada en la 5ª lámina beta que se relaciona con la pérdida evolutiva del bucle contenido en flavodoxinas de cadena larga.

Analizando las dos conformaciones de SpFId, observan diferencias en los aminoácidos implicados en la unión del co-factor, FMN (aminoácidos 10-14, 57-66 y 92-100).

La conformación y dinamismo de los bucles implicados en la interacción con FMN están preservados evolutivamente.

Un dato característico obtenido a través de la unión de SpFId-FMN fue la interacción de residuos de tirosina (Y59-Y57 y Y95-F94) que parecen estar implicados en el aumento de estabilidad de la forma holo vs apo. (16)

1.4. SpFld: posible diana terapéutica

La expresión del gen de flavodoxina está implicado en el desarrollo de enfermedades infecciosas desencadenadas por el patógeno.

Aunque su función en el metabolismo bacteriano de *Streptococcus pneumoniae* no está del todo clarificada, parece estar implicada en la síntesis de metionina.

Los resultados obtenidos a través de su estudio (8) muestran que la expresión del gen de flavodoxina es esencial en la progresión de la enfermedad y que su inactivación reduce la infectividad e invasividad del patógeno en el organismo huésped.

Estos resultados son alentadores y promueven la búsqueda de posibles fármacos inhibidores de la proteína para erradicar enfermedades como neumonía, otitis media y meningitis.

Flavodoxinas pertenecientes a otros tipos bacterianos fueron escogidas como dianas terapéuticas, uno de los ejemplos más relevantes es la flavodoxina perteneciente a *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori es una bacteria gram negativa causante de infecciones a nivel de la mucosa gástrica pudiendo desencadenar la aparición de úlceras y cánceres estomacales.

El tratamiento actual, consiste en la administración de una bomba inhibidora de protones combinada con dos antibióticos (claritromicina y amoxicilina o metronidazol). Esta triple combinación terapéutica erradica al patógeno en un 70% de los casos.

La disminución de la eficacia de este tratamiento es causada por la resistencia de la bacteria a los antibióticos administrados, por ello es necesaria la búsqueda de nuevos fármacos dirigidos contra nuevas dianas terapéuticas que erradiquen por completo las enfermedades causadas por el patógeno.

Una de las dianas identificadas para erradicar a *Helicobacter pylori* fue su flavodoxina, implicada en la descarboxilación del piruvato, ruta metabólica esencial para la supervivencia de la bacteria.

Se demostró la eficacia de diversas moléculas contra esta proteína, las cuales promueven la muerte bacteriana al inhibir su función mediante unión al centro activo de su co-factor, FMN (17)

El diseño de moléculas análogas (modificación de residuos) a inhibidores de flavodoxina previamente descritos presentan en algunos de los casos mejores resultados que los originales (algunos actúan como bactericidas sin ser tóxicos para el organismo, ni afectar a la flora intestinal). (17)

SpFId podría ser, al igual que HpFId una diana terapéutica óptima para erradicar las enfermedades causadas por *Streptococcus pneumoniae*. (16, 17)

El conocimiento de su estructura, conformación, aminoácidos implicados en la unión de su co-factor, su estabilidad y función posibilita el diseño de fármacos que interaccionen con SpFId inhibiendo su función.

2. Objetivos

El principal objetivo de este trabajo es la identificación de un compuesto que inhiba la acción de una de las proteínas indispensables para la virulencia y supervivencia del patógeno, flavodoxina. (8)

Para poder realizar un cribado óptimo existen unos objetivos secundarios que deben cumplirse:

- Expresión y purificación de flavodoxina. La cantidad de proteína purificada debe ser suficiente para realizar el cribado de compuestos, posibles inhibidores de su función.
- Análisis de estabilidad proteica. Los parámetros que describen la forma estable de SpFId deben aproximarse a los obtenidos a través de los estudios anteriormente realizados (16).
- Optimización del cribado de compuestos.

3. Métodos

3.1. Expresión de SpFId en células BL21

Para la expresión de nuestra proteína se utiliza un plásmido transformado en la línea celular BL-21 DE3 de *E. Coli*, preservadas en glicerol.

El plásmido utilizado es Pmal C2X en el que se inserta la secuencia de nuestra proteína SpFId unida a un gen de unión a maltosa y a una cola de ocho histidinas. El constructo sería: MBP (maltose binding protein) - (His)₈ - Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro - SpFId.

La proteína de unión a maltosa (MBP) se utiliza para aumentar la solubilidad de proteínas recombinantes expresadas en *e. Coli*, así como para prevenir la agregación de la proteína de interés. También puede utilizarse para purificaciones a través de columnas de afinidad cuya matriz se compone de amilosa. En nuestro caso, no se emplea para realizar el proceso de purificación a través de cromatografía de afinidad, sino que es la cola de ocho histidinas que forma parte de nuestra proteína de fusión la que interacciona con el cobalto contenido en la matriz de las columnas de afinidad.

Nuestro constructo (proteína de fusión) contiene una secuencia aminoacídica contenida entre la cola de ocho histidinas y SpFId (Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro), utilizada como secuencia de reconocimiento de proteasas.

La proteasa utilizada en este trabajo (PreScission Proteasa) es una proteína de fusión modificada a través de ingeniería genética a partir de la proteasa humana rinovirus 3C y glutatión transferasa (GST). Su diseño permite su unión al glutatión contenido en columnas de afinidad (GE Healthcare Glutathione Sepharose 4B) eliminándola del eluido final que contendrá nuestra proteína de interés purificada, SpFId. El sitio de corte de esta proteasa se encuentra entre la glutamina y glicina de la secuencia de reconocimiento contenida en nuestro constructo (proteína de fusión).

Para realizar el pre-cultivo en placa se adicionan 100 μ l de las células BL21 transformadas, conservadas en glicerol al medio LB Agar (2,35 g Plate Count Agar, 100 ml agua destilada) contenido en placas de Petri. Este medio de cultivo contiene una concentración de 100 μ g/ml de ampicilina, antibiótico utilizado para la selección positiva de células transformadas, a través del gen de resistencia a ampicilina contenido en nuestro plásmido (Pmal C2X).

Las placas se introducen en la estufa durante toda la noche a 37°C.

Se realiza un pre-cultivo: las colonias se recogen con asa de siembra y se inoculan en medio LB (10g/l triptona, 5g/l de extracto de levadura, 5g/l NaCl, pH=7) que contiene ampicilina (100 μ g/ml). Se incuban a 37°C, 200 r.p.m durante 4 horas (Barnstead Lab-Line MaxQ500 Orbital Shaker).

Para el cultivo a gran escala, se adicionan 10 ml de pre-cultivo por cada litro de medio 2XY-T (16 g/l triptona, 10 g/l de extracto de levadura , 5 g/l de NaCl,pH=7) y 1 ml de Ampicilina (Stock: 100 μ g/ ml) y vuelve a introducirse en el incubador móvil (Barnstead Lab-Line MaxQ500 Orbital Shaker), 37°C, 180 r.p.m. La adición de 1 ml (0,5 mM ó 1 mM) de isopropil 1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) por cada litro de cultivo, se realiza cuando las células se encuentran en fase de crecimiento exponencial , es decir, cuando su densidad óptica (OD) medida a una longitud de onda correspondiente a 600 nm alcance valores de absorbancia comprendidos entre 0,6-1. La medida de absorbancia se realiza a diferentes tiempos, hasta alcanzar el valor óptimo. (Amersham Biosciences Ultrospec 6300 Pro Spectrophotometer).

Una vez adicionado el inductor de crecimiento celular, el cultivo se mantiene durante toda la noche a 20°C, 170 r.p.m (Barnstead Lab-Line MaxQ500 Orbital Shaker).

El cultivo se deposita y equilibra en tubos de centrifuga. Se centrifugan (Beckman Coulter Centrifuge JA-10) durante 15', 6.000 r.p.m., 4°C.

Se deshecha el sobrenadante y se resuspende el pellet obtenido en tampón de extracción, 3 veces el volumen del pellet (20 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 10mM imidazol, punta de espátula de FMN, 1 mg/ml lisozima, 500 μ l de inhibidores de proteasa, pH=7,4).

Se procede a su sonicación (Sonics Vibra-Cell Ultrasonic Liquid Processor), 10 ciclos de 30" alternados con 30" de descanso, al 70% de potencia y 0,5 de pulso.

Este lisado celular es sometido a centrifugación, 22.000 rpm, 30', 4°C, dos veces (Beckman Coulter Centrifuge JA-25.50).

Una vez se ha llevado a cabo estas dos centrifugaciones se obtiene el extracto crudo, se recoge una alícuota y el resto se filtra con ayuda de filtros de 45 µm de diámetro.

3.2. Purificación de SpFld

La obtención de SpFld se realiza mediante diferentes cromatografías. En primer lugar es necesaria la realización de una cromatografía de afinidad que permitirá obtener nuestra proteína de fusión (MBP-His₈-Fld) por unión de la cola de histidinas a cationes cobalto; en segundo lugar, tras tratamiento con proteasa para eliminar la etiqueta (MBP-His₈) se realiza una cromatografía de afinidad en serie utilizando las columnas de afinidad por histidinas y una segunda columna que permite eliminar los restos de proteasa de la muestra; por último, la obtención de SpFld libre de impurezas se realiza en una columna de filtración en gel, a partir de la cual, obtenemos SpFld en función de su peso molecular.

3.2.1. Cromatografía de afinidad

El extracto crudo obtenido se hace pasar a través de la columna de afinidad (GE-Healthcare Life Sciences HiTrap TALON Column), cuya matriz está compuesta por cationes cobalto que permitirán la unión de la cola de histidinas de nuestra proteína. Las columnas se conectan al AKTA (Amersham Bioscience AKTA FPLC System) y se equilibran en tampón de unión (20 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH=7,4), a continuación cargamos el extracto crudo y por último inyectamos el tampón de extracción (20 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, 10mM imidazol, punta de espátula de FMN, 1 mg/ml lisozima, 500 µl de inhibidores de proteasa, pH=7,4).

Las fracciones obtenidas se someten a tres diálisis de dos horas cada una en tampón de diálisis (25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH=7,5) para eliminar el exceso de imidazol.

Tras la diálisis se procede a filtrar la proteína y se cuantifica mediante Bradford para adicionar la cantidad necesaria de proteasa (1mg/10mg proteína). Se adiciona la proteasa que eliminará la etiqueta de nuestra proteína de fusión, a través del corte en la secuencia de reconocimiento como se indica a continuación,



y se deja incubar en hielo durante toda la noche.

Para eliminar los restos de proteasa (PreScission Protease) de la muestra, se hace pasar por columnas de afinidad cuya matriz contiene glutatión (GE Healthcare Glutathione Sepharose 4B) quedando retenida en la columna.

Para eliminar la etiqueta de nuestra proteína (MBP – (His)₈) y obtener únicamente SpFId , vuelve a inyectarse la muestra en la columna de afinidad a cobalto (GE-Healthcare Life Sciences HiTrap TALON Column). Las columnas conectadas en serio se equilibran con 3 volúmenes de columna de tampón de diálisis (25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH=7,5), se carga la muestra y se recogen las fracciones eluidas que contienen nuestra proteína de interés.

3.2.2. Cromatografía de filtración en gel

Antes de proceder al último paso de la purificación la proteína se concentra (Millipore Amicon Centrifugar Filter, cut-off 10 kDa).

Se realizan dos lavados con agua Milli-Q a 4.000 rpm, durante 10 minutos a 4°C y dos lavados con tampón de diálisis (25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH=7,5), a 4.000 rpm, durante 10 minutos a 4°C.

Es necesario filtrar nuestra proteína concentrada (filtros 0,20 µm) antes de inyectarla en la columna de exclusión molecular (HiLoadSuperdex 75 pg).

La columna se equilibra con tampón de diálisis (25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH=7,5), a continuación se inyecta nuestra proteína y se recogen las fracciones pertinentes.

La proteína se concentra (Millipore Amicon Centrifugar Filter, cut-off 10 kDa) y dializa (100 mM MES, 150 mM NaCl, pH= 6,5).

Las alícuotas se cuantifican (GE Healthcare Life Sciences Nanovue). Spectrophotometer) empleando su coeficiente de extinción $\epsilon_{456} = 9130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y se conservan en nitrógeno líquido, -80°C

3.3. Análisis cuantitativo de expresión y purificación de SpFld

Para evidenciar la presencia de SpFld tanto a nivel de expresión como en la primera fase de purificación se realizan dos geles electroforéticos.

Para la prueba de expresión se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (4 ml agua, 3,34 μl Acrilamida 40%, 50 μl SDS 20%, 100 μl APS 10%, 10 μl TEMED) y para la purificación al 15% (2,34 μl agua, Acrilamida 30%, 5 ml Tris 1,5 M pH=8,8, 2,5 ml, SDS 20%, 50 μl , APS 100 μl , Temed 10 μl). El gel apilador al 4% es el mismo en ambos geles (3,63 ml agua, 667 μl Acrilamida 40%, 625 μl Tris 1M pH= 6,8, 25 μl SDS 20%, 50 μl APS 10% 5 μl TEMED).

Todas las muestras a inyectar en los geles electroforéticos se preparan de la misma manera: se toman 5 μl de muestra a la que se le adiciona 10 μl de Tris 10mM pH=8,8 y 5 μl de tampón LAEMLI . A continuación, se colocan en el baño térmico durante 5 minutos a 98°C . Se centrifugan las muestras durante 10 minutos a 14.000 rpm y se cargan 5 μl en cada pocillo del gel.

La electroforesis se realiza a 120 V los primeros 20 minutos. Transcurrido este tiempo se aumenta el voltaje hasta 150 V.

3.4. Optimización del cribado de compuestos: curvas de desnaturalización térmica

Existen diferentes metodologías en el cribado de quimiotecas. El diseño del ensayo puede realizarse basándose en la actividad o funcionalidad proteica (actividad hidrolítica, quinasa, transferencia de electrones...) ó en propiedades generales de la proteína, como la medida de su estabilidad frente a desnaturalización térmica inducida por un ligado.

En nuestro caso, la metodología escogida es la indicada en segundo lugar. Para ello, se realiza la desnaturalización térmica de SpFId (proteína diana) en presencia y ausencia de los compuestos que componen nuestra quimioteca, seleccionando aquellos que aumenten su estabilidad (medida como T_m), *hits*.

Las condiciones experimentales del ensayo de cribado se establecen en base a la información disponible de SpFId (T_m). La optimización del ensayo referente a la concentración de proteína necesaria y concentración de DMSO soportada por SpFId se determinan a través de ensayos de desnaturalización térmica inducida por ligando (thermal-shift assay ó differentil scanning fluorimetry).

Los compuestos de nuestra quimioteca se encuentran inmersos en DMSO, disolvente hidrofóbico que podría afectar a la conformación de nuestra proteína alterando los resultados del análisis, por ello es necesario realizar ensayos en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de DMSO para determinar el grado de afectación sobre la estabilidad de SpFId.

La desnaturalización térmica se monitoriza en Stratagene Mx3005P qPCR real-time (Agilent Technologies). Para realizar el ensayo se selecciona una curva de desnaturalización térmica que permitirá, a través de la medida de fluorescencia, conocer la T_m de nuestra proteína. El ensayo se inicia cuando las muestras se encuentran a 25°C para a continuación, aumentar la temperatura 1°C con cada ciclo. La medida de fluorescencia se mide al final de cada ciclo.

Existen compuestos fluorescentes que pueden adicionarse a las muestras en el caso de que éstas no posean fluorescencia intrínseca o el aparato no permita su detección por el rango de longitudes de onda de emisión. Uno de los

fluoróforos más utilizados es Sypro Orange, cuya longitud de onda de emisión/excitación es de 450/570 nm respectivamente.

En nuestro caso, holo-SpFId unida a FMN posee fluorescencia intrínseca a causa del co-factor, emitiendo fluorescencia a 530 nm por lo que no es necesario adicionar un fluoróforo externo. El filtro seleccionado para su detección es FAM (excitación a 492 nm/ emisión a 516 nm).

Para analizar la influencia de DMSO en SpFId se llevan a cabo ensayos a diferentes concentraciones de éste, 2%, 5% y 10% por cuadruplicado. Además, se realizan ensayos en presencia de FMN adicional para analizar un posible aumento de estabilidad proteica.

En ensayo se realiza en una placa de 96 pocillos. La distribución de las muestras se detalla a continuación (Tabla 1).

