



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Drug discovery with a FRET Biosensor of scaffolding interactions in the N-terminal region of c-Src

Descubrimiento de fármacos mediante un biosensor
basado en FRET sensible a las interacciones en la región
N-terminal de c-Src

Guillermo Iruela Martin

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Drug discovery with a FRET-Biosensor of scaffolding interactions in the N-terminal region of c-Src

Descubrimiento de fármacos mediante un biosensor basado en FRET sensible a las interacciones en la región N-terminal de c-Src

Guillermo Iruela Martin



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de doctorado: Química Orgánica HDK16

Drug discovery with a FRET-Biosensor of scaffolding interactions in the N-terminal region of c-Src

Descubrimiento de fármacos mediante un biosensor basado en FRET sensible a las interacciones en la región N-terminal de c-Src

Memoria presentada por:
Guillermo Iruela Martin
para obtener el grado de doctor en Química

Co-director y tutor: Prof. Miquel Pons
Departamento de Química Inorgánica y Orgánica
Universidad de Barcelona

Co-director: Dra. Laura Nevola
CSO/COO de IDP Pharma

Doctorado Industrial realizado en IDP Pharma – UB

Departamento de Química Inorgánica Orgánica
Facultad de Química

Universidad de Barcelona
Julio 2021

*Las dificultades preparan a
a personas comunes para
destinos extraordinarios*

C.S. Lewis

Agradecimientos académicos

Para empezar agradecer a Miquel Pons y Laura Nevola la oportunidad y la experiencia de realizar un doctorado, agradecerles su dedicación y ayuda en todo momento para resolver dudas o cualquier problema, han sido varios años de relación en los cuales he podido aprender de ellos y en los que les doy las gracias por la oportunidad que me han dado.

Hacer especial mención a mi tutor, Miquel que ha sido una persona que he admiro y que siempre ha conseguido devolverme mi ganas de querer aprender más, de buscar las respuestas. Para mi, sin lugar a dudas, una persona con una mente extraordinaria con la que siempre puedes encontrar respuestas para producir nuevas incógnitas. Siempre ha sido un tutor que me ha guiado y enseñado en todo momento de una manera ejemplar y si como tutor es extraordinario, en el aspecto humano, tampoco se quedo nunca atrás. Por toda tu ayuda y todo el esfuerzo y paciencia conmigo, gracias de corazón.

Seguidamente agradecer a diferentes miembros del laboratorio con los que he tenido el gusto de trabajar y que me han acompañado durante este viaje. Empezar por el Dr. João M.C. Teixeira con el que empecé este viaje durante mi tesina de Máster el cual me enseñó gran parte de lo que se hoy en día, agradecer su enseñanza y consejos para todo, tanto para la ciencia como la vida. No puedo dejar mucho más atrás a la futura Dra. Laareb Irrem Mohammad Jabeen, mi compañera de laboratorio durante todo este proceso, siempre tuvo una paciencia inmensa conmigo y cualquier duda por pequeña que fuese, me la respondía, por todos esos ratos juntos mano a mano en el laboratorio, gracias. Mencionar también al Dr. Miguel Arbesú Andrés del cual también pude aprender mucho y del cual guardo un grato recuerdo. Finalmente acabar con estudiantes que han hecho de este proyecto algo de lo que además de investigar, poder disfrutar de enseñar, aveces aprender y otras reír, como podría ser con Nabil Ajali Hernández, que a día de hoy aun lo considero un buen amigo, también agradecer a Montse Lopez y Hector Fuentes que me vieron empezar este proyecto y con los que he compartido dudas, pero también buenos momentos. Otro grupo de estudiantes a los que agradecer son los que han estado al final del camino y que han hecho más llevadero este proceso final, en especial a Alejandro Fernández que ha cogido las riendas de mi trabajo, sin dejarme a Fco. Javier Carvajal que siempre amenizó el ambiente del laboratorio. Se que me dejo a muchos, pero me es imposible ponerlos a todos, solo puedo daros las gracias de corazón y sabed que os guardo con cariño dentro de mi.

También quiero agradecer a aquellas personas que como Miquel me inspiraron a querer más y saber más, desde el instituto hasta la universidad: José Vicente, Pere Romea, Juan Carlos Paniagua y muchos más que me han llevado por el camino incansable del conocimiento.

Agradecimientos personales

En lo personal querría agradecer a mis padres, Maria Del Carmen y Felix, sin los cuales no podría ser esto posible, gracias por vuestra dedicación, amor y paciencia. Y con inculcarme los valores de los que gozo hoy en día y que me han llevado hasta aquí. Agradecer a mi hermano Alejandro, que decir más allá de que siempre ha estado ahí, para lo bueno y para lo malo, y que siga siendo así. Agradecer a la familia Iruela y Martin que siempre me han dado amor, cariño y soporte.

También hacer especial mención a Pedro Herruzo, otro futuro PhD sin el cual esto no sería posible, siempre has sido un ejemplo de superación para mí. Hacer mención especial por todos aquellos amigos que aun conservo del instituto Safa-Horta que han hecho siempre más ameno todo este proceso y que les agradezco de corazón todo su enorme paciencia conmigo y mi mente tan difusa para algunas cosas. Noemi, Sandra, Juan, Mar, Marta, Marc, Vane, Alba, gracias por todo. Como no quiero dejar a nadie en el tintero, también agradecer a los compañeros de universidad con los que aun me veo y que siempre agradezco de volver a encontrarme aunque pasen los años. Finalmente agradecer a los compañeros que he hice en el Máster y que aun conservo, en especial a la pequeña familia de montañeros creada: Juan, Manu, Pep, Rafa, Imanol, gracias por todas esas horas entre montañas haciendo que valga la pena cada cima y cada reto.

Por ultimo agradecer a todas aquellas personas que estuvieron conmigo de manera sentimental en este proceso por el cual solo tengo palabras de agradecimientos por vuestro apoyo y soporte, pero sobretudo por vuestro amor, ya que es el mayor motor del mundo, gracias.