	5	6	7	8
a A	5,67 µl holo + 394 µl de buffer	5,67 µl holo + 394 µl de buffer	5,67 µl holo + 394 µl de buffer	5,67 µl holo + 394 µl de buffer
b B	5,67 µl holo + 0,232 µl de FMN (10 µM + 394 µl de buffer)	5,67 µl holo + 0,232 µl de FMN (10 µM + 394 µl de buffer)	5,67 µl holo + 0,232 µl de FMN (10 µM + 394 µl de buffer)	5,67 µl holo + 0,232 µl de FMN (10 µM + 394 µl de buffer)
c C	5,67 µl holo + 2 µl DMSO (2%) + 394 µl de buffer	5,67 µl holo + 2 µl DMSO (2%) + 394 µl de buffer	5,67 µl holo + 2 µl DMSO (2%) + 394 µl de buffer	5,67 µl holo + 2 µl DMSO (2%) + 394 µl de buffer
d D	5,67 µl holo + 5 µl DMSO (5%) + 394 µl de buffer	5,67 µl holo + 5 µl DMSO (5%) + 394 µl de buffer	5,67 µl holo + 5 µl DMSO (5%) + 394 µl de buffer	5,67 µl holo + 5 µl DMSO (5%) + 394 µl de buffer
e E	5,67 µl holo + 10 µl DMSO (10%) + 394 µl de buffer	5,67 µl holo + 10 µl DMSO (10%) + 394 µl de buffer	5,67 µl holo + 10 µl DMSO (10%) + 394 µl de buffer	5,67 µl holo + 10 µl DMSO (10%) + 394 µl de buffer

Tabla 1. Distribución muestras en placa de 96 pocillos. Fila A: se corresponden con los controles. Fila B: se corresponden con las muestras a las que se les ha adicionado FMN externo. Fila C: se corresponde con las muestras que poseen una concentración 2%DMSO, Fila D: 5% DMSO y Fila E: 10% DMSO. (Buffer: 100 mM MES, 150 mM NaCl, pH= 6,5)

3.5. Ensayo de desnaturalización térmica de *SpFld* frente a los compuestos de estudio: selección de compuestos

Nuestra quimioteca se compone de 1120 compuestos distribuidos en placas de 96 pocillos (Prestwick).

El ensayo se realiza adicionando únicamente un compuesto por pocillo y los controles correspondientes.

La concentración final de proteína en las muestras control es de 1 μ M (diluidas en 100 mM MES, 150 mM NaCl, pH= 6,5), y 2,5% DMSO. Las pocillos que contienen las muestras de estudio contienen una concentración final de proteína de 1 μ M (diluidas en 100 mM MES, 150 mM NaCl, pH= 6,5), y 2,5 μ M de compuesto (el porcentaje de DMSO será del 2,5% ya que los compuestos se conservan en 100% DMSO).

El ensayo se realiza llevando a cabo el mismo procedimiento utilizado para la optimización de muestras.

3.6. Estudio de la interacción entre *SpFld* y los compuestos seleccionados: ITC (Isothermal Titration Calorimetry)

La interacción entre los compuestos y *SpFld* se caracteriza con MicroCal AutoITC200 calorimeter (MicroCal, GE Healthcare Life Sciences).

A través de este ensayo de titulación pueden determinarse parámetros que afectan a la energía libre de Gibbs, tales como entalpía, entropía y estequiometría así como determinar cuál es la constante de disociación que determinará el grado de afinidad de un determinado compuesto por *SpFld*.

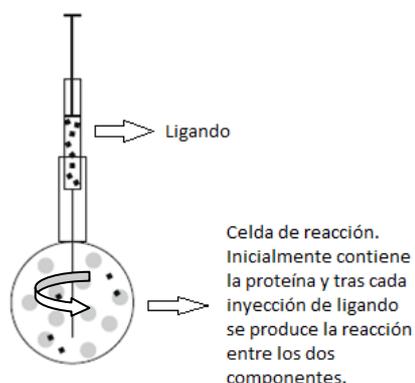
Para ello, las muestras de proteína y ligando se preparan a partir de sus stocks correspondientes, siendo la concentración final de proteína utilizada para el ensayo de 10 μ M y 150 μ M de ligando en tampón 100 mM MES, 150 mM NaCl, pH= 6,5, quedando un 1% de DMSO residual.

	Proteína	Ligando	Blanco
Proteína	47 μl (282 μl para 6 muestras)	-	-
Ligando	-	1 μl (6 μl para 6 muestras)	-
Blanco	353 μl (2118 μl para 6 muestras)	150 μl (900 μl para 6 muestras)	400 μl (2400 μl para 6 muestras)
DMSO	2,7 μl (16,2 μl para 6 muestras)	-	2,7 μl (16,2 μl para 6 muestras)

Tabla 2. Composición de muestras para análisis de interacción mediante ITC.

Para el análisis de la muestra a través de ITC se deposita la disolución de proteína en la celda calorimétrica y la disolución de ligando en la jeringa de inyección. La temperatura se mantiene constante durante los dos ensayos a 15 y 25°C respectivamente. Se realizan 19 inyecciones de ligando (2 μl cada una) sobre la disolución de proteína (200 μl) de manera secuencial, alcanzando un volumen final de inyección de 38 μl .

Las concentraciones empleadas para el ensayo (10 μM de proteína, 150 μM de ligando) y los volúmenes (200 μl de disolución de proteína y 38 μl de disolución de ligando) garantizan un nivel de saturación proteica razonablemente elevado. El efecto calorífico asociado a cada inyección de ligando, puede determinarse a partir del termograma obtenido tras la realización del ensayo. El valor obtenido se debe a la formación del complejo proteína-ligando y a otras contribuciones inespecíficas (inyección, mezcla de disoluciones...).



Esquema 1. Se detallan las partes que componen el aparato. En la parte superior se encuentra la jeringa que contiene el ligando y en la parte posterior se indica la celda de reacción donde se producen las inyecciones de ligando para que se produzca la reacción de interacción con la proteína contenida en su interior.

3.7. Análisis de datos

Los datos son analizados con ayuda del software Origin 8 (OriginLab).

3.7.1. Obtención de curvas de desnaturalización térmica a partir de la detección de fluorescencia. Cálculo de T_m .

La fluorescencia emitida y detectada depende del estado conformacional en el que se encuentre la proteína. En este caso, presenta dos estados conformacionales, estado nativo (N) o desplegado (U). El grado de fluorescencia dependerá de la fracción molar de cada uno de los dos estados siguiendo la siguiente ecuación (Ec.1):

$$S(T) = S_N(T)X_N(T) + S_U(T)X_U(T) \quad (1)$$

S_N y S_U se refiere a la intensidad de fluorescencia emitida en función del estado de la proteína, plegada o desplegada y X_n y X_u hace referencia a la proporción de proteína plegada (nativa) o desplegada a una determinada temperatura.

A partir de las fracciones molares puede definirse la constante de equilibrio existente entre ambas conformaciones (Ec.2), y por consiguiente puede conocerse la energía libre de Gibbs para cada estado (plegado/desplegado), (Ec.3)

$$K(T) = \frac{X_u(T)}{X_n(T)} \quad (2) \quad \Delta G(T) = -RT \ln K(T) \quad (3)$$

ΔG depende de la temperatura y ésta determina el estado conformacional en el que se encuentra la proteína, a elevadas temperaturas predominará el estado desplegado, $\Delta G < 0$ y a bajas temperaturas el estado nativo, $\Delta G > 0$. La temperatura a la cual ΔG se equilibra viene determinada por la siguiente ecuación, (Ec.4)

$$\Delta G = \Delta H(T_m) (1 - T/T_m) + \Delta C_p (T - T_m - T \ln T/T_m) \quad (4)$$

Siendo T_m la temperatura en la que los dos estados se encuentran poblados de igual manera, es decir, la proteína se encuentra 50% en estado nativo/50% en estado desplegado, ΔH es la entalpía y ΔC_p la capacidad calorífica. A partir

de la obtención de estos datos se obtiene una gráfica ΔG vs T que representa la curva de desnaturalización proteica por una regresión no lineal.

En nuestro caso, debido a la inviabilidad del estudio detallado nos centramos en la obtención de un único parámetro, la T_m a través de las curvas de desnaturalización térmica obtenidas.

Los *hits* ó compuestos positivos de cada ensayo serán aquellos que eleven la T_m de la proteína por encima de un valor umbral, definido como el valor medio de la T_m de los controles negativos (proteína sin compuesto) más dos veces su desviación estándar (SV).

Uno de los procedimientos más utilizados, por su robustez y rapidez, es calcular la T_m localizando el punto de inflexión ó punto de máxima pendiente de la curva de desplegamiento. El valor obtenido no es exactamente el correspondiente a la T_m , pero es un buen método estimatorio ya que el resultado no suele diferir del valor real en más de un 1°C .

3.7.2. Análisis de parámetros que caracterizan la interacción proteína-ligando: ITC

La obtención de parámetros que definen la interacción entre proteína-ligando se realiza partiendo de la siguiente reacción (Rx.5)



Asumiendo que la estequiometría es 1:1, es decir, sólo una molécula de ligando (L) puede unirse a una molécula de proteína (P), formando el complejo proteína-ligando (PL), podemos calcular la constante de asociación a partir de la siguiente ecuación, (Ec.6):

$$K_a = \frac{[PL]}{[P][L]} \quad (6)$$

La concentración de proteína y ligando tras cada inyección puede calcularse a partir de las siguientes ecuaciones, (Ec.7)

$$[P]_{T,i} = [P]_0 (1-v/V_0)^i$$
$$[L]_{T,i} = [L]_0 (1-(1-v/V_0)^i) \quad (8)$$

Los parámetros $[P]_0$, $[L]_0$, v y V_0 son datos conocidos, correspondiendo a la concentración inicial de proteína en la celda calorimétrica, ligando en la jeringa de inyección, volumen de inyección y volumen de la celda calorimétrica.

Aplicando la Ec.6, se obtienen las siguientes ecuaciones que permitirán determinar la concentración de ligando libre, proteína y complejo tras cada inyección, (Ec.9),

$$[P]_{T,i} = [P]_i + K_a [P]_i [L]_i \quad [L]_{T,i} = [L]_i + K_a [P]_i [L]_i \quad (9)$$

La resolución de estas ecuaciones permite determinar la concentración de ligando libre, proteína libre y complejo proteína-ligando después de cada inyección.

El calor, q_i , asociado con cada cambio de estado tras cada inyección, el cual es proporcional al incremento en la concentración de complejo en la célula de reacción tras la inyección i , se define por la siguiente ecuación, (Ec.10)

$$q_i = V_0 \Delta H ([PL]_i - [PL]_{i-1} (1-v/V_0)) \quad (10)$$

siendo ΔH es la entalpía de interacción y $[PL]_i$ la concentración de complejo formado tras cada inyección.

A través de un ajuste no lineal de los datos obtenidos podemos calcular la afinidad de la interacción (K_a), la entalpía ΔH y la estequiometría, n .

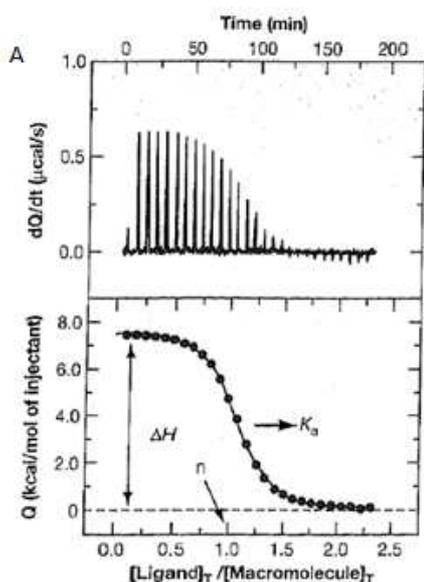


Figura 1. Representación gráfica de resultados obtenidos por ITC. La parte superior representa el calor asociado a cada inyección y la parte inferior representa el ajuste no lineal a partir del cual se obtiene K_a , ΔH y n .

4. Resultados

4.1. Expresión de SpFId en células BL21

La detección de expresión de SpFId en células BL21 es el primer dato que debe constatarse.

Para demostrar la expresión de nuestra proteína se toman alícuotas del pre-cultivo (medio LB, 10g/l triptona, 5g/l de extracto de levadura, 5g/l NaCl, pH=7) y cultivo a gran escala (medio 2XY-T, 16 g/l triptona, 10 g/l de extracto de levadura , 5 g/l de NaCl,pH=7) a diferentes tiempos y bajo diferentes condiciones.

Se utiliza el marcador de peso molecular LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GEHealthcare) cuyas bandas se corresponden con 97, 45 y 30 kDa respectivamente.

Nuestra proteína de fusión posee un peso molecular de 57,8 kDa por lo que debemos apreciar una banda situada entre los 97 y 45 kDa correspondientes al marcador (bandas recuadradas en figura 2).

Cuando la densidad óptica (OD) medida a 600 nm (Amersham Biosciences Ultrospec 6300 Spectrophotometer) alcanza los valores de absorbancia correspondientes (0,6-1), las células se encuentran en la fase exponencial de crecimiento y es el momento indicado para inyectar el inductor, IPTG.

A continuación se muestra el gel electroforético realizado para demostrar la presencia de SpFId (proteína de fusión),

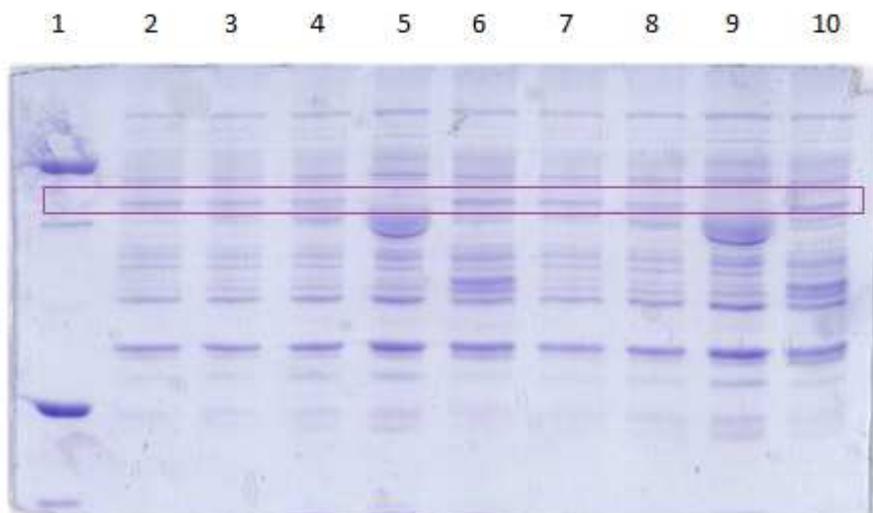


Figura 2. Gel poliacrilamida al 12%. 1. Marcador peso molecular (LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GEHealthcare)) (97/45/30 kDa), 2. BL21-SpFId t=0, 0,5 mM IPTG, 3. BL21-SpFId t=2 horas, 0,5 mM IPTG, 4. BL21-SpFId t=4 horas, 0,5 mM IPTG, 5. BL21-SpFId t=16 horas, 0,5 mM IPTG, 6. BL21-SpFId t=16 horas, 0 mM IPTG, 7. BL21-SpFId t=2 horas, 1 mM IPTG, 8. BL21-SpFId t=4 horas, 1 mM IPTG, 9. BL21-SpFId t=16 horas, 1 mM IPTG, 10. BL21-SpFId t=16 horas, 0 mM IPTG. Se recuadra las bandas correspondientes al peso molecular de nuestra proteína MBP-His8-FId, 57,8 kDa.

Visualizando el gel podemos concluir que a medida que el tiempo transcurre y a mayores concentraciones de inductor las bandas son más evidentes. En el caso de los carriles 5 y 9 (tiempo de inducción 16 horas, 0,5 mM IPTG y tiempo de inducción 16 horas, 1 mM IPTG respectivamente) parece que la banda correspondiente a SpFId se ha desplazado en el gel aumentando su peso molecular. Podría ser consecuencia de la formación de agregados proteicos.

4.2. Purificación de SpFId

Tras la expresión de SpFId (obtención del extracto crudo) y su detección en el gel, se procede a su purificación a través de columnas de afinidad. El primer paso se realiza a través de la columna de afinidad cuya matriz contiene cationes cobalto para obtener nuestra proteína de fusión (57,8 kDa) a través de interacciones iónicas con la cola de 8 histidinas que contiene la etiqueta proteica, a continuación se somete a cromatografía de afinidad en serie (las

columnas de cobalto y glutatión se conectan entre ellas) y se realiza el seguimiento del proceso a través del software UNICORN control (GE Healthcare Life Science).

4.2.1. Análisis cuantitativo y cualitativo tras columna de afinidad

Para constatar la presencia de nuestra proteína se toman muestras del extracto crudo, obtenido tras el crecimiento celular y sobre-expresión proteica, del lavado de la columna de afinidad (20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH=7,4) y de las fracciones eluidas tras la inyección del tampón de extracción (20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 10mM imidazol, punta de espátula de FMN, 1 mg/ml lizozima, 500 μl de inhibidores de proteasa, pH=7,4) y a tiempo 0 al adicionar la proteasa para que proceda al corte de la etiqueta. El proceso se lleva a cabo en gradiente de imidazol monitorizado (Amersham Bioscience AKTA FPLC System , UNICORN control software GE Healthcare Life Science) para seguir el proceso de purificación.

A continuación se muestra el gel obtenido, (Figura 3) y el cromatograma (UNICORN control software GE Healthcare Life Science), (Figura 4).