Tabla de contenidos

Agradecimientos académicos	3
Agradecimientos personales	4
Lista de Abreviaturas	12
Capítulo 1	14
Introducción	14
1.1. Descubriendo c-Src.....	14
1.2. Estructura, localización y regulación de c-Src.....	16
1.2.1. Familia de quinasas Src (<i>SFK</i>).....	17
1.2.1. Dominio SH4.....	18
1.2.2. Dominio Único.....	19
1.2.3. Dominio SH3.....	19
1.2.4. Dominio SH2.....	20
1.2.5. Dominio catalítico SH1.....	20
1.2.6. Regulación auto-inhibidora de c-Src.....	21
1.3. Función, señalización celular y cáncer en c-Src.....	22
1.4. Regiones desordenadas de proteínas como dianas terapéuticas.....	26
1.5. Fluorescencia.....	29
1.5.1. FRET.....	30
1.6. Proteínas fluorescentes y biosensores-FRET.....	33
1.6.1. Maduración de las proteínas fluorescentes.....	33
1.6.2. Tipos de Biosensores-FRET.....	34
1.6.3. Parejas de Biosensores-FRET.....	36
1.6.4. Proteínas mClover3 y mRuby3.....	37
Objetivos	40
Capítulo 2	41
Diseño y caracterización del Biosensor CLOBY	41
2.1. Diseño del Biosensor.....	41
2.2. Primer prototipo del sensor: Rover.....	42

2.2.1. Estudio de la concentración de Rover.....	43
2.2.2. Estudio de la temperatura de Rover.....	44
2.2.3. Efecto del péptido VSL12 sobre Rover.....	44
2.2.4. Estudio de Rover en RMN.....	45
2.3. Diseño optimizado: CLOBY.....	48
2.4. Estudio por RMN de CLOBY y CLOBY-TEV.....	51
2.5. Efecto de la concentración sobre la fluorescencia de CLOBY.....	54
2.6. CLOBY como sensor ambiental de Src.....	56
2.6.1. Efecto de la fuerza iónica.....	56
2.6.3. Fosforilación de CLOBY.....	59
Capítulo 3.....	62
Cribado de una quimioteca para identificar moléculas que interactúen con la región reguladora N-terminal de Src.....	62
3.1. Introducción.....	62
3.2. Preparación de la Quimioteca.....	62
3.2.1 Preparación del cribado inicial.....	63
3.2.2 Medidas de fluorescencia en placas.....	63
3.3. Primer Cribado.....	64
3.4. Segundo Cribado.....	65
3.3. Tercer cribado.....	67
Capítulo 4.....	70
Seguimiento de los resultados del cribado.....	70
4.1. Estudio por RMN de la interacción con USH3.....	70
4.2. Ensayos con líneas celulares.....	78
4.2.1 Ledipasvir y Daclastavir.....	83
Conclusiones.....	89
Materiales y métodos.....	91
5.1. Clonaje y Expresión de Proteínas.....	91
5.1.1. Expresión de Proteínas.....	91
5.2. Purificación de proteínas.....	93
5.2.1. Extracción de la proteína soluble.....	93

5.2.2. Purificación por Tag de afinidad: His-Tag.....	93
5.2.3. Purificación por “FPLC” (Fast Protein Liquid Chromatography).....	93
5.2.4. Análisis por Masas (LC/MS).....	94
5.2.5. Fosforilación <i>in vitro</i> de Thr37 y Ser75 del USH3 de CLOBY con Cdk5:.....	94
5.3 RMN.....	95
5.3.1 Preparación de muestras RMN.....	95
5.3.2 Análisis RMN.....	95
5.4 Fluorescencia.....	95
5.4.1 Cribado por fluorescencia.....	95
5.4.2 Medidas espectrales de fluorescencia.....	96
5.5 Lista de Tampones y Soluciones acuosas.....	96
Apéndice.....	99
Bibliografía.....	100

Tabla de Figuras

Figura 1.1: Línea histórica de eventos claves de Src hasta el 2013.....	15
Figura 1.2: Representación de los dominios de c-Src.....	18
Figura 1.3: Dominios Único de las SFK.....	18
Figura 1.4: Mecanismo de unión a membrana.....	20
Figura 1.5: Estructura de rayos X para c-Src cerrada y abierta.....	23
Figure 1.6: Mecanismo de activación de c-Src.....	24
Figure 1.7: Mapa del “kinome” humano.....	27
Figure 1.8: Proceso oncogénico regulado por c-Src.....	28
Figura 1.9: Inhibidores de quinasa aprobados hasta 2016 superpuestos sobre el “kinome”.....	29
Figura 1.10: Principios básicos de fluorescencia y FRET.....	36
Figura 1.11: Mecanismo de maduración del cromóforo.....	40
Figura 1.12: Espectros normalizados de absorción y emisión de FPs representando un par FRET.....	43
Figura 1.13: Estructura tridimensional de proteínas fluorescentes.....	43
Figura 2.1: Representación de los dominios de Rover.....	49
Figura 2.2: Efecto de la concentración sobre la fluorescencia de Rover.....	53
Figure 2.3: Variación de la intensidad de la fluorescencia de Rover con la temperatura.....	54
Figura 2.4: Resultados del efecto del péptido de poli-prolina en Rover.....	55
Figura 2.5: Diagrama de perturbación de desplazamientos químicos en los dominios SH4 y único de Rover respecto a USH3.....	56
Figura 2.6: Perturbación de desplazamientos químicos causada por el péptido VSL12.....	57
Figura 2.7: Estructura de dominios y secuencia de CLOBY.....	59
Figura 2.8: Espectros de fluorescencia de CLOBY y CLOBY_TEV.....	59
Figura 2.9: Espectro de masas deconvolucionado de la segunda especie resultante de la truncación de CLOBY.....	60
Figure 2.10: Espectro de masas deconvolucionado de CLOBY.....	61
Figura 2.11: Espectros ^1H - ^{15}N -HSQC de CLOBY, CLOBY-TEV y USH3.....	62
Figura 2.12: Expansión de una superposición de regiones seleccionadas de los espectros ^1H - ^{15}N -HSQC de CLOBY, CLOBY-TEV y USH3.....	62