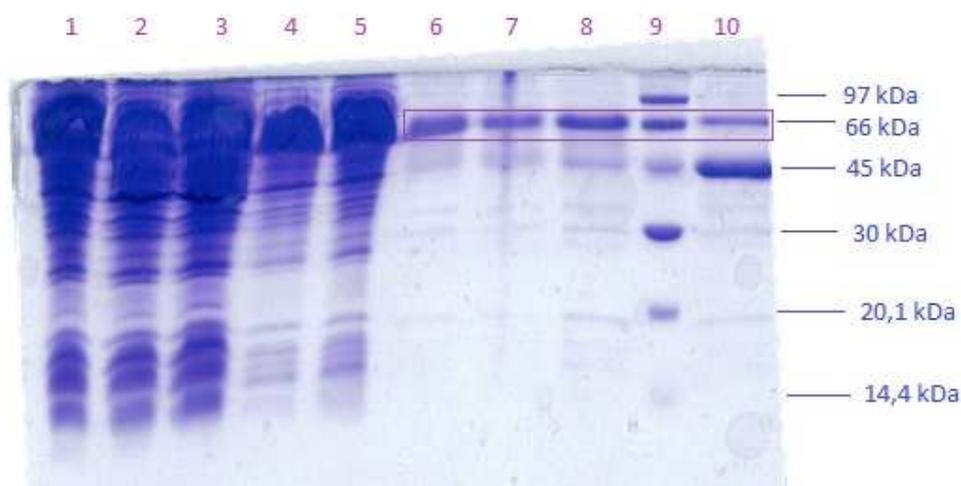


Figura 3. Gel poliacrilamida 15%. 1. Extracto crudo, 2. Extracto crudo, 3. Extracto crudo, 4. Carga de extracto crudo en primera columna de afinidad de cobalto (HiTrap Talon) y lavado (20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 10mM imidazol, pH=7,4), 5. Paso de extracto crudo por la segunda columna de afinidad (HiTrap Talon) y lavado (20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 10mM imidazol, pH=7,4), 6. Elución (20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH=7,4) tras paso por primera columna de afinidad (HiTrap Talon), 7. Elución tras paso segunda columna de afinidad (HiTrap Talon), 8. Tras diálisis para eliminar exceso de imidazol (25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH=7,5), 9. Marcador de peso molecular, 10. MBP-His8-Fld + proteasa a t=0.

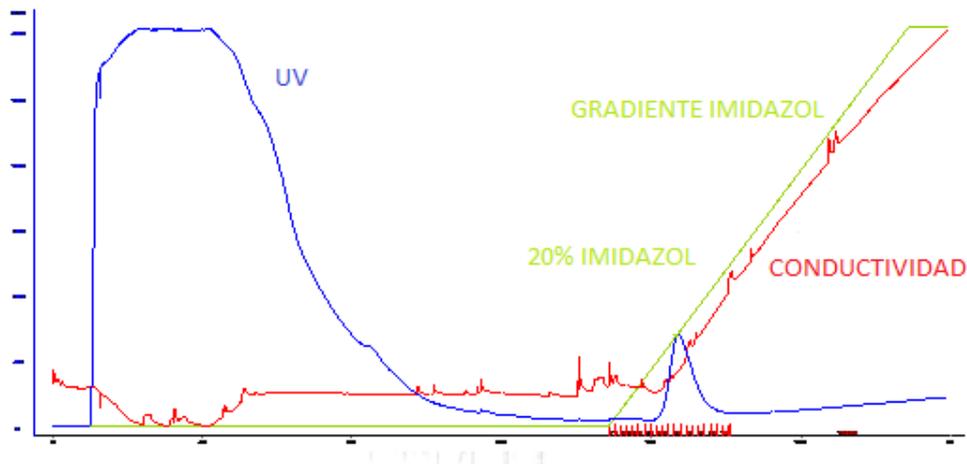


Figura 4. Cromatograma obtenido para cromatografía de afinidad. (GE-Healthcare Life Sciences HiTrap TALON Column) a través de su monitorización y seguimiento (UNICORN control software GE Healthcare Life Science)

Observando los carriles 1,2 y 3 referentes al extracto crudo no se pueden distinguir bandas ya que esta muestra posee una elevada cantidad de proteínas, no sólo SpFId, sino procedentes de *e.Coli*. Tras realizar la carga del extracto en la columna previamente equilibrada (20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 10mM imidazol, pH=7,4) las fracciones obtenidas siguen conteniendo elevada proporción de proteínas por lo que la visualización correspondiente a SpFId todavía no se evidencia (carriles 4 y 5). La identificación de la banda (recuadro en figura 3) correspondiente a SpFId es posible en los carriles 6, 7, 8 y 10 siendo las fracciones obtenidas tras inyectar el tampón de elución (20 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH=7,4).

En el cromatograma (figura 4) aparece el pico correspondiente a SpFId, dado por la fluorescencia emitida por su co-factor, FMN. Gracias a la monitorización del proceso podemos conocer qué porcentaje de imidazol es necesario para que la proteína eluya de la columna, siendo su valor del 20%.

4.2.2. Análisis cualitativo y cuantitativo tras columna de filtración en gel, última fase de purificación

Para detectar la presencia de SpFId tras la última fase de purificación, correspondiente a la cromatografía de filtración en gel se obtiene el cromatograma (Figura 5) a través del uso de AKTA y el software asociado

(Amersham Bioscience AKTA FPLC System , UNICORN control software GE Healthcare Life Science).

El seguimiento del proceso permite conocer en qué fracciones eluidas se encuentra SpFId, a través de la medida de absorbancia correspondiente a

SpFId ($\epsilon_{456 \text{ nm}} = 9130 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y detectar si está presente en el eluido.

.A continuación, se presenta el cromatograma obtenido, (Figura 5).

Unidades de absorbancia

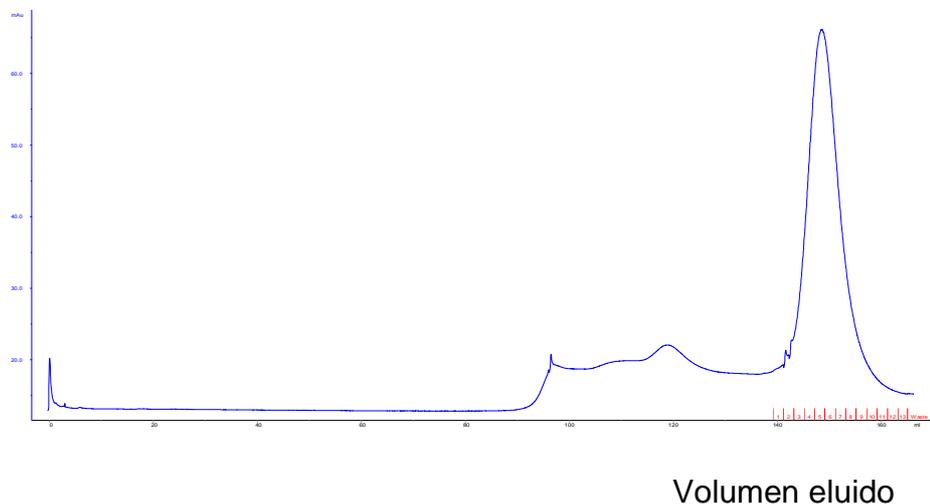


Figura 5. Cromatograma final purificación de SpFId tras columna de filtración en gel (HiLoadSuperdex 75 pg)

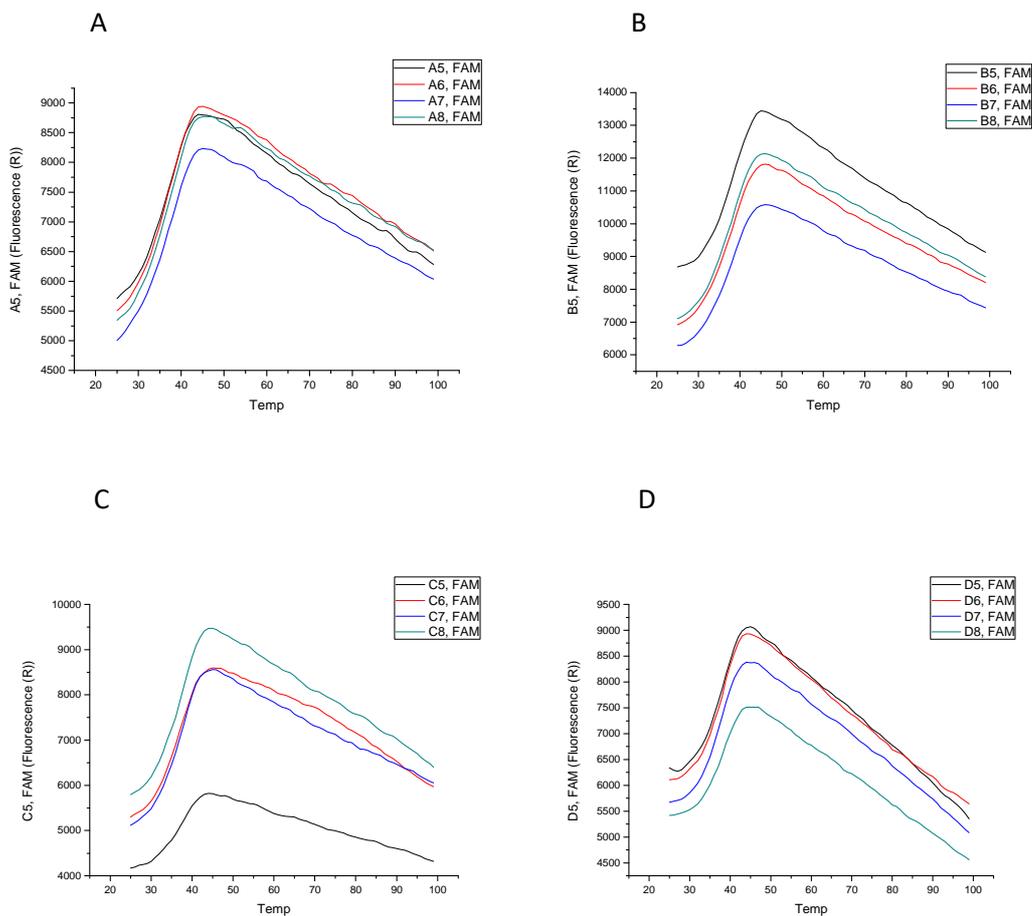
Los picos observados antes de la elución de SpFId pueden pertenecer a restos de proteasa o restos de otras proteínas en la muestra.

En este caso no pudo analizarse el resultado mediante SDS-Page (no aparecían bandas claras).

4.3. Optimización del cribado de compuestos

Como ya se ha mencionado en el apartado de Materiales, nuestros compuestos se encuentran inmersos en DMSO, por ello es necesaria la optimización de muestras, es decir, determinar si la presencia de DMSO afecta a la estabilidad proteica.

A continuación, se presentan las curvas de desnaturalización obtenidas (Stratagene Mx3005P qPCR real-time, Agilent Technologies) tras el análisis de datos (Origin 8), (Figura 6^a), B), C), D) y E) y una tabla que recoge los valores obtenidos de T_m a partir de las curvas.



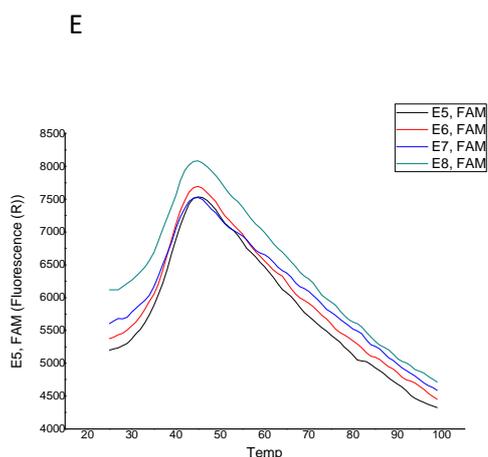


Figura 7. A) y B) Controles (2 μ M proteína, 100 mM MES, 150 mM NaCl, pH=6,5, B) 2 μ M proteína, 10 μ M FMN, 100 mM MES, 150 mM NaCl, pH=6,5, C) 2 μ M proteína, 2%DMSO, 100 mM MES, 150 mM NaCl, pH=6,5, D) 2 μ M proteína, 5%DMSO, 100 mM MES, 150 mM NaCl, pH=6,5, E) 2 μ M proteína, 10%DMSO, 100 mM MES, 150 mM NaCl, pH=6,5,

Tabla 3. Resultados optimización de muestras

CONTROLES		FMN		DMSO					
Pocillo	Tm	Pocillo	Tm	2%	5%	10%			
A5	37	B5	38	C5	37	D5	38	E5	39
A6	36	B6	39	C6	38	D6	39	E6	39
A7	39	B7	38	C7	37	D7	37	E7	39
A8	38	B8	39	C8	38	D8	38	E8	40

Analizando los resultados contenidos en la tabla, podemos afirmar que la presencia de DMSO no afecta a la estabilidad proteica, ya que los valores obtenidos de Tm no son significativamente diferentes comparados con los controles y con los valores obtenidos en el caso de presencia de co-factor (para observar aumento de estabilidad en presencia de co-factor la concentración de FMN debe ser mayor a la adicionada para realizar el experimento).

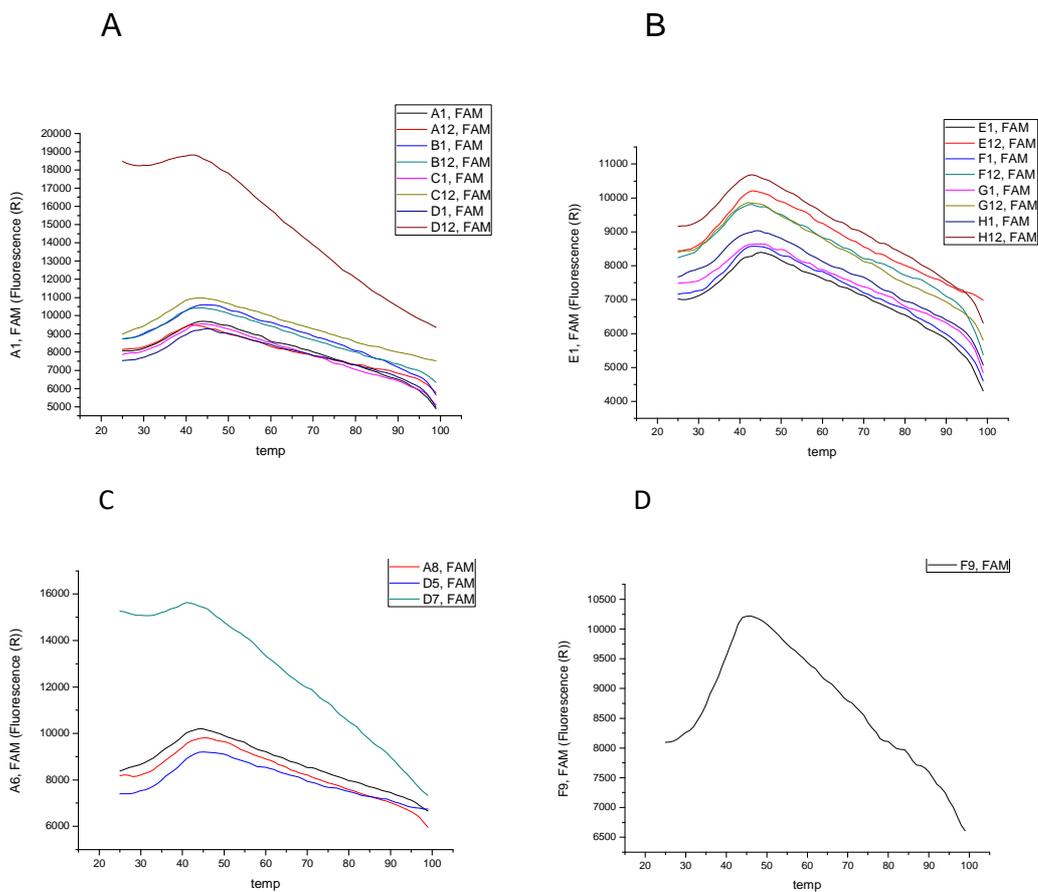
4.4. Análisis de curvas de desnaturalización térmica: selección de compuestos que aumenten la estabilidad proteica (T_m)

Tras optimizar las muestras para su estudio, se decide utilizar una concentración final de proteína de 1 μ M y 2,5% de DMSO.

A continuación, se representan las curvas de desnaturalización térmica obtenidas para cada una de las 14 placas.

Únicamente se muestran las gráficas correspondientes a los compuestos que aumentan la T_m de SpF1d dos veces su desviación estándar (2*SD) y que serán seleccionados para posteriores análisis.