Figura 2.13: Perturbación del desplazamiento químico inducida por la presencia de las proteínas fluorescentes fusionadas en los extremos de USH3 respecto a USH3 nativo.....	67
Figura 2.14: Espectros de fluorescencia normalizados a diferentes concentraciones para CLOBY y CLOBY-TEV.....	70
Figura 2.15: Espectros de fluorescencia de CLOBY y CLOBY-TEV dependiente de [NaCl].....	72
Figure 2.16: Espectros de fluorescencia a diferentes pH de CLOBY y CLOBY-TEV.....	73
Figura 2.17: Espectros de RMN de las formas no fosforiladas y fosforiladas de CLOBY y USH3.....	74
Figura 2.18: Espectros de fluorescencia normalizados de CLOBY fosforilada y sin fosforilar.....	75
Figura 2.19: Radios hidrodinámicos de CLOBY y CLOBY fosforilada.....	76
Figure 3.1.: Espectros de Fluorescencia de CLOBY y CLOBY-TEV superpuestos con sombreado.....	79
Figura 3.2: Clasificación del cribado inicial.....	80
Figura 3.3: Distribución de las medidas en el segundo cribado.....	81
Figura 3.4: Espectros de fluorescencia de CLOBY, CLOBY-TEV y en presencia de compuesto.....	82
Figura 3.5: Espectros de fluorescencia de CLOBY, CLOBY-TEV y en presencia de compuesto.....	83
Figure 3.6: Espectros de fluorescencia de CLOBY, CLOBY-TEV y en presencia de compuesto.....	84
Figura 4.1: Espectro de fluorescencia de CLOBY, CLOBY-TEV con Flavoxato.....	88
Figura 4.2: Perturbación del desplazamiento químico inducido por la adición de ligandos de la tabla 5 sobre el USH3 respecto al nativo.....	90
Figura 4.3: Perturbación del desplazamiento químico inducido por la adición de ligandos de la tabla 5 sobre el USH3 respecto al nativo.....	91
Figura 4.4: Efecto del Flavoxate y el ABT-199 en la supervivencia celular.....	92
Figura 4.5: Efecto de los compuestos de la tabla 6 en la supervivencia celular.....	97
Figura 4.6: Efecto de los compuestos de la tabla 6 en la supervivencia celular.....	98
Figura 4.7: (a) Espectro de fluorescencia de CLOBY a diferentes concentraciones de Ledipasvir.....	98
Figura 4.8: Radios hidrodinámicos de CLOBY en presencia creciente de ledipasvir	99
Figura 4.9: Estructura del ledipasvir.....	100
Figura 4.10: Estructura del daclastavir.....	100
Figura 4.11: Síntesis propuesta para la formación del daclastavir y posterior transformación al ledipasvir.....	101
Figura 4.12: Efecto del daclastavir y el ledipasvir en la supervivencia celular.....	102
Figura 2.13: Efecto del daclastavir y el ledipasvir en supervivencia celular.....	102

Figure A.1: Espectros ^1H - ^{15}N -HSQC de Rover y Rover con peptido de poliprolina.....114

Indice de Tablas

Tabla 1: Ejemplos de sensores FRET basados en su transformación bioquímica.....	41
Tabla 2: Propiedades fotofísicas de proteínas fluorescentes rojas y verdes.....	44
Tabla 3: Valores de r_0 de pares-FRET de GFP y RFP.....	45
Tabla 4: Resultados del DLS de CLOBY, CLOBY-TEV y CLOBY, CLOBY-TEV fosforilados.....	76
Tabla 5: Estructura de compuestos seleccionados en el segundo cribado.....	87
Tabla 6: Compuestos ensayados en diferentes líneas celulares (A549, H187, MM1.S, RPMI).....	96
Tabla 7: Resultados de toxicidad en diferentes líneas celulares para ledipasvir y daclastavir.....	101
Tabla 8: Construcciones genéticas utilizadas durante la tesis.....	106

Lista de Abreviaturas

- ATP** – Adenosina Triphosphate (adenosina trifosfato)
- CLOBY** – Construcción formada por mClover3 y mRuby3 unidos por C-t y N-terminal al USH3
- CFP** – Cyan Fluorescent Protein (proteína fluorescente cian)
- CSP** – Chemical Shift Perturbation (perturbación del desplazamiento químico)
- DLS** – Dynamic Light Scattering (dispersión dinámica de luz)
- EDTA** – EthyleneTiamineTetraacetic Acid
- FC** – Fuzzy Complex (complejo difuso)
- FP** – Fluorescent Protein (proteína fluorescente)
- FRET** – Förster Resonance Energy Transfer (transferencia de energía de resonancia de Förster)
- GFP** – Green Fluorescent Protein (proteína fluorescente verde)
- HSQC** – Heteronuclear Single Quantum Coherence
- HTS** – High Throughput Screening (criado de alto rendimiento)
- IDP** – Intrinsically Disordered Protein (proteína intrínsecamente desordenada)
- IDR** – Intrinsically Disordered Region (región intrínsecamente desordenada)
- IPTG** – IsoPropil- β -1-TioGalactopiranosido
- LC/MS** – Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (cromatografía de líquidos con espectrómetro de masas)
- NMT** – N-Miristoil Transferasa
- nRTK** – non Receptor Tyrosine Kinase (proteínas no receptoras de tirosina quinasa)
- OD** – Optical Density (densidad óptica)
- PIC** – Protease Inhibitor Cocktail (cóctel inhibidor de proteasa)
- PKA** – Protein Kinase A (proteína quinasa A)
- PMSF** – Phenylmethylsulfonyl Fluoride (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
- PPII** – PolyProlina tipo II helice
- RFP** – Red Fluorescent Protein (proteína fluorescente roja)
- RMN** – Resonancia Magnética Nuclear
- Rover** – Construcción formada por mCherry y GFP unidos por C-t y N-terminal al USH3(**Rojo+verde**)
- RSV** – Rous Sarcoma Virus