- Placa 1



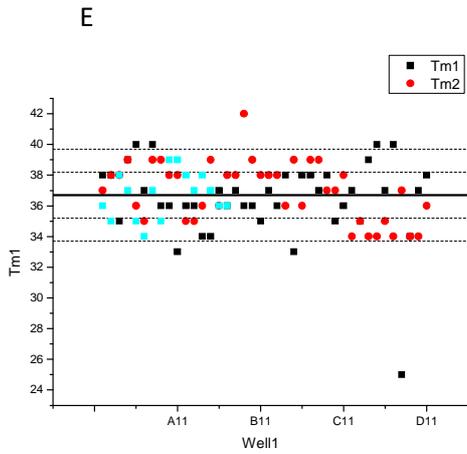
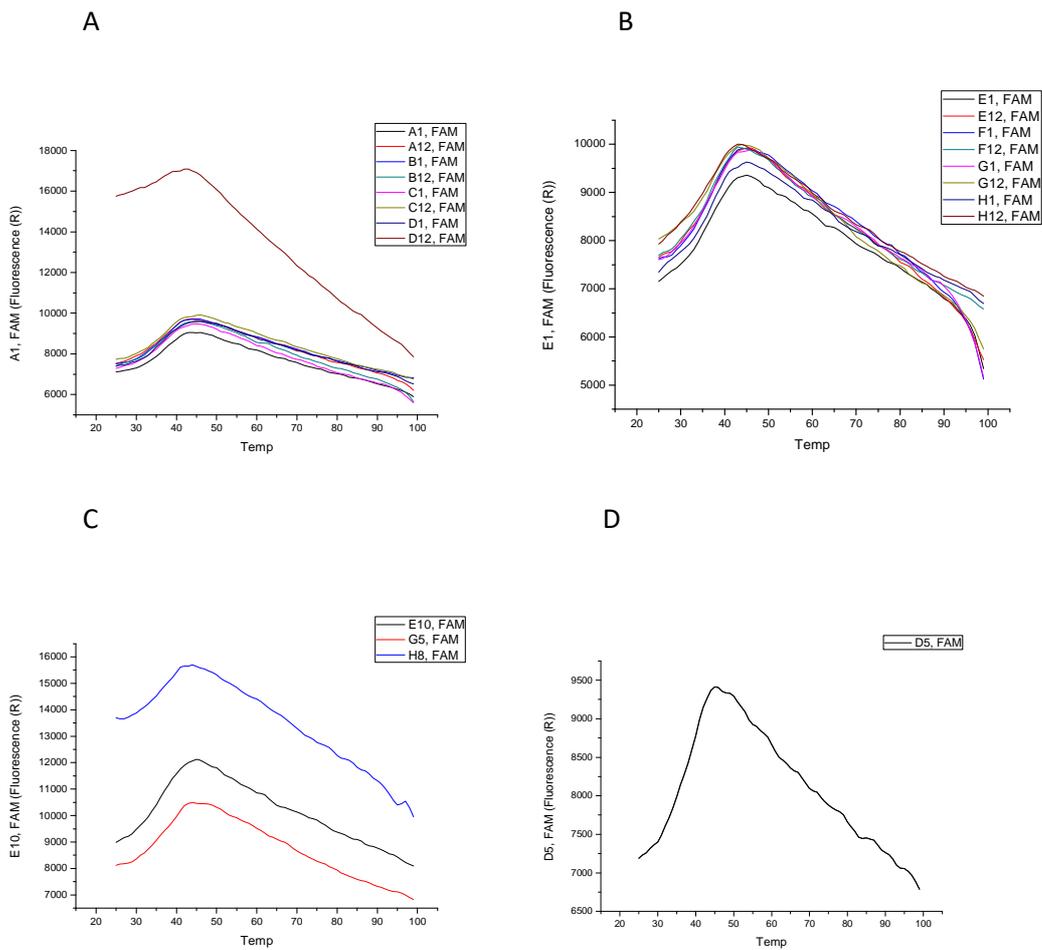


Figura 8. A) y B) Controles: 1 μ M SpFlid y 2,5 μ M de DMSO, B) C), D) 1 μ M SpFlid y 2,5 μ l compuesto (2,5% DMSO), E) Análisis de Tm de compuestos, criterio de selección 2*SD.

- Placa 2



E

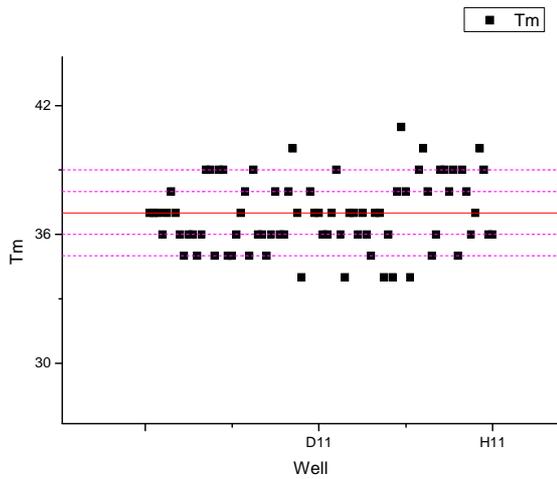


Figura 8. A) y B) Controles: 1 μM SpFlid y 2,5 % de DMSO, C), D) 1 μM SpFlid y 2,5 μl compuesto (2,5% DMSO), E) Análisis de T_m de compuestos, criterio de selección 2^*SD .

- Placa 3

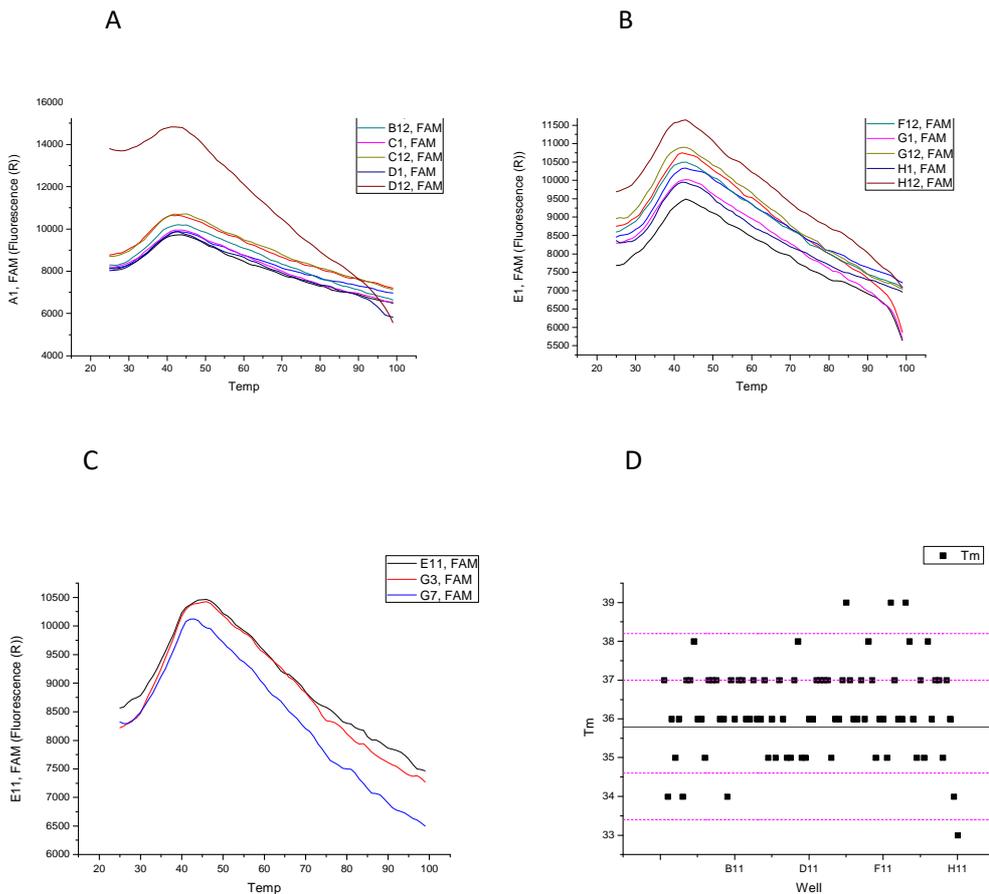


Figura 9. A) y B) Controles: 1 μM SpFlid y 2,5% de DMSO, C) 1 μM SpFlid y 2,5 μl compuesto (2,5% DMSO), D) Análisis de T_m de compuestos, criterio de selección 2^*SD .

- Placa 4

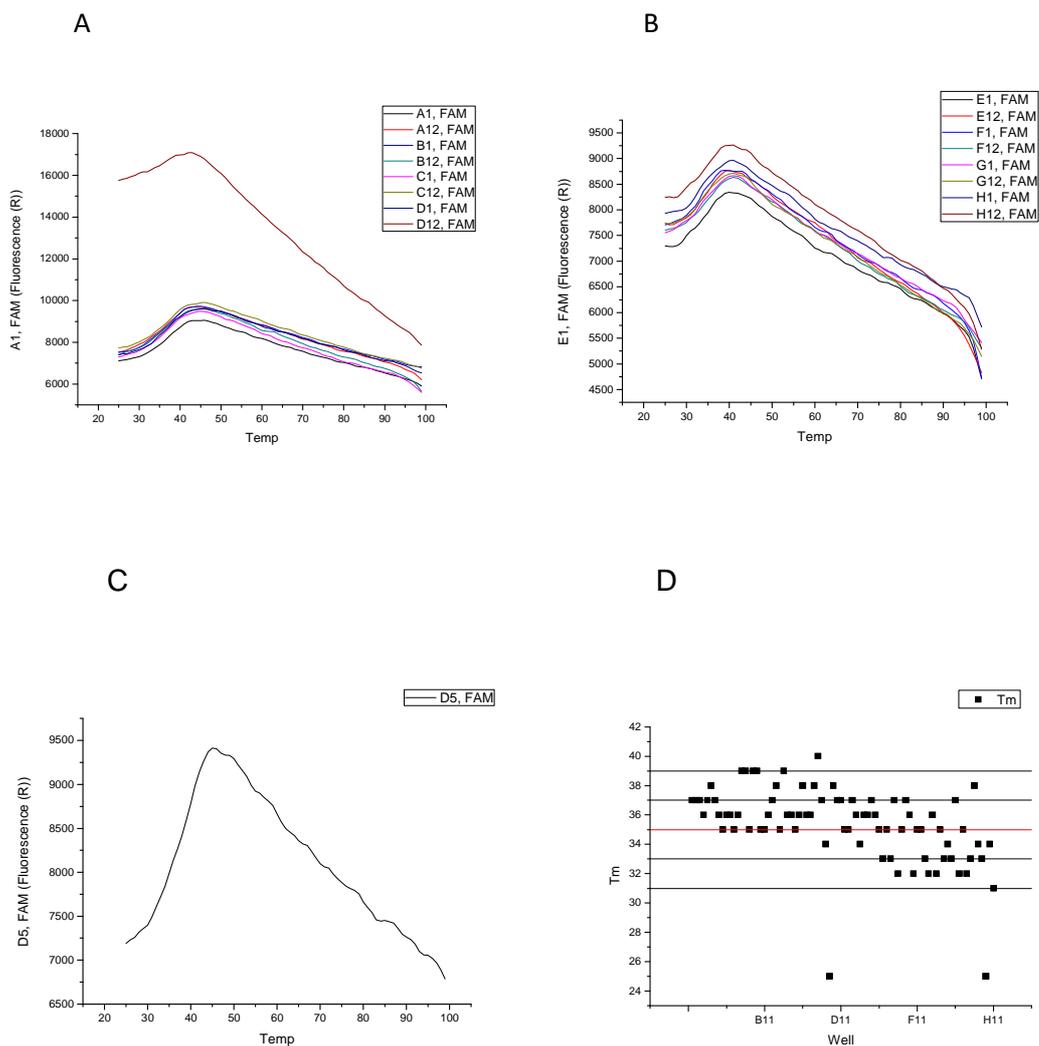


Figura 10. A) y B) Controles: 1 μ M SpFId y 2,5% de DMSO, C) 1 μ M SpFId y 2,5 μ l compuesto (2,5% DMSO), D) Análisis de T_m de compuestos, criterio de selección $2 \times SD$.

- Placa 5

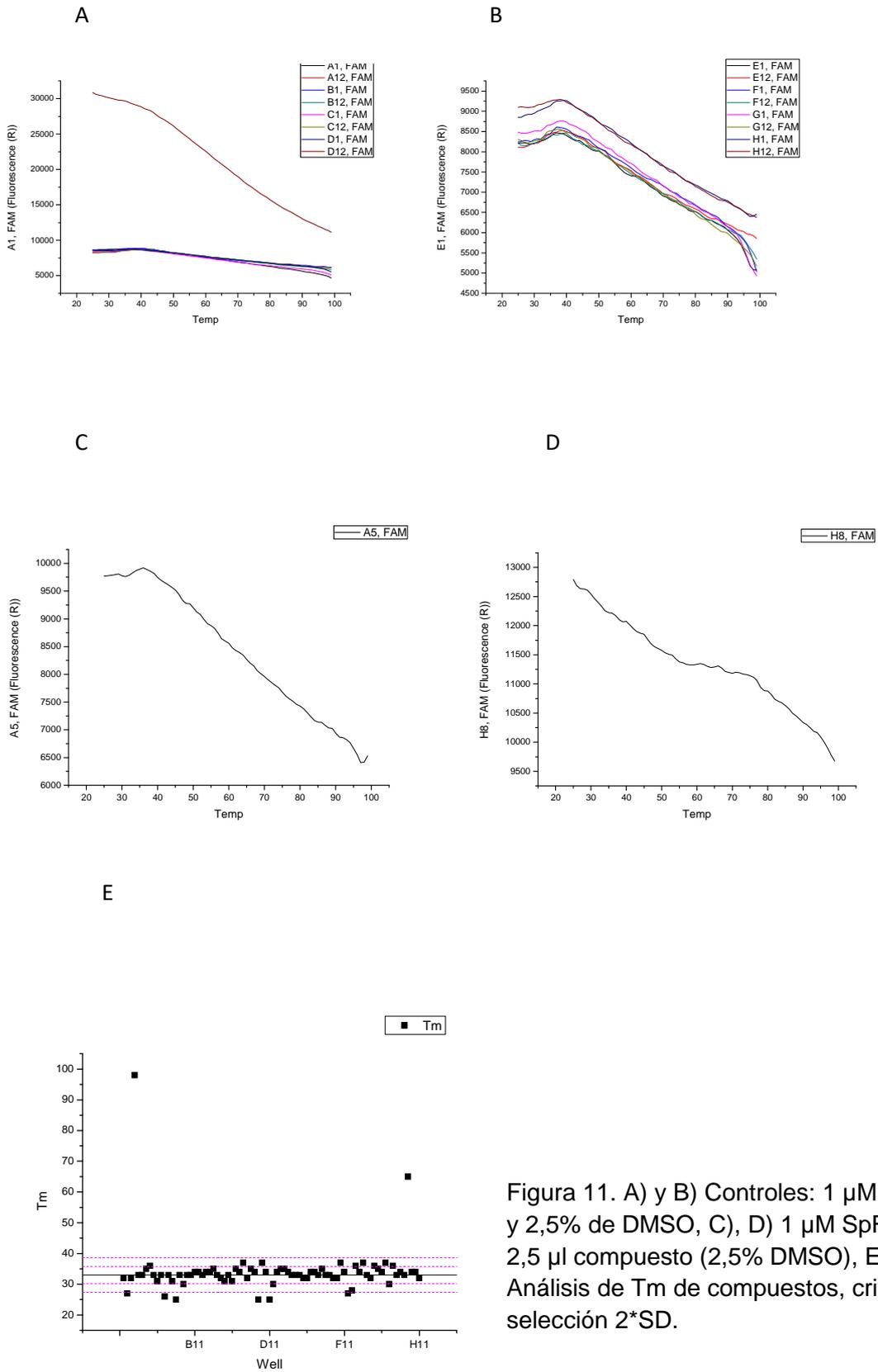


Figura 11. A) y B) Controles: 1 μ M SpFlid y 2,5% de DMSO, C), D) 1 μ M SpFlid y 2,5 μ l compuesto (2,5% DMSO), E) Análisis de T_m de compuestos, criterio de selección 2*SD.