RTK – Receptor Tyrosine Kinase (proteínas receptoras de tirosina quinasa)
SAXS – Small Angle X-ray Scattering (dispersión de rayos X de ángulo reducido)
SD – Standard Deviation (desviación estándar)
SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
SFK – Src Family Kinases (familia Src de quinasas)
SH – Src Homology domains (dominios homólogos de Src)
TEV – Tobacco Etch Virus (virus del grabado del tabaco)
TRIS-HCL – TRIS(hydroxymethyl)aminomethane HydroChLoride
ULBR – Unique Lipid Binding Region (región de unión lipídica del dominio Único)
USH3 – Construcción formada por los dominios SH4, Único y SH3 de c-Src
USrc – Construcción formada por los dominios SH4 y Único de c-Src
YFP – Yellow Fluorescent Protein (proteína fluorescente amarilla)

Capítulo 1

Introducción

1.1. Descubriendo c-Src

En los 1910s Peyton Rous observó que era posible trasplantar células fusiformes del sarcoma de una gallina enferma a una gallina sana y inducir la misma enfermedad (Rous, 1910). Poco después, Rous encontró que un filtrado de células era capaz de inducir tumores (Rous, 1911) lo que llevó a la identificación de un virus, el virus del sarcoma de Rous (“Rous Sarcoma Virus”, RSV) como causante del cáncer. Por el descubrimiento de la inducción de tumores vía viral se le otorgó a Rous el premio Nobel de Medicina en el 1966. La historia de c-Src tiene un siglo de descubrimientos que han contestado muchas preguntas pero abierto otras tantas (figura 1.1)

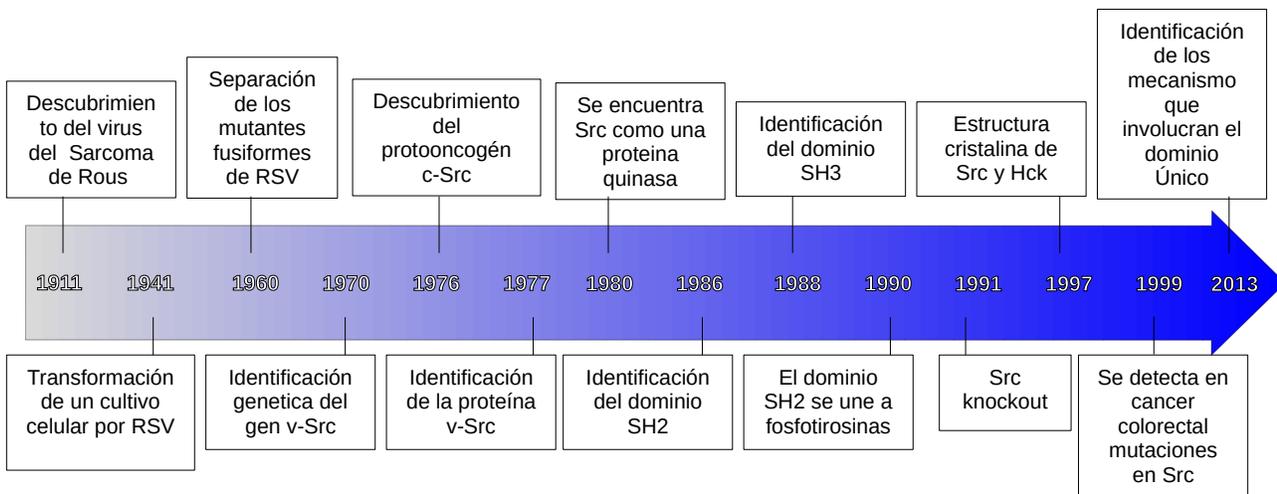


Figura 1.1: Línea histórica de eventos claves de Src hasta el 2013. Reproducido con permiso de Martin (2001)

A partir de mediados del siglo XX se comenzó a realizar una amplia investigación en una gran variedad de cepas virales. En estos años, algo que sorprendió a la comunidad científica fue la capacidad del RSV, y una variedad de retrovirus de ARN similares, para inducir la transformación celular en diferentes variedades de células mamarias. Este hecho cuestionó lo establecido hasta el momento sobre virus oncogénicos. Durante la década de los 70s y tras muchas investigaciones se identificó el factor transformador: el gen viral de *src* y la proteína que produce (*v-Src*) (Brugge et al., 1978; L. H. Wang et al., 1976). A finales de la década se descubrió su análogo celular: *c-Src* (D. Stehelin et al., 1976; Dominique Stehelin et al., 1976).

Estas evidencias llevaron a la conclusión de que el gen *v-Src* tenía origen celular y no viral. Este gen está ampliamente extendido en los organismos vertebrados. Debido a estos y otros hallazgos en la investigación de *Src* en 1989 se le otorgó a J. Michel Bishop y Harold E. Varmus el Premio Nobel, el segundo sobre *Src*. En 1969 sería la primera vez que se habla de oncogén (Huebner & Todaro, 1969), refiriéndose al contenido viral endógeno transportado por las células que una vez insertado y activado tiene la capacidad de causar cáncer. Posteriormente se definió el concepto de protooncogén, distinto al

de oncogén, para referirse a genes naturalmente presentes en el organismo y que carecen de capacidad transformadora si no han sido mutados o sobre-expresados previamente.

Src fue, el primer protooncogén identificado, y constituyó un descubrimiento pionero, que abrió una puerta a toda una área de investigación sobre el papel de estos en cáncer (Bister, 2015). La proteína c-Src es una tirosina quinasa, pero no fue hasta 1980 (Hunter & Sefton, 1980) que se caracterizó como tal, revelando un nuevo tipo de enzimas que más adelante se encontró que era fundamental para la señalización celular. La forma viral de Src tiene más actividad que c-Src y posee la capacidad de transformar esencialmente por la pérdida de la región reguladora C-terminal. Las múltiples variantes virales, con mutaciones adicionales dieron origen a un estudio exhaustivo que se ha mantenido durante más de treinta años sobre la modulación, arquitectura y función del dominio c-Src.

Toda la investigación realizada entorno a c-Src ha contribuido de manera significativa al campo de la biología estructural. Algunos de los motivos estructurales presentes en Src están presentes en otras proteínas y, de hecho, se denominan dominios homólogos de Src (SH#). Entre estos nuevos dominios, aparte del esencial y catalítico SH1, tenemos otros dos dominios que interactúan con proteínas como son el SH2 y el SH3 (Mayer et al., 1988; Sadowski et al., 1986). Dentro de las proteínas de señalización es común observar este tipo de dominios funcionales.

En particular los dominios SH2 se caracterizan por su capacidad de unirse a residuos de tirosina fosforilados, como los que se generan por la propia acción de quinasas de tirosina, como Src. El concepto de señalización celular basado en la fosforilación requiere la presencia de elementos que generen las señales, y elementos que detecten el efecto de la fosforilación.

Las cadenas de señalización celular comprenden conjuntos de proteínas que cambian su estado por la acción de un efector “corriente arriba” y de esta forma adquieren la capacidad de activar otras proteína “corriente abajo”, de forma que un estímulo primario, habitualmente recibido por un receptor en la superficie celular, eventualmente desencadena una respuesta global de la célula, a menudo definida por cambios en la expresión de determinados genes (Pawson, 2004; Sudol, 1998).

Además de estos tres dominios globulares, con una estructura tridimensional bien definida, Src posee una región N-terminal mucho menos comprendida. Actualmente, se sabe que esta región corresponde a lo que se conoce como una región intrínsecamente desordenada. Las regiones desordenadas no pueden cristalizarse y, por tanto, no pueden estudiarse por cristalografía de rayos X, dejando una zona de oscuridad alrededor de este tipo de regiones. Las regiones intrínsecamente desordenadas no poseen estructura terciaria y existen en multitud de conformaciones en rápido intercambio, por tanto se trata de regiones altamente dinámicas. (Dunker et al., 2001; Resh, 1993). La región formada por los primeros 16 residuos, rica en aminoácidos básicos y modificada mediante un grupo miristoilo, constituye un elemento de unión a membranas. Esta región diferenciada recibe el nombre de dominio SH4 (Patwardhan & Resh, 2010; Silverman & Resh, 1992).

Si comparamos c-Src con sus proteínas homólogas (ver figura 1.3) nos encontramos con que los dominios globulares están altamente conservados, pero al fijarnos en la región desordenada N-terminal nos encontramos en que tanto la secuencia como la longitud están pobremente conservadas entre sí. Esto derivó en nombrar esta región como dominio Único dado la singularidad de que cada proteína tenía su propio y distintivo dominio Único desordenado.

1 Hasta entonces solo se tenía conocimiento de las quinasas de treonina y serina. En aquellos tiempos se pensaba que Src fosforilaba residuos de treonina

No fue hasta la década de los 2000s que las regiones o proteínas intrínsecamente desordenadas no empezaron a estudiarse en profundidad, ya que hasta entonces estas regiones se consideraban solo de unión o de espaciadores entre dominios. Inicialmente en c-Src se consideró el dominio Único como una simple ligadura entre el dominio SH4 de unión a lípidos y la zona plegada (dominios SH1,SH2 y SH3) pero en las ultimas décadas se han descrito elementos funcionales de esta región, como la interacción con el receptor NMDA a través de la proteína ND2(Gingrich et al., 2004).

Posteriormente, en nuestro grupo se encontró que el dominio Único tenía interacción con la proteína calmodulina unida a calcio (Pérez et al., 2013a). En el mismo estudio se encontró que había una región específica del dominio Único que interactuaba con membranas lipídicas. A esta región específica se la denominó como ULBR (“Unique Lipid Binding Region”, región única de unión a lípidos). Existen diferentes lugares de fosforilación en los dominios SH4 y Único (Amata et al., 2013a) (Amata et al., 2014). La función de estos lugares de fosforilación aun es poco clara pero se sabe que la fosforilación de S17 inhibe la unión a lípidos por parte del SH4. Sobre otras fosforilaciones, como las de T37 y S75, se han encontrado indicios que sugieren que intervienen en la activación de Src, interrumpiendo la interacción entre el dominio SH2 y Y527/Y530 y facilitando la desfosforilación por proteínas tirosina fosfatasas (Shenoy et al., 1992; Stover et al., 1994).

Para acabar, después de un siglo de investigaciones y estudios desde el descubrimiento del RSV y los protooncogenes (y c-Src entre estos), hoy día podemos encontrar que son objeto de estudio para el tratamiento de varios tumores humanos como podremos ver en el apartado 1.3.

1.2. Estructura, localización y regulación de c-Src

En la sección anterior introducimos como c-Src tiene dominios homólogos en otras proteínas. Podemos entender los dominios como bloques de construcción funcionales que están presentes de manera extendida en la naturaleza y en distintas disposiciones. Estos bloques de construcción pueden identificarse por su plegamiento común y función básica conservada, aunque hay pequeñas diferencias en la secuencia de un mismo dominio entre diferentes proteínas, que modifican su especificidad.

Mirando la base de datos Pfam (Finn et al., 2016) encontramos mas de 100 tirosina quinasa que comparten la misma estructura de dominios que c-Src: Una corta cola reguladora en C-terminal, un SH1 catalítico, los dominios SH2 y SH3 que forman un casete precedido por una región desordenada en N-terminal, más variable. Las proteínas SFK (*Src Family Kinase*) que se unen a membrana también tiene un SH4. En la siguiente figura presentamos la secuencia y dominios de c-Src (figura 1.2).