- Placa 6

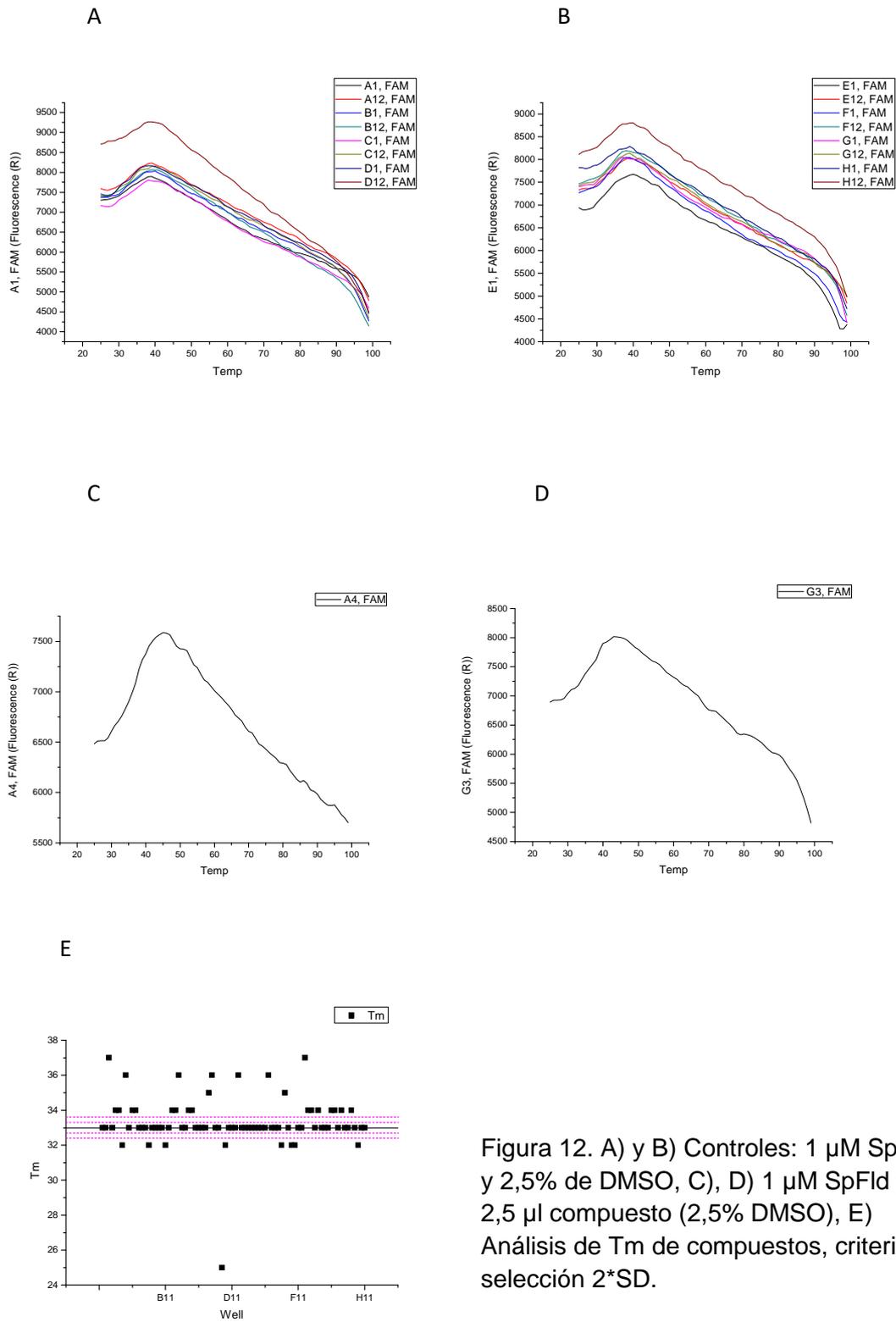
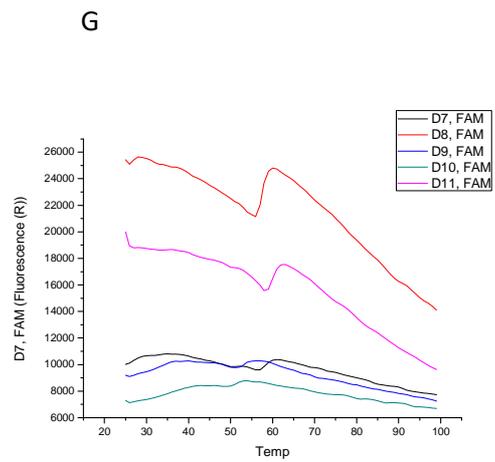
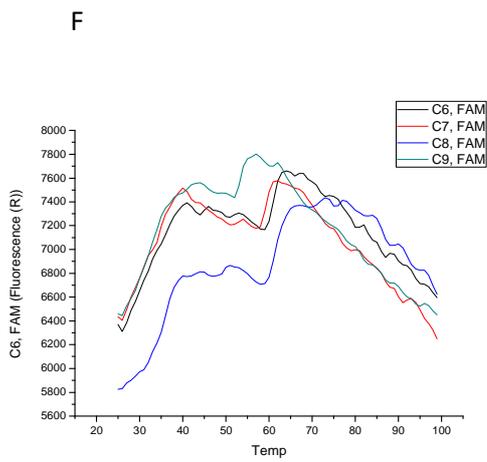
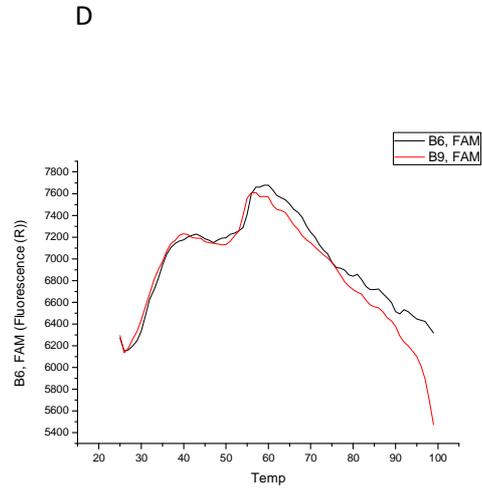
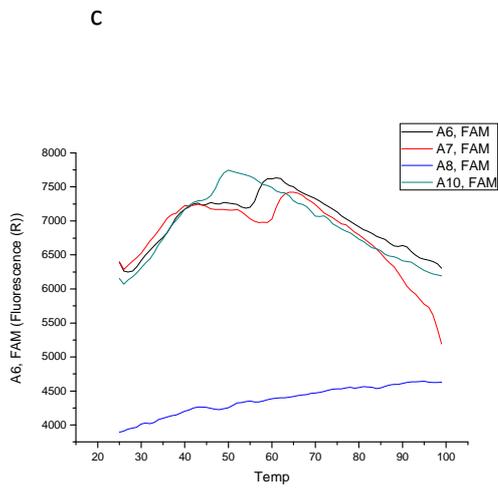
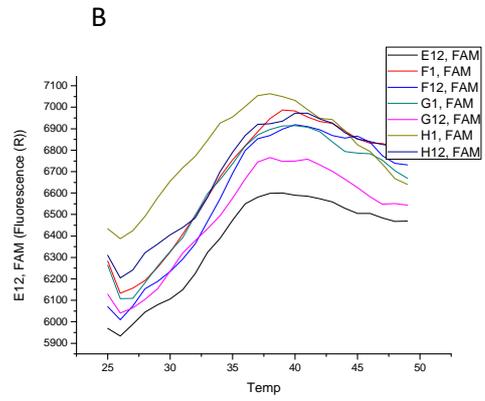
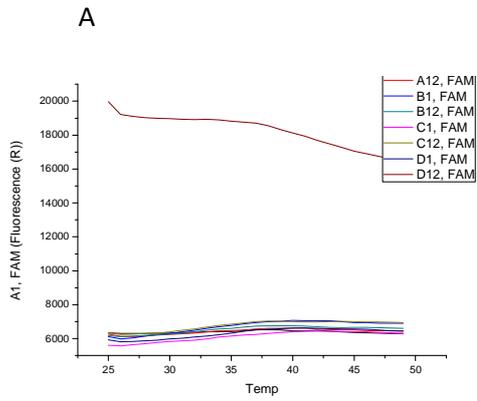


Figura 12. A) y B) Controles: 1 μ M SpFlid y 2,5% de DMSO, C), D) 1 μ M SpFlid y 2,5 μ l compuesto (2,5% DMSO), E) Análisis de T_m de compuestos, criterio de selección 2*SD.

- Placa 7



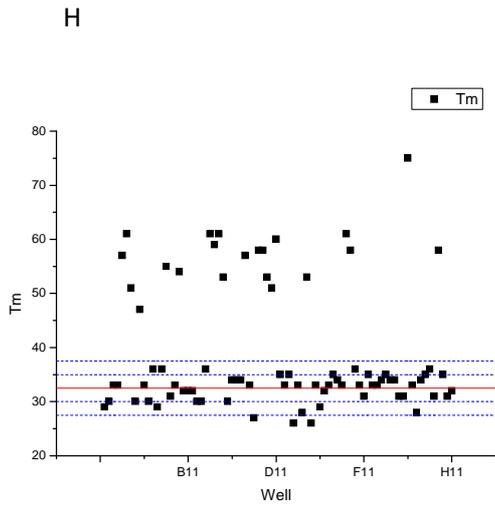


Figura 13. A) y B) Controles: 1 μ M SpFId y 2,5% de DMSO, C), D), E), F), G) 1 μ M SpFId y 2,5 μ l compuesto (2,5% DMSO), H) Análisis de Tm de compuestos, criterio de selección 2*SD.

- Placa 8

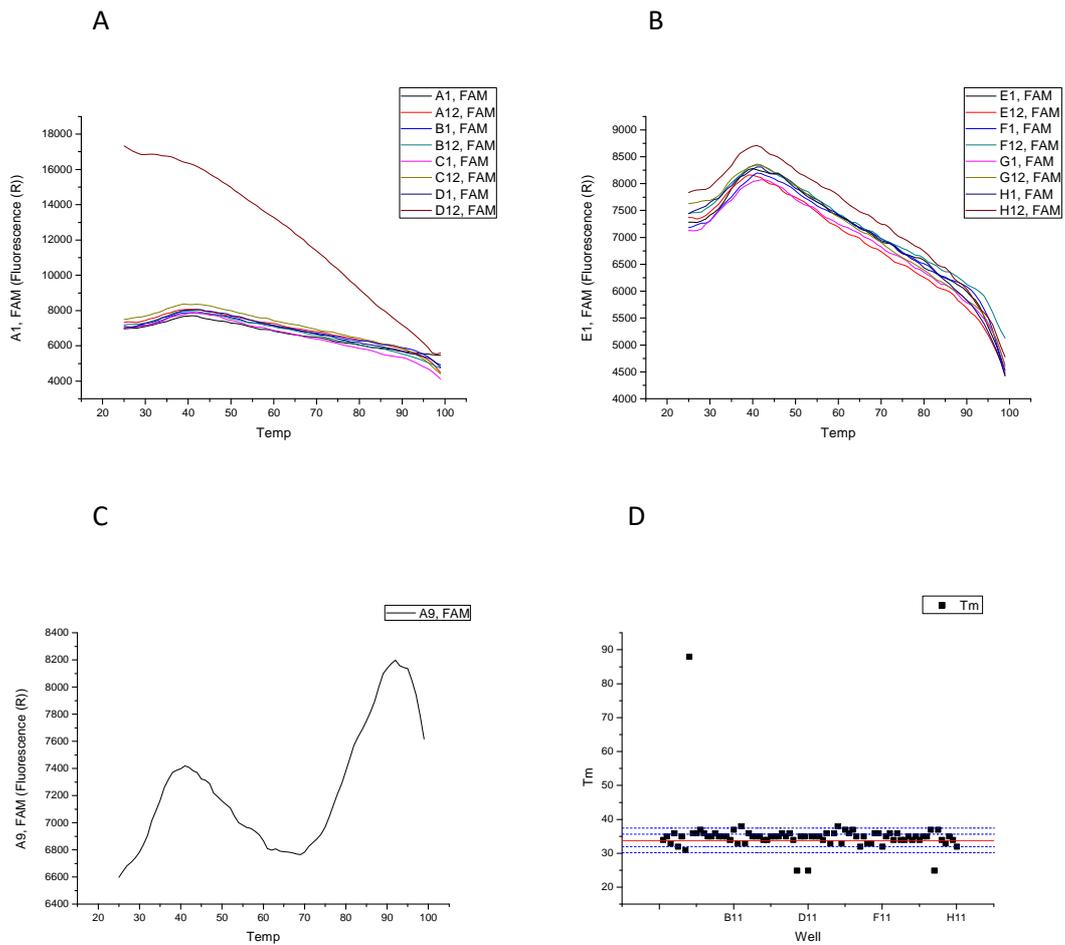


Figura 14. A) y B) Controles: 1 μ M SpFId y 2,5% de DMSO, C), 1 μ M SpFId y 2,5 μ l compuesto (2,5% DMSO), D) Análisis de Tm de compuestos, criterio de selección 2*SD.

- Placa 9

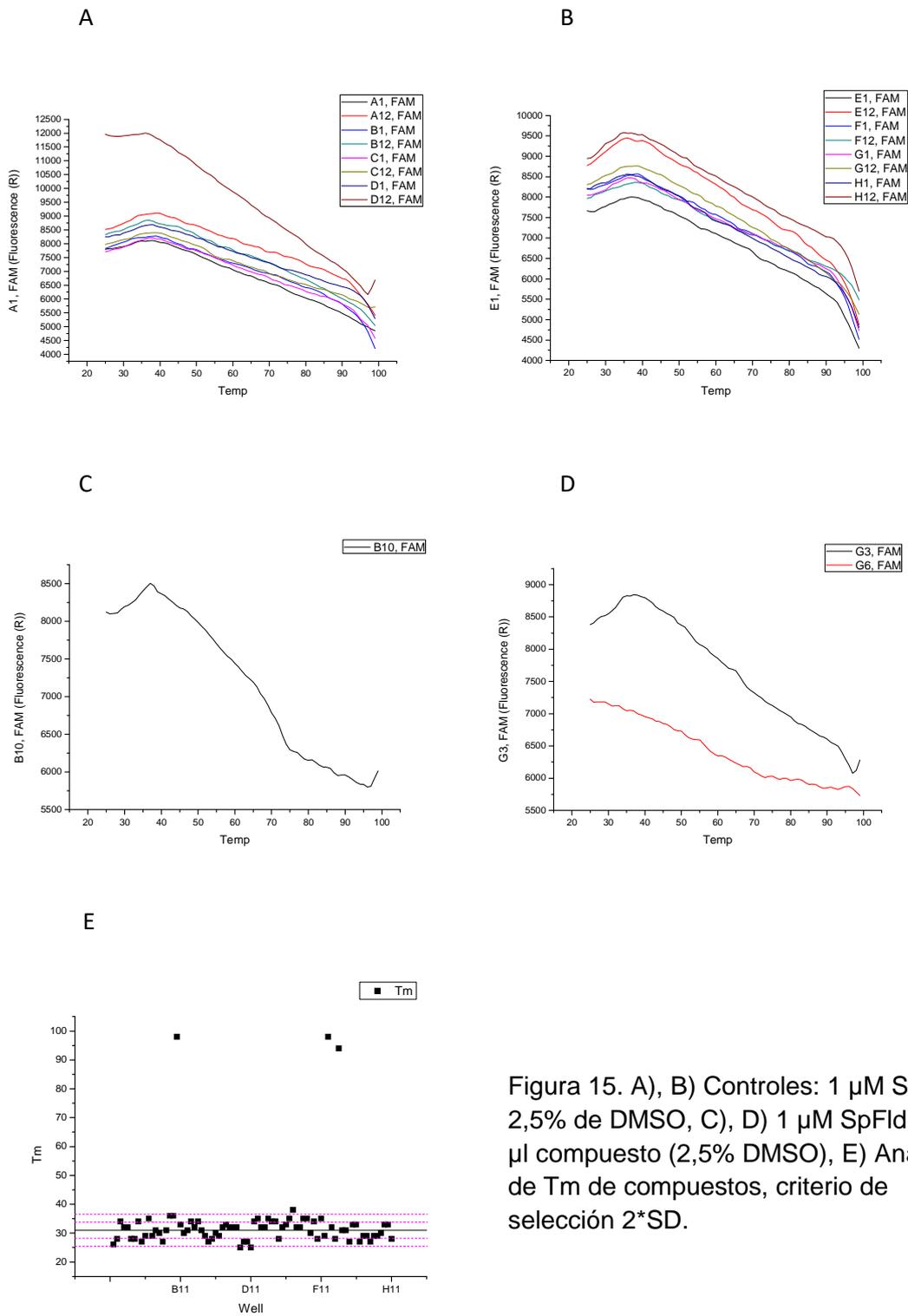


Figura 15. A), B) Controles: 1 μ M SpFId y 2,5% de DMSO, C), D) 1 μ M SpFId y 2,5 μ l compuesto (2,5% DMSO), E) Análisis de T_m de compuestos, criterio de selección 2*SD.