Dentro de las proteínas tirosina quinasa podemos encontrar dos grandes grupos las receptoras (RTKs, “Receptor Tyrosine Kinase”) y las no receptoras (nRTKs, “non Receptor Tyrosine Kinase”). Comparten en común que son proteínas asociadas a la transducción de señales en la membrana celular y difieren en que las RTKs contienen dominios transmembrana y receptores extra-celulares unidos al dominio quinasa intracelular, mientras que las nRTKs son básicamente intracelulares (figura 1.3). Es importante destacar que el anclaje a membrana es esencial para la activación, localización celular, transporte y en última instancia de la actividad de las nRTKs (Patwardhan & Resh, 2010; Resh, 2006). La región N-terminal intrínsecamente desordenada es la responsable de anclarse en la membrana para las nRTKs que coinciden con c-Src en su arquitectura.

1.2.1. Dominio SH4

En anteriores secciones hablamos del mecanismo de anclaje a membrana, el cual depende de los 16 aminoácidos iniciales que tiene c-Src y que se denomina como el dominio SH4. Aun siendo una región desordenada, está altamente conservada en la familia de proteínas c-Src, las SFK. El proceso de unión a la membrana lipídica depende de un mecanismo de dos señales que implican la lipidación de la proteína y interacciones electrostáticas (Resh, 1999). Para que se de este proceso de unión es necesaria una modificación co-traduccional llamada miristoilación y que se lleva a cabo en el inicio de la cadena proteica mientras sale del ribosoma por parte de la N-miristoil transferasa (NMT). La secuencia inicial MgxxxZ (Z puede ser S o T y x cualquier aminoácido) es reconocida por NMT, que escinde la metionina inicial para generar un enlace amida entre el grupo miristato y la nueva glicina N-terminal.

Antes que c-Src viaje hasta la membrana para anclarse es necesaria la activación por fosforilación de la región C-terminal (ver más adelante). Debido a la hidrofobicidad de la membrana alrededor de 10 de los 14 carbonos del grupo miristato penetran en esta para anclarse, sin embargo esta unión es débil, con una K_d del orden de 10^{-4} M, escasa para proveer un anclaje estable.

En el dominio SH4 de c-Src hay otra región que se une a la membrana, son dos grupos de aminoácidos cargados positivamente ($^5\text{KSKPK}^8$ y $^{14}\text{RRR}^{16}$) que interactúan con la superficie de la cara intracelular de la membrana, que es rica en fosfolípidos ácidos generando una fuerte unión electrostática (Buser et al., 1994; Sigal et al., 1994) que al final resulta, junto al miristato, en un aumento en la afinidad de unión a membrana de $3 \cdot 10^3$ veces. Remarcar como dato curioso que SH4 es un dominio con apenas residuos hidrofóbicos, donde sólo el grupo miristoilo se inserta en la membrana pero no hay ninguna inserción por parte del resto del SH4. Podemos decir que el anclaje de c-Src a la membrana es como un clavo con pegamento alrededor que sujeta al resto de la proteína (figura 1.4).

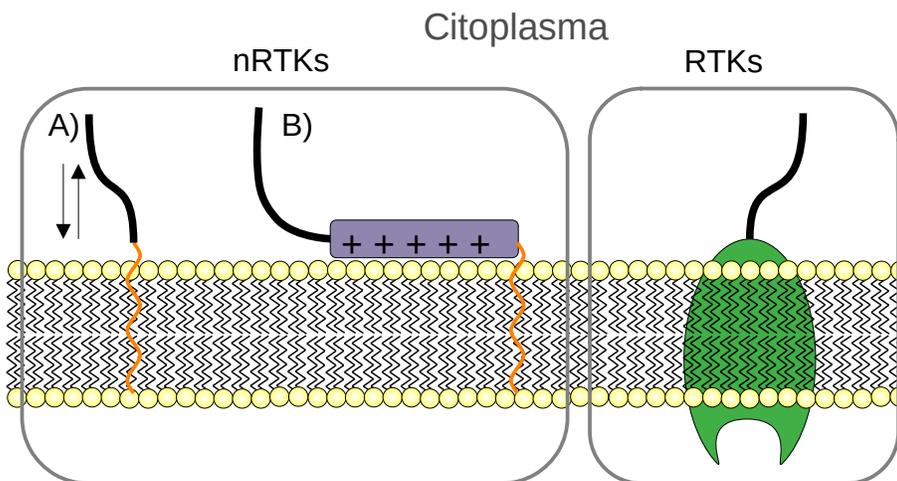


Figura 1.4: Mecanismo de unión a membrana de los receptores (derecha) y no receptores (izquierda) de tirosina quinasa. A) Solo miristoilación (labil); B) Miristoilación + electrostática.

1.2.2. Dominio Único

Después del dominio SH4 encontramos una región de 69 aminoácidos (17-85 desde N-terminal) que se encuentra poco conservada entre los miembros SFK, ya sea por longitud o por la secuencia de aminoácidos que lo constituye. Por ello a este dominio se le llama Único ya que cada SFK contiene el suyo propio con sus interacciones específicas. Estas regiones se ha encontrado que son intrínsecamente desordenadas para todas las SFK (Santos & Siltberg-Liberles, 2016). En nuestro laboratorio fuimos los primeros en conseguir evidencias en c-Src para esta propiedad mediante estudios de dispersión por SAXS (“Small-Angle X-ray Scattering”) y por RMN (Pérez et al., 2009). Otro hecho importante para entender la relevancia de este dominio Único es que tiene cierto grado de pre-organización, sin perder por ello su carácter dinámico típico de una región desordenada (más adelante ampliamos esta información).

En apartados anteriores comentamos la dificultad de estudiar las IDR (regiones intrínsecamente desordenadas) debido a sus propiedades dinámicas y, específicamente, la imposibilidad de estudiarlas por rayos X. Hasta hace poco más de una década, esta región de c-Src ha permanecido en la oscuridad. Ahora tenemos constancia de interacciones proteína-proteína y de fosforilación de diferentes residuos que afectan al comportamiento de c-Src. Se ha encontrado en nuestro grupo que hay una región de unión a lípidos compuesta por los aminoácidos S51, A53, A55 y el conjunto ⁶⁰EPKLFGGF⁶⁷ (Pérez et al., 2013b). En contraposición al SH4 el dominio Único si contiene residuos hidrofóbicos (L62, F64, F67) que se unen a la membrana, aunque curiosamente ninguno llega a penetrar la capa lipídica de fosfolípidos.