- Placa 10

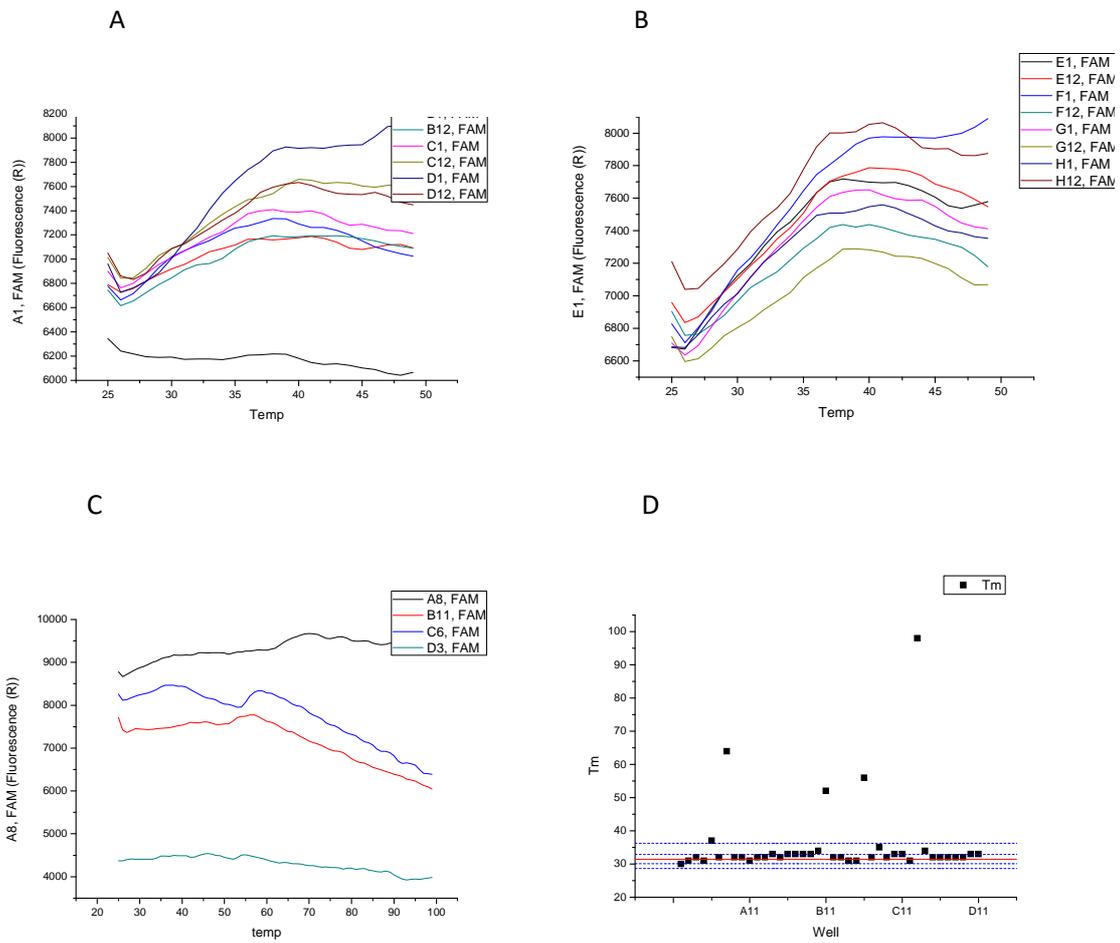


Figura 16. A), B) Controles: 1 μ M SpFId y 2,5% de DMSO, C) 1 μ M SpFId y 2,5 μ l compuesto (2,5% DMSO), D) Análisis de T_m de compuestos, criterio de selección 2*SD.

- Placa 11

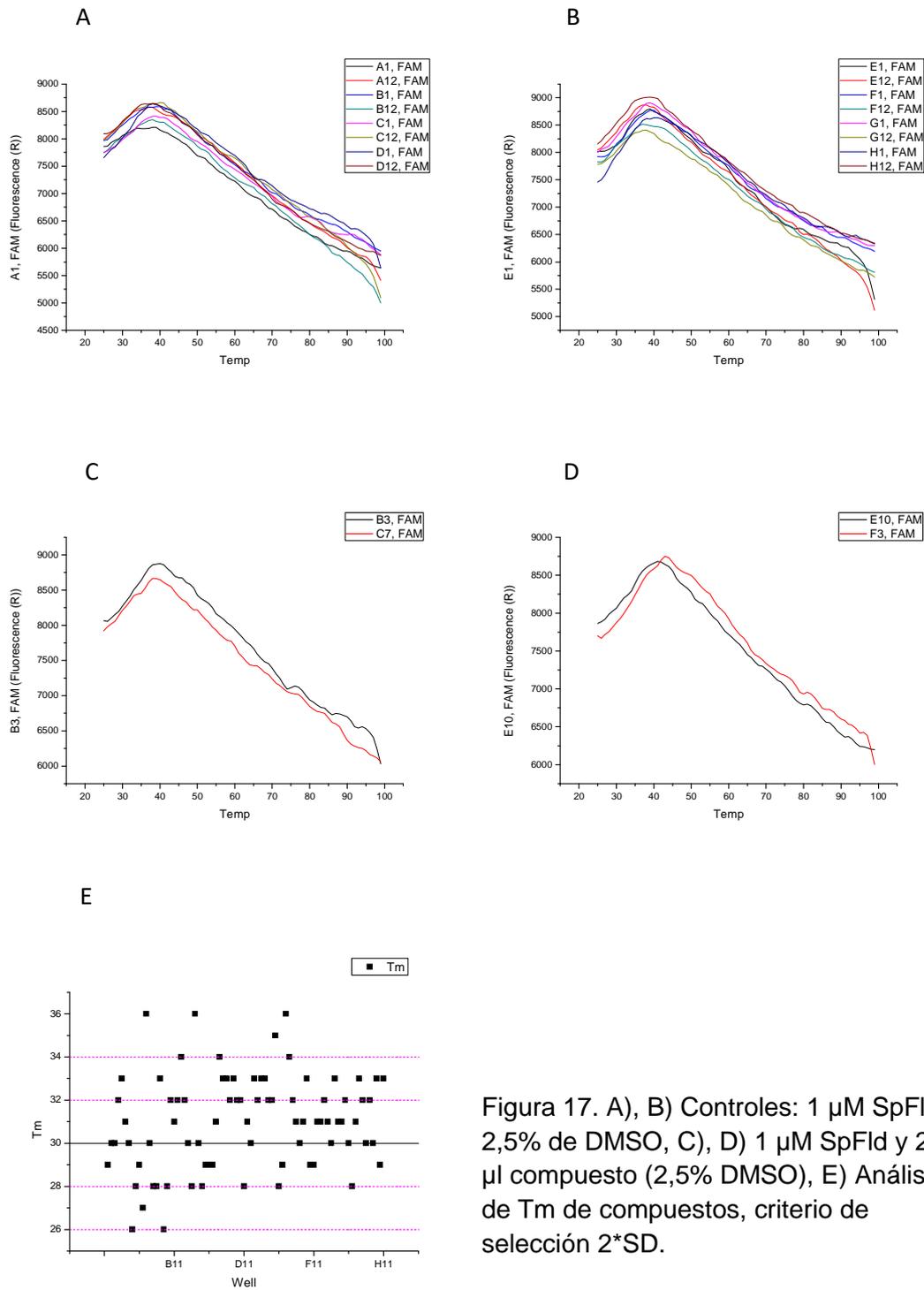
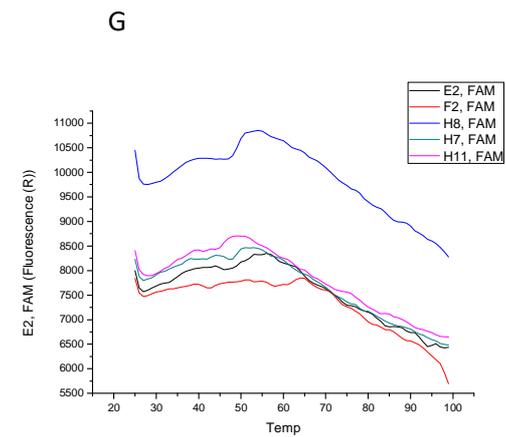
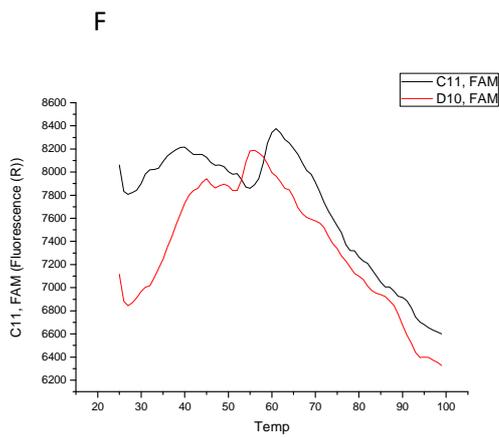
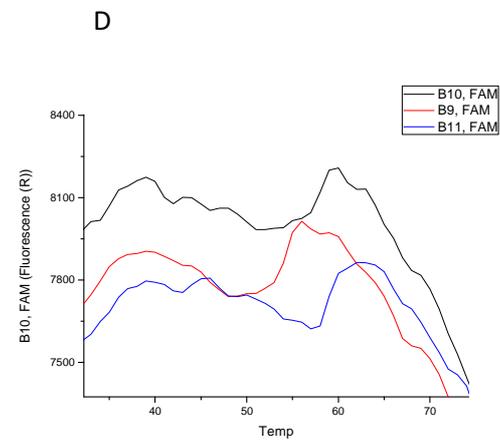
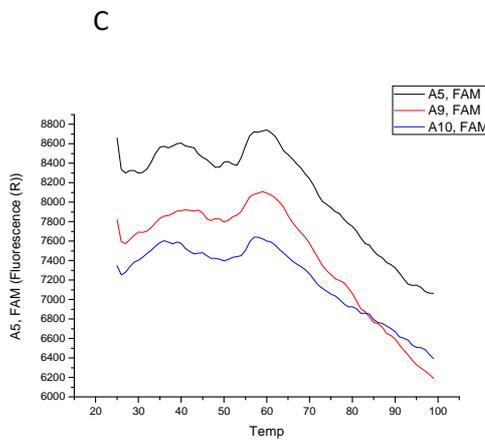
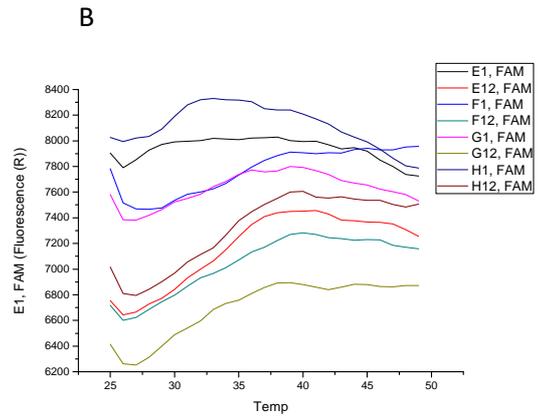
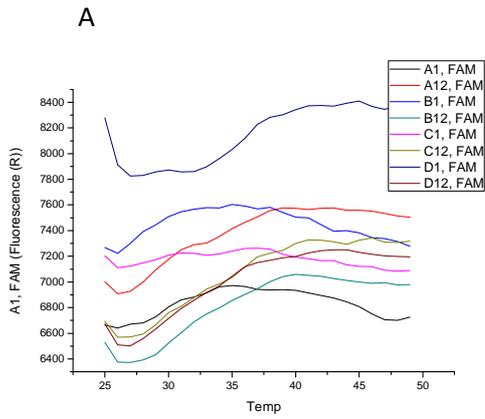


Figura 17. A), B) Controles: 1 μ M SpFlid y 2,5% de DMSO, C), D) 1 μ M SpFlid y 2,5 μ l compuesto (2,5% DMSO), E) Análisis de Tm de compuestos, criterio de selección 2*SD.

- Placa 12



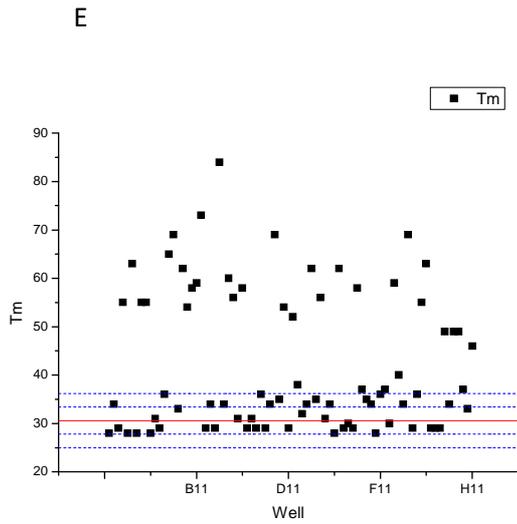


Figura 18. A), B) Controles: 1 μ M SpFId y 2,5% de DMSO, C), D) 1 μ M SpFId y 2,5 μ l compuesto (2,5% DMSO), E) Análisis de Tm de compuestos, criterio de selección 2*SD.

- Placa 13

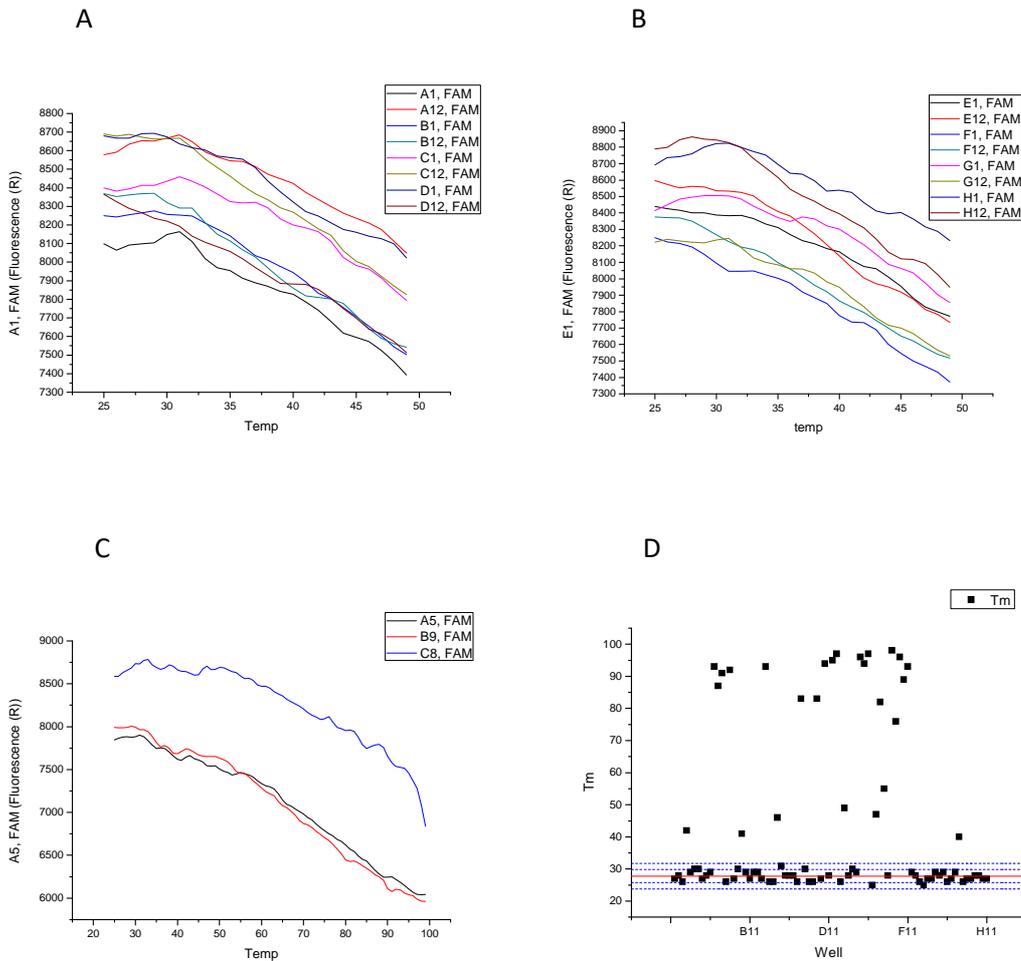


Figura 19. A), B) Controles: 1 μ M SpFId y 2% μ M de DMSO, C) 1 μ M SpFId y 2,5 μ l compuesto (2,5% DMSO), D) Análisis de Tm de compuestos, criterio de selección 2*SD.

- Placa 14

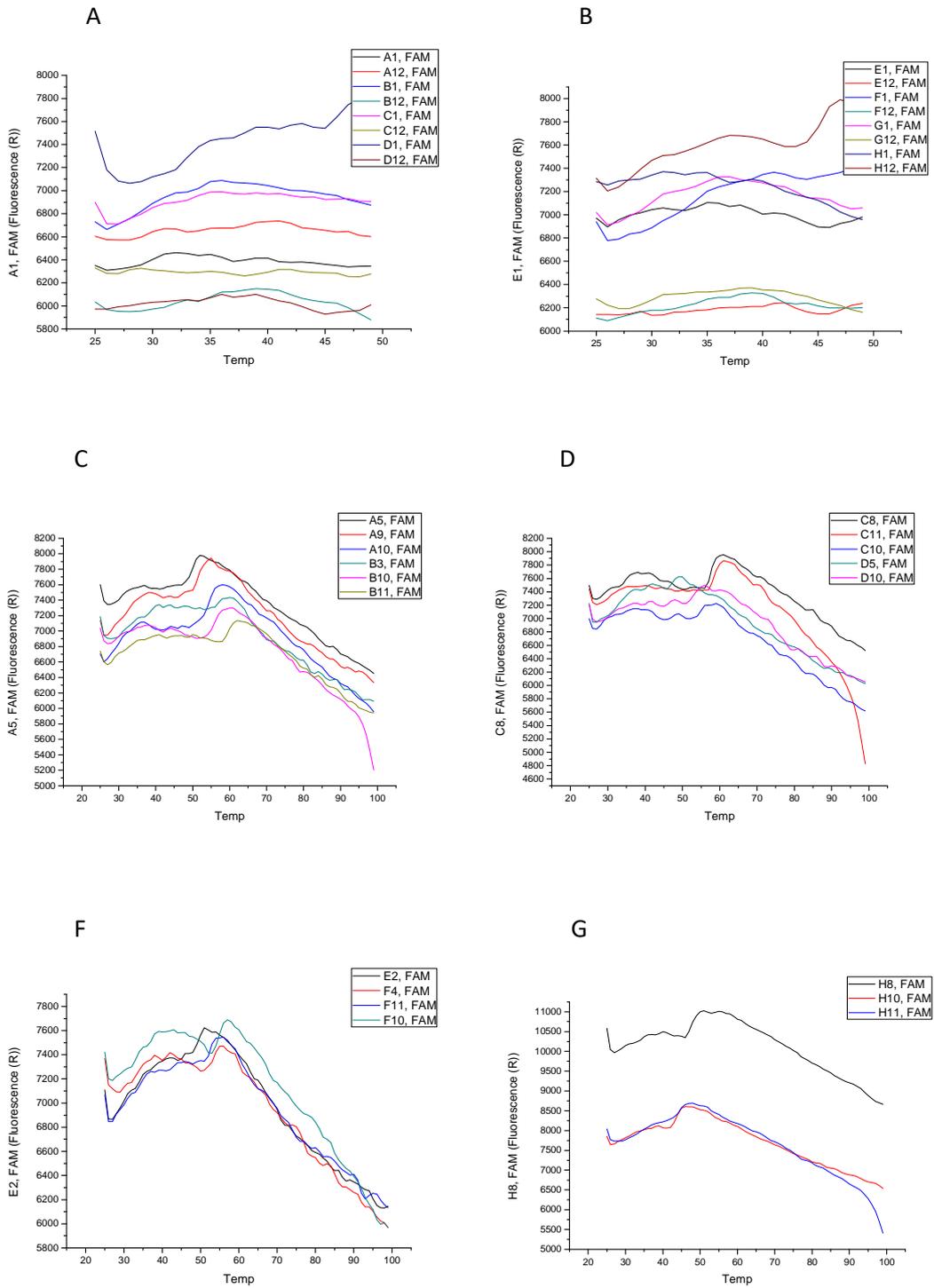


Figura 20. A), B) Controles: 1 μ M SpFlid y 2,5% de DMSO, C) D), E), F), G) 1 μ M SpFlid y 2,5 μ l compuesto (2,5% DMSO)

Tabla 4. Resultados análisis curvas de desnaturalización proteica.

PLACA 1		
Controles	Media	SV
A-H	36,6	1,5
Compuesto	Tm	
A6*	40	
A8*	40	
F9**	42	
D5*	40	
D7*	40	
PLACA 2		
Controles	Media	SV
A-H	37	1
Compuesto	Tm	
D5*	40	
F10**	41	
G5*	40	
H8*	40	
PLACA 3		
Controles	Media	SV
A-H	35,8	1,2
Compuesto	Tm	
E11*	39	
G3*	39	
G7*	39	
PLACA 4		
Controles	Media	SV
A-H	35,4	2
Compuesto	Tm	
D5*	40	
PLACA 5		
Controles	Media	SV
A-H	33,4	2,8
Compuesto	Tm	
A5	98	
H8	65	
PLACA 6		
Controles	Media	SV
A-H	33	0,3
Compuesto	Tm	
A4*	37	
G3*	37	
PLACA 7		
Controles	Media	SV
A-H	32,5	2,5
Compuesto	Tm	
A6	57	
A7	61	

A8	51
A10	47
B6	55
B9	54
C6	61
C7	59
C8	61
C9	53
D7	58
D8	58
D9	53
D10	51
D11	60
E8	53
F7	61
F8	58
G11	75
H8	58

PLACA 8

Controles	Media	SV
A-H	33,8	1,7
Compuesto	Tm	
A9	88	

PLACA 9

Controles	Media	SV
A-H	31,1	2,8
Compuesto	Tm	
B10	98	
G3	98	
G6	98	

PLACA 10

Controles	Media	SV
A-H	31,5	1,4
Compuesto	Tm	
A8	64	
B11	52	
C6	56 (Descartado)	
D3	98 (Descartado)	

PLACA 11

Controles	Media	SV
A-H	30,3	2,3
Compuesto	Tm	
B3	36 (D)	
C7	36 (D)	
E10	35(D)	
F3*	36	

PLACA 12

Controles	Media	SV
A-H	30,6	2,8
Compuesto	Tm	

A5	55
A9	55
A10	55
B10	58
B9	54
B11	59
C11	58
D10	54
E2	52
F2	62
H8	49
H11	46
H7	49

PLACA 13

Controles	Media	SV
A-H	27,8	2
Compuesto	Tm	
A5	42	
B9	41	
C8	46	

PLACA 14

Controles	Media	SV
A-H	31	2,6
Compuesto	Tm	
A5	50	
A9	51	
A10	55	
B3	57	
B10	56	
B11	60	
C8	58	
C11	58	
C10	55	
D5	47	
D10	53	
E2	49	
F4	54	
F10	55	
F11	53	
H8	47	
H11	44	
H10	44	

*Compuesto seleccionado

**Compuesto seleccionado (mayor Tm)

Los compuestos seleccionados para realizar un re-análisis de sus curvas de desnaturalización son los siguientes: F9, A6, A8, D5 y D7 placa 1, D5, F10, G5 y H8 placa 2, E11, G3, G7 placa 3, D5 placa 4, A4 y G3 placa 6 y F3 de la placa 11.

La selección de compuestos se realiza siguiendo dos criterios: en función del valor de la T_m (indicada en la tabla 4), de modo que se consideran positivos aquellos compuestos que provocan un aumento de T_m de la proteína mayor de dos veces la desviación estándar de las T_m 's de los controles negativos y en función de sus curvas de desnaturalización (para descartar posibles artefactos en la identificación automática de la T_m)

Como ya se ha mencionado en el apartado Antecedentes, SpFld sigue un proceso de desnaturalización compuesto por dos estados, así que los compuestos seleccionados deben mantener esta curva de desnaturalización, sino son descartados. Es lo que observamos en los resultados correspondientes a las placas 5 (Figura 11), 7 (Figura 13), 8 (Figura 14), 9 (Figura 15), 10 (Figura 16), 11 (Figura 17), 12 (Figura 18), 13 (Figura 19) y 14 (Figura 20), sus curvas de desnaturalización no son las esperadas así como las medias de las T_m de los controles negativos (sin compuesto).

Las posibles causas de obtención de estos resultados podrían ser:

- Una mala manipulación de las muestras a la hora de realizar el cribado.
- El stock de proteína a partir del cual se realiza la dilución final de 1 μM de proteína contuviese proteína parcialmente desnaturalizada. Antes de proceder a la dilución del stock de proteína, se cuantifica su concentración a través de la medida de absorbancia a 456 nm. En muchas de las ocasiones, la concentración obtenida era inferior a la indicada en el stock, indicando una pérdida parcial de proteína estable.

Las placas indicadas anteriormente deben repetirse, ya que más de la mitad de la quimioteca se ha visto afectada por una o por las dos causas anteriores, habiendo descartado compuestos que quizás interaccionasen con SpFld.

4.5. Re-análisis de los compuestos que aumentan la estabilidad de SpFId (T_m)

Para comprobar que los compuestos seleccionados aumentan la estabilidad de la proteína (aumentando su T_m respecto a los controles en una cantidad mayor a dos veces la desviación estándar de la T_m de los controles negativos) se procede a re-analizarlos.

En este caso, la concentración final de SpFId en la muestra es de 2 μM, 2,5% DMSO.

Los resultados obtenidos se detallan a continuación (figura 21)

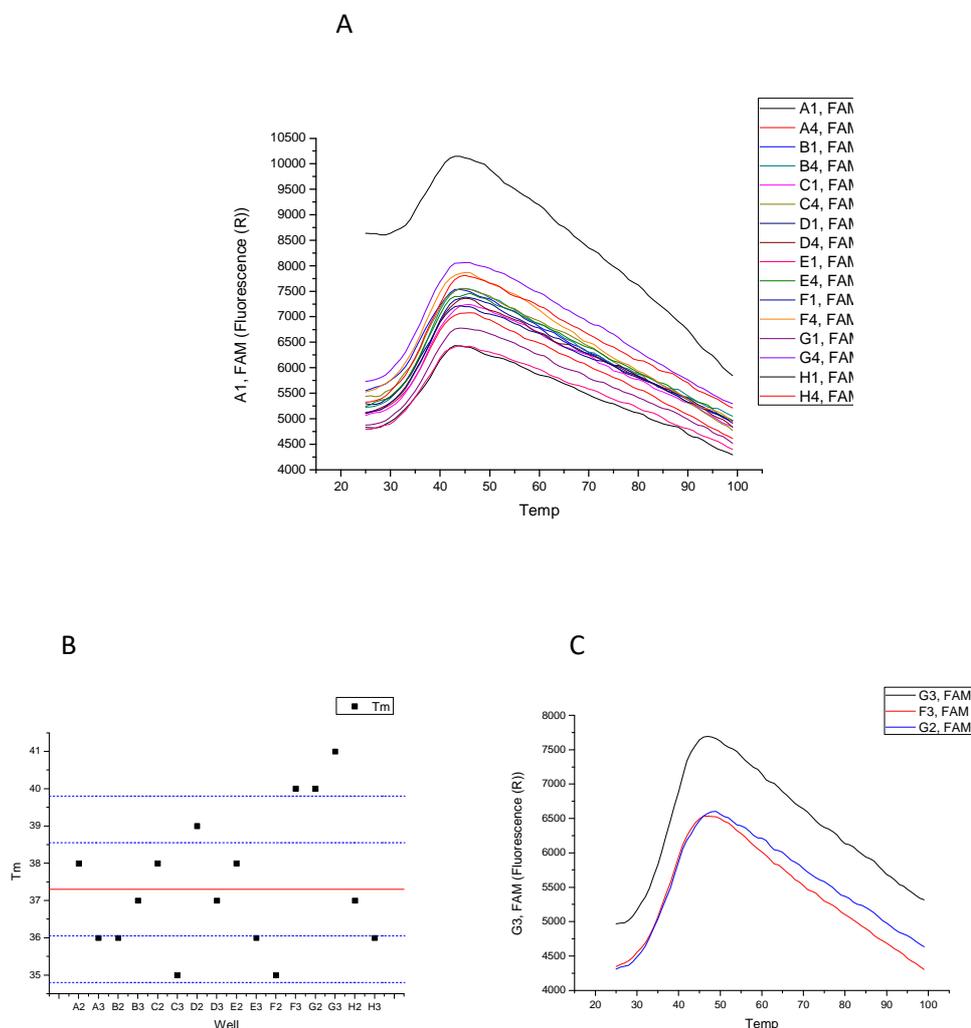


Figura 20. A) Controles. Todos los pocillos contienen 100 μl de proteína, 2 μM y 2,5% DMSO. B) Media controles (representada por línea continua roja) y medias de las T_m de los compuestos. C) Curvas de desnaturalización de los tres compuestos seleccionados ([SpFId=2 μM]).

Tabla 5. Resultados tras segundo cribado con los compuestos seleccionados

Controles	Media	SV
A-H	37,3	1,25
Compuesto		Tm
F3 (Tiroxina L)	40	
G2 (Cefotaxima)	40	
G3 (Cefixima)	41	

Tras el re-análisis de los 16 compuestos seleccionados a través del primer cribado, son 3 de ellos lo que cumplen los requisitos para su selección (tabla 5): G3 (correspondiente al compuesto G3 de la placa 6), F3 (correspondiente al compuesto A4 de la placa 6) y G2 (correspondiente al compuesto F10 de la placa 2).

4.6. Estudio de la interacción entre flavodoxina y los compuestos seleccionados

Para el estudio de la posible interacción entre los compuestos seleccionados y SpFId se realizan dos ensayos de ITC a 15 y 25°C (MicroCal AutoITC200 calorimeter, GE Healthcare Life Sciences).

El análisis de los resultados obtenidos a través de ITC se realiza con Origin 7. A continuación (Figura 21), se muestran las curvas calorimétricas y los resultados obtenidos a partir de éstas (regresión no lineal de mínimos cuadrados) (Tabla 6)

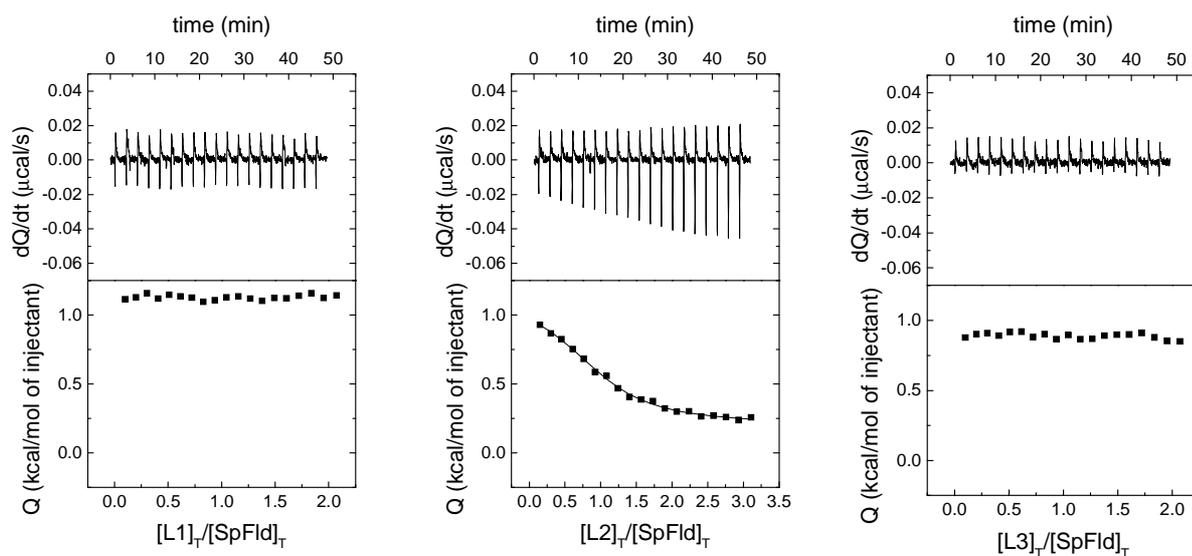


Figura 21. Resultados obtenidos a través de ITC. 10 μM SpFld, 150 μM de ligando 100 mM MES, 150 mM NaCl, pH= 6,5, 1% de DMSO residual.

Tabla 6. Resultados ITC

	K (10^5 M^{-1})	K_d (μM)	ΔH (kcal/mol)	n
L1	No interacción			
L2	4.0 ± 0.7	2.5 ± 0.4	0.9 ± 0.4	0.98 ± 0.04
L3	No interacción			

Se confirma la interacción en el caso de uno de los tres compuestos, el ligando 2, correspondiente al compuesto A4 de la placa 6, L-Tiroxina.

5. Discusión

El estudio de la expresión génica en animales modelo de enfermedades causadas por *Sp*, demuestran que uno de los genes implicados en el desarrollo, invasividad y supervivencia bacteriana es el correspondiente a flavodoxina, fld.

Flavodoxina ha sido escogida como diana terapéutica en otros tipos bacterianos, como *Helicobacter pylori*, mostrando resultados favorables a través de la interacción de compuestos con el centro activo enzimático, inhibiendo la acción proteica. (17, 21)

Por otro lado, dada la resistencia de *Sp* frente a vacunas polivalentes y antibióticos es necesaria la búsqueda de una nueva diana contra la que dirigir una terapia diferente, que no padezca variabilidad entre los diferentes serotipos identificados. (1, 2, 4, 5)

Por ello, con el fin de erradicar las patologías causadas por *Streptococcus pneumoniae* (otitis media, meningitis y neumonía entre otras) se escoge a flavodoxina como posible diana terapéutica.

- **Caracterización biofísica, estructural y conformacional de SpFld**

La caracterización biofísica previa (16) de SpFld en la que los autores detallan su estabilidad e interacción con su co-factor FMN proporciona la información necesaria para diseñar este procedimiento de cribado basado en el efecto estabilizador de ligandos frente a la desnaturalización térmica (thermal-shift-assay).

La elección de la forma holo (unida a co-factor) para realizar el estudio se debe a una mayor estabilidad comparada con su forma apo y a que la ocupación de su centro activo por FMN impide la inhibición competitiva de los compuestos de estudio.

La finalidad de este cribado de compuestos es la selección de compuestos que interaccionen de manera no competitiva con SpFld, es decir, aquellos que no se unan a su centro activo, pero sí cerca del co-factor pudiendo afectar al estado redox de la proteína y por lo tanto a la transferencia de electrones.

Los compuestos que actuaran de forma competitiva tendrían el inconveniente de que su unión dependería de la disociación previa del co-factor, FMN.

- **Expresión y purificación de *SpFld***

Para la expresión de flavodoxina se emplea el plásmido pMAL transformado en células BL21 de *E. Coli* y se conservan en glicerol.

Como ya se ha mencionado anteriormente, su conservación en glicerol no debe ser superior a unos dos meses ya que a partir de este momento las células comienzan a perder propiedades que afectan a la expresión de la proteína, obteniendo menor expresión que la requerida.