1.2.3. Dominio SH3

El primer dominio estructurado de c-Src, empezando por el extremo N-terminal, es el dominio SH3 el cual está plegado formando un casete que está conservado en todas las SFK (Yu et al., 1992). Cinco hebras beta anti-paralelas conforman este pequeño dominio plegado en forma de “sandwich” β de tan solo 65 residuos de largo. Hay dos pequeñas secciones que son relevantes para este dominio, entre las cadenas $\beta 1 - \beta 2$ y $\beta 2 - \beta 3$, encontramos dos “loops” prominentes y flexibles que reciben los nombres de RT y nSrc respectivamente. Entre las cadenas $\beta 3 - \beta 4$ se encuentra un pequeño “loop” distal y finalmente una pequeña vuelta 3_{10} hélice que se aloja entre las hebras 4 y 5. La principal función del SH3 es la del reconocimiento de hélices de poliprolina II (PPII), esto se consigue con la lámina β formada por las cadenas $\beta 2 - \beta 3$ y $\beta 4$ que genera una cubierta hidrofóbica esencial para este motivo. Esta unión entre el SH3 y un motivo de poliprolina (PPII) posee una doble funcionalidad: primeramente, a través de su unión a enzimas u otros sustratos, proporciona un elemento de localización; por otra parte, a través de la estabilización de una conformación inactiva de c-Src por interacciones intramoleculares (ver más adelante), interviene en la activación/desactivación de c-Src. Otras interacciones con ligandos, pero más débiles, son las que se encuentran en los “loops” RT y nSrc que están en los bordes del dominio plegado.

Recientes estudios en nuestro grupo han desvelado otras actividades biológicas por parte del SH3 como son la unión a lípidos y las interacciones con los dominios SH4 y Único (Pérez et al., 2013). Estas interacciones, demostradas por RMN, son de carácter débil con los “loops” RT y nSrc. Lo significativo es que estas regiones establecen una conexión entre la región desordenada N-terminal y el

conjunto de los dominios globulares. Estudios mas exhaustivos han revelado que el dominio SH3 actúa como un andamio para el IDR de c-Src por vía de múltiples interacciones débiles, llegando al presente a lo que conoce como el “fuzzy complex”(Maffei et al., 2015).

1.2.4. Dominio SH2

El siguiente dominio plegado que encontramos en c-Src es el SH2. El tamaño de este dominio es de unos 100 aminoácidos. La estructura terciaria viene dada por tres lámina- β y dos helices- α que se empaquetan cara a cara. La principal función de este dominio es ser un modulo de unión de fosfotirosina (pTyr). Aunque los residuos de pTyr son el principal motivo reconocido, residuos adyacentes -2 y +4 le dan una mayor afinidad y proporcionan selectividad en el reconocimiento. este sitio de unión se localiza en un saliente de la hoja, en el hueco generado entre los extremos de las hélices- α . Podemos decir que SH2 cumple una doble función, por un lado es autoregulator (apartado 1.2.6) y otro para atraer sustratos. Dentro de este dominio plegado encontramos una región rica en poliprolinas, una PPII de 22 aminoácidos que es esencial en el proceso de regulación de c-Src, además une el dominio SH2 con el SH1 (dominio catalítico).

1.2.5. Dominio catalítico SH1

Finalmente pasamos hablar del dominio mas grande de c-Src y que es el mas importante desde el punto de vista de la biología clásica al ser el dominio catalítico. Este dominio esta formado por 250 aminoácidos que constituyen un pequeño lóbulo en N-terminal y un lóbulo grande en C-terminal, que están unidos por bisagra flexible.

La unión a ATP se da justamente en esta bisagra entre lóbulos (W. Xu et al., 1997), donde dos áreas hidrofóbicas, cada una en un lóbulo, forman una columna catalítica que contiene el grupo adenosina. Se da una estabilización mayor en el sitio catalítico debido a una columna hidrófoba adicional (Foda et al., 2015). El lóbulo N esta integrado por cinco lámina- β y una hélice- α importante (α C) entre las β 3 y β 4, por otra banda el lóbulo C más grande se integra por cinco hélices- α compactadas.

En el C-terminal de c-Src encontramos otra región importante que es la cola reguladora (12 aminoácidos). En este segmento de c-Src encontramos un residuo crucial para la regulación, el Y530. En v-Src encontramos que este residuo falta, constituyendo así su capacidad transformadora (Tanaka & Fujita, 1986). Tras años de estudiar la c-Src y su actividad se ha observado que su regulación esta íntimamente relacionada con los dominios SH2, SH3 y junto a la fosforilación de Y530, sugiriendo que el plegamiento del SH1 tiene una construcción de “lock-on/off” (Matsuda et al., 1990) Con el uso de rayos-X se ha sido capaz de determinar la conformación activa y inactiva de c-Src (Cowan-Jacob et al., 2005; W. Xu et al., 1997, 1999)(figura 1.5) y su mecanismo de regulación con gran detalle, demostrando una reorganización de dominios a larga escala (Huse & Kuriyan, 2002). Una manera retórica de entender este mecanismo de auto-inhibición en c-Src fue la dada por (Harrison, 2003) que describe este proceso como el de “a latch, a clamp and a switch”,(un pestillo, una abrazadera y un interruptor), que pasaremos a describir en la siguiente sub-sección.

1.2.6. Regulación auto-inhibidora de c-Src

La fosforilación más común en células es la Y530 (Bjorge et al., 2000), normalmente debido a la mecanismo de fosforilación de las quinasas CHK y CSK. Esta fosforilación promueve que el dominio SH2 se reorganice hacia el de C-terminal regulador y se compacte contra el lóbulo C del dominio SH1, estando en posición contraria a la zona catalítica. Este cambio conformacional bloquea el sitio de unión de ATP por parte de la hélice α C del lóbulo, anulando así su actividad y dando lugar al concepto “pestillo” descrito antes por Harrison (2003).