El constructo de proteína clonado en el vector, consiste en una proteína de fusión, que contiene una secuencia de unión a maltosa (MBP), una cola de ocho histidinas y un lugar de corte para proteasa entre ésta y la secuencia de flavodoxina.

Este constructo facilita su purificación a través de columnas de afinidad, por un lado se aísla SpFld a través de interacciones iónicas entre las histidinas y cationes cobaltos en gradiente de imidazol y por otro se eliminan los restos de proteasa que hayan podido quedar tras realizar el corte (GE-Healthcare Life Sciences HiTrap TALON Column, Gluthatione Sepharosa 4B respectivamente). Por último, se lleva a cabo una columna de filtración en gel (HiLoad Superdex 75 pg) para obtener SpFld en función de su peso molecular (16 kDa).

El análisis cuantitativo y cualitativo se realiza a través de la detección de SpFld en geles electroforéticos y a través de la medida de absorbancia para conocer la concentración proteica en la muestra ($\epsilon_{456}=9130 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

En este caso, los resultados de la purificación pueden mejorarse. En futuros experimentos deberían transformarse de nuevo las células de *E.Coli* con el plásmido que contiene nuestra proteína de interés, ya que parece ser la causa principal de la cantidad reducida de proteína obtenida.

- **Optimización del cribado de compuestos**

Las condiciones en las que se realiza el cribado de compuestos (tampón, pH, fuerza iónica) se establecen de acuerdo con los resultados obtenidos a partir del estudio previo referente a su caracterización biofísica (16).

La optimización en la concentración de proteína necesaria para realizar el cribado, así como los ensayos realizados a diferentes concentraciones de DMSO es esencial para garantizar una relación señal-ruido y gasto de proteína razonables.

Para ello, se estudian sus curvas de desnaturalización térmica, obteniendo los valores de T_m para cada situación y concluyendo que DMSO no afecta a la estabilidad proteica para las concentraciones testadas, 2, 5 y 10%.

A partir de los resultados obtenidos, se decide realizar el cribado de los compuestos que componen la quimioteca a 2,5% de DMSO y concentración proteica de 1 μM en la primera fase de cribado y de 2 μM para la segunda fase que únicamente contendrá los compuestos que cumplen el requisito predeterminado: la T_m del compuesto debe situarse por encima de dos veces la desviación estándar de la media de los controles negativos.

En este caso, la concentración utilizada de proteína 1 μM para realizar el cribado de compuestos se escogió por la reducida cantidad de proteína disponible, una de las mejoras que podría realizarse en futuros ensayos es aumentar esta concentración de proteína ya que permitiría la adición de más compuestos por pocillo, y podría establecerse mejor la estabilidad proteica a través del estudio de sus curvas de desnaturalización proteica (thermal –shift assay). Para poder aumentar su concentración en el cribado es necesario obtener mayor cantidad de proteína tras la purificación.

Por otro lado, los ensayos realizados a diferentes concentraciones de DMSO (2, 5 y 10%) permiten la adición de más de un compuesto por pocillo, agilizando el proceso de cribado.

- **Selección de compuestos que interactúan con SpFId: análisis de interacción a través de ITC**

Una vez concluido el cribado de la quimioteca deben realizarse estudios de interacción SpFId-ligando para confirmar que verdaderamente se produce interacción entre los compuestos seleccionados y nuestra proteína.

Para ello se llevan a cabo ensayos de ITC (isothermal titration calorimetry) a 15 y 25°C.

Los resultados obtenidos para los tres compuestos finales seleccionados, Tiroxina L, Cefotaxima y Cefixima, muestran que sólo se produce interacción para uno de ellos, L-Tiroxina.

Los valores obtenidos para la interacción entre SpFId-Tiroxina a través del análisis de las picos calorimétricos son: $K=4\pm0,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $K_D= 2,5\pm0,4$, $\Delta H=0,9\pm0,4 \text{ kcal/mol}$ y una estequiometría, $n=0,98\pm0,04$. Estos resultados indican que la K_D del compuesto es razonablemente buena. El compuesto seleccionado podría ser utilizado en cribados secundarios y posterior optimización. (18)

Los análisis a través de ITC son fundamentales para confirmar la interacción entre proteína-ligando, pero se requieren futuros estudios que confirmen que la interacción es de carácter inhibitorio y que el ligando se une a la proteína de manera no competitiva (no desplace al co-factor, FMN de su centro activo).

- **L-Tiroxina: posible fármaco dirigido contra SpFId**

L-Tiroxina o tiroxina levógiara es un análogo sintético de la hormona tiroxina endógena.

Este fármaco se prescribe para combatir el hipotiroidismo (niveles bajos de tiroxina endógena).

La eficacia del compuesto identificado a través de nuestro cribado, L-Tiroxina, contra *Streptococcus pneumoniae* se refleja en un estudio realizado en el año 97. (22)

El estudio se diseña para analizar cómo los niveles tiroideos afectan al desarrollo de la inflamación producida al padecer artritis reumatoide.

El tratamiento convencional de artritis reumatoide consiste en aplicar agentes anti-inflamatorios, como los glucocorticoides, limitando los efectos dañinos desencadenados por el fenómeno inflamatorio. Por otro lado, los glucocorticoides, inhiben la síntesis de citoquinas inflamatorias y limitan la proliferación de linfocitos y macrófagos, así como la infiltración celular en regiones que padecen inflamación.

La disminución de síntesis de glucocorticoides endógenos ocurre en patologías como el hipotiroidismo, por el contrario, niveles elevados de hormona tiroidea (hipertiroidismo) incrementan su síntesis.

Para analizar el efecto del estado hipertiroidico en el desarrollo de artritis reumatoide, se generan modelos experimentales de la enfermedad a través de la inoculación en ratas de células procedentes de *Streptococcus pneumoniae*. Los resultados del ensayo demuestran que la inoculación exógena de T₄ (tiroxina) reduce la síntesis de citoquinas y quimiocinas por parte de los macrófagos dirigidas contra la inflamación producida por las células procedentes de *Streptococcus pneumoniae*.

En nuestro estudio demostramos que L-tiroxina es capaz de interaccionar con SpFId a través de ensayos de desnaturalización térmica, en los que se demuestra que el compuesto es capaz de aumentar la estabilidad de SpFId. Los resultados obtenidos en el estudio realizado en modelos de artritis (22), demuestran que la administración de tiroxina exógena (generando un estado hipertiroidico), disminuye la inflamación desencadenada por la presencia de células de *Streptococcus*.

Los resultados obtenidos en el estudio (22) respaldan nuestro hallazgo: L-Tiroxina afecta negativamente al desarrollo de patologías desencadenadas por la presencia de *Streptococcus*, pudiendo seleccionar a SpFId como posible diana terapéutica.

Para poder afirmar que L-tiroxina interacciona con SpFId de manera inhibitoria y que la disminución de inflamación en modelos de artritis inducida por Sp se

debe a dicha interacción, son necesarios futuros ensayos que demuestren que su acción se dirige verdaderamente contra la flavodoxina de *Sp*.

Por ello, futuras investigaciones deberían dirigirse hacia:

- Realizar ensayos a diferentes concentraciones de proteína y compuesto, para determinar cuál es la concentración mínima necesaria para que la interacción se produzca y provoque su efecto estabilizador. A nivel farmacológico, es un dato importante ya que la concentración de compuesto con capacidad inhibitoria podría ser tóxica para el organismo.
- Caracterizar la interacción. Realizar un análisis conformacional y de estabilidad de la proteína durante la interacción del compuesto, L-tiroxina-SpFld (ITC), averiguar qué aminoácidos están implicados y localizar el sitio de unión a SpFld, si la unión tiene lugar en el sitio activo donde se produce la unión al co-factor FMN o si se produce de manera alostérica (rayos X).
- Analizar el efecto a nivel funcional. Determinar si en presencia del compuesto seleccionado se produce la transferencia de electrones o si por el contrario afecta al estado redox de SpFld unida a su co-factor.
- La acción del fármaco debería estudiarse en modelos de enfermedad desencadenadas por *Sp*, como neumonía, meningitis u otitis entre otras.

6. Conclusiones

El objetivo principal de este trabajo de investigación es identificar posibles inhibidores de SpFld a través de su interacción y aumento de estabilidad, T_m .

A través de los experimentos realizados ha podido seleccionarse un compuesto, L-Tiroxina, que aumenta la estabilidad de SpFld a través de su interacción.

Respecto a los objetivos secundarios:

- Expresión y purificación de SpFld. Se consigue purificar flavodoxina en cantidades menores a las deseadas, siendo la posible causa el estado de las células BI21 conservadas en glicerol. El diseño de una proteína

de fusión que pueda purificarse a través de interacciones iónicas en columnas de afinidad es un buen método para realizar el proceso.

- Estabilidad proteica. A través del estudio de sus curvas de desnaturalización térmica, la proteína sigue un proceso de desnaturalización de dos estados, de acuerdo con los resultados previos obtenidos a través de su caracterización biofísica (16), aunque como hemos observado en los resultados, algunas de estas curvas no son las esperadas. Puede deberse a una mala manipulación de las muestras o que el stock de proteína contuviese proteína ya en estado de desnaturalización.
- Optimización del cribado de compuestos. Los ensayos realizados en presencia de DMSO son esenciales para decidir qué concentración de DMSO y proteína diana se utilizarán para realizar el cribado de compuestos. Los resultados obtenidos a través del estudio de las curvas de desnaturalización indican que para concentraciones 1 μM de proteína y DMSO al 2, 5 y 10% la proteína no sufre desestabilización.

Futuras investigaciones:

- Transformar *E.Coli* con el plásmido al inicio de cada purificación proteica, ya que su conservación en glicerol durante más de dos meses afecta a su expresión.
- Respecto al cribado de compuestos, podrían adicionarse más de un compuesto por pocillo ya que a concentraciones de 10% DMSO la proteína sigue siendo estable, así como aumentar la concentración de proteína mejorando la relación señal-ruido y la reproducibilidad en la detección automática de T_m en las curvas de desplegamiento.
- Estudiar la interacción del compuesto identificado con flavodoxina a través de rayos X para conocer que aminoácidos están implicados y qué cambios conformacionales provoca en SpFld.
- Determinar qué tipo de interacción se lleva a cabo, si el compuesto interacciona con el centro activo de la proteína desplazando a su co-factor FMN (inhibición competitiva) o si se lleva a cabo de manera alostérica (no competitiva).

Conclusions

The main objective of this research project is to identify possible SpF1d inhibitors through its interaction and its increased stability, T_m.

Over the tests, we have been able to select one compound, L-Thyroxine, which increases the SpF1d stability through its interaction.

Regarding the supporting objectives:

- SpF1d expression and purification. The Sp flavodoxin was obtained in smaller quantities than expected, possibly due to the BL21 cells state preserved in glycerol. A good method to carry out this process is to design a new fusion target protein that can be purified by ionic interactions in affinity columns.
- Protein stability. After the study and analysis of the thermal stability profile which consists of two denaturation states (according to the results obtained 16), some of our results aren't in accordance to what was expected. This could be caused by an improper handling of the samples or because the protein stock already contained protein in a denaturation state.
- Screening optimization. The tests performed in the presence of DMSO are a key factor in deciding the compound concentration necessary to carry out the compound screening. The results obtained through the study of the thermal denaturation profile indicate that no protein destabilization occurs at 2,5% and 10% DMSO concentrations.

Future long-term research studies would be directed at:

- Transfecting cells with plasmids at the beginning of each purification assay, because preserving them in glycerol for more than two months affects their expression.
- In respect of the screening, more than one compound could be added per well considering that at 10% DMSO concentrations the protein is still stable.

- Studying the identified compound interaction with flavodoxin, defining which aminoacids are involved and the conformational changes they cause in SpFld.
- Establishing the type of interaction, that is if the compound interacts with the protein's active site moving its co-factor FMN, or if it is an allosteric interaction.
- Analyzing if the selected compound really inhibits the protein's role.

7. **Bibliografía**

1. Asunción Fenoli, Isabel Jado, Dolores Vicioso, Amalia Pérez, Julio Casal, Evolution of Streptococcus pneumoniae serotypes and antibiotic resistance in Spain: Update (1990-1996), Dec.1998. Journal of clinical Microbiology, vol.36., No.12, (3447-3454)
2. E. Alonso, A.F.M: Verheul, J, Verhoef, H. Snippe, Streptococcus pneumoniae: Virulence factors, pathogenesis and vaccines, Dic.1995, Microbiological Reviews, Vol.59, No.4 (591-603)
3. J. Liñares, C. Ardanuy, R. Pallares, A. Fenoll, Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in Streptococcus pneumoniae over a 30-year period, 2010, Clin.Microbiol. Infect., 16: 402-410
4. A. M. Mitchell, T. J. Mitchell, Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation, 2010, Clin. Microbiol. Infect., 16: 411-418
5. Anne Marie Di Guilmi, Andrea Dessen, New approaches towards the identification of antibiotic and vaccine targets in Streptococcus pneumoniae, 2002, EMBO reports, Vol.3, No.8 (728-734)
6. Alessandra Polissi, Andrea Pontiggia, Georg Feger, Mario Altieri, Harald Mottl, Livia Ferrari, and Daniel Simon, Large-scale identification of virulence genes from Streptococcus pneumoniae, Infection and Immunity, Dec.1998, Vol.66, No.12 (5620-5629)
7. Carlos J. Orihuela, Jana N. Radin, Jack E. Sublett, Geli Gao, Deepak Kaushal, Elaine I. Tuomanen, Microarray analysis of pneumococcal

- gene expression during invasive disease, Oct.2004, Infection and Immunity, Vol.72, No.10, (5582-5596)
8. T. E. Molzen P. Burghout, H. J. Bootsma, C. T. Brandt, Christa E. van der Gaast-de Jongh, M. J. Eleveld, M. M. Verbeek, N. Frimodt-Møller, C. Østergaard, and P. W. M. Hermans, Genome-Wide identification of *Streptococcus pneumoniae* genes essential for bacterial replication during experimental meningitis, Infection and Immunity, Jun.2011, Vol.79, No.1 (288-297)
 9. Jetta J.E. Bijlsma, P.Burghout, T. Kloosterman, H. Bootsma, A. de Jong, P. Hermans, O. Kuioers, Development of genomic array footprinting for identification of conditionally essential genes in *Streptococcus pneumoniae*, 2007, Applied and environmental microbiology, Vol.73, no.5, (1514-1524)
 10. Gerdes SY, Scholle MD, Campbell JW, Bala G, Ravasz E, Daugherty MD, et al. Experimental Determination and System Level Analysis of Essential Genes in *Escherichia coli* MG1655. *Journal of Bacteriology*, 2003. 185(19): p. 5673±5684.
 11. Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2006. 2: p.2006.0008±2006.0008
 12. Langridge GC, Gemma C, Phan MD, Turner DJ, Perkins TT, Parts L, et al. Simultaneous assay of every *Salmonella Typhi* gene using one million transposon mutants. *Genome Research*, 2009. 19 (12): p. 2308±2316.
 13. Akerley BJ, Rubin EJ, Novick VL, Amaya K, Judson N, Mekalanos JJ, et al. A genome-scale analysis for identification of genes required for growth or survival of *Haemophilus influenzae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. 99(2): p. 966±971.
 14. Cameron DE, Urbach JM, Mekalanos JJ. A defined transposon mutant library and its use in identifying motility genes in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008. 105(25): p. 8736±8741

15. Freigang J, Diederichs K, Schäfer KP, Welte W, Paul R. Crystal structure of oxidized flavodoxin, an essential protein in *Helicobacter pylori*. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 2002. 11 (2): p. 253-261.
16. Rodríguez-Cárdenas Á, Rojas AL, Conde-Giménez M, Velázquez-Campoy A, Hurtado-Guerrero R, Sancho J (2016) *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 Flavodoxin: Structural and Biophysical Characterization of a Novel Drug Target.
17. Juan J. Galano, Miriam Alías, Reyes Pérez, Adrián Velázquez-Campoy, Paul S. Hoffman, Javier Sancho, Improved Flavodoxin Inhibitors with potential therapeutic effects against *Helicobacter pylori* infection, 2013, *J. Med. Chem.*, 56: 6248-6258
18. Arne Schön, Adrián Velázquez Campoy, *Methods for Structural Analysis of Protein Pharmaceuticals*, Chapter 17: Calorimetry (573-589).
19. Adrián Velázquez Campoy, Ernesto Freire, *Techniques*, Chapter 8 (882-892).
20. Adrián Velázquez Campoy et al, *Protein-protein interactions: Methods and applications*, *Methods in Molecular Biology*, Chapter 11.
21. Nunilo Cremadres, Marta Bueno, Miguel Toja, Javier Sancho, Toward a new therapeutic target: *Helicobacter pylori* flavodoxin, 2005, *Biophysical Chemistry*, 115: 267-276
22. Peter A. Rittenhose and Eva Redei, Thyroxine administration prevents streptococcal cell wall-induced inflammatory responses, 1997, *Endocrinology*, Vol.138, No.4 (1434-1439)