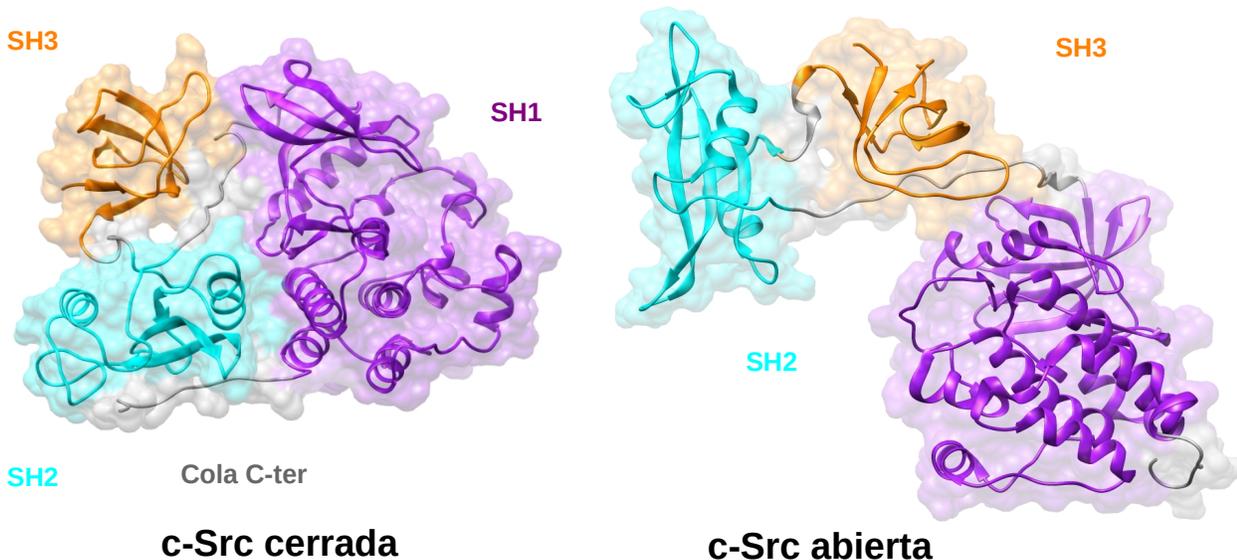


Figura 1.5: Estructura de rayos X para c-Src cerrada (PDB:2SRC) y abierta (PDB:1Y57). La leyenda de colores es la misma que en la figura 1.4. Falta la región intrínsecamente desordenada de N-terminal (IDR) que no aparece en ningún PDB.

Las interacciones entre el dominio SH3 y SH2-SH1 se ven facilitadas por este gran reordenamiento. Una región que no contiene exactamente el motivo (K/R)xxPxxP (x es cualquier residuo) de reconocimiento SH3, el conector asume una conformación de hélice PPII que se enlaza con el área hidrofóbica. El lóbulo N del SH1 está en contacto con este conector, permitiendo interacciones adicionales entre el dominio SH3 y el SH1, dejando este conector intercalado entre los dominios SH1 y SH3 aunque no sea un conector 100% específico. Este empaquetamiento estrecho deja el casete en una conformación bloqueada, dando lugar al concepto “abrazadera” mencionado previamente por Harrison (2003).

Finalmente las fosfatasas desfosforilan el pY530 y la conformación pestillo y abrazadera se liberan, dejando los dominios SH3 y SH2 oscilando hacia fuera mientras se separan del SH1 (ver figura 1.5), entretanto se genera un reordenación en la región catalítica dejando una conformación abierta y activa. Esta recolocación se debe a un desplazamiento de la hélice α C y la rotura del sitio catalítico. La fosforilación de Y419 en el “loop” de activación del lóbulo C aumenta la capacidad enzimática estabilizando aun más el sitio de unión de ATP. Este paso pasaría a ser el interruptor mencionado por Harrison (2003).

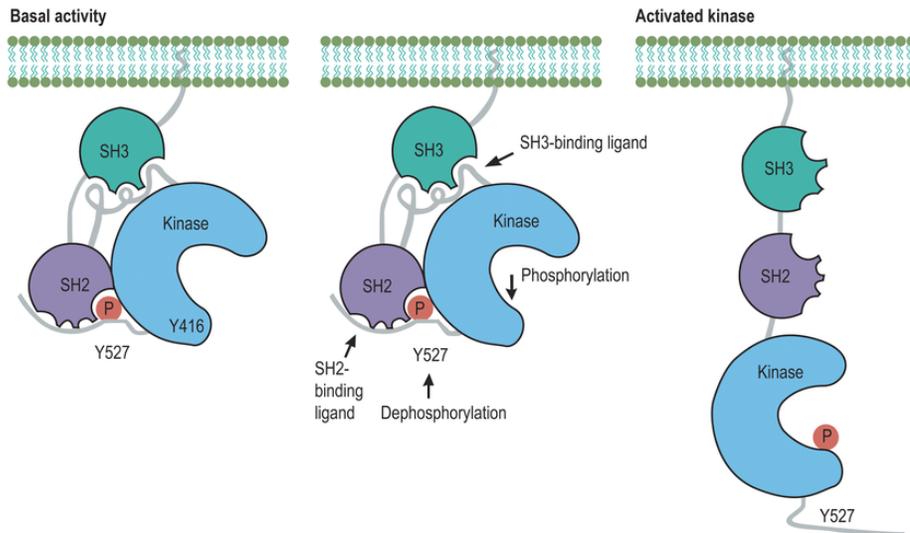


Figure 1.6: Mecanismo de activación de c-Src. Reproducido con permiso de Harrison (2003)

Aunque hasta hace poco permanecía la idea clásica de que el IDR de c-Src solo servía para anclar la región plegada a la membrana, entre otros porque la bisagra entre los dominios SH3 y Único reside en el lado opuesto a la unión por PxxP, en nuestro grupo se han obtenido resultados que confirman que la región N-terminal intrínsecamente desordenada (dominio SH4 y Único) interactúa con zonas funcionales importantes del dominio SH3. Con estos resultados es adecuado replantearse si el IDR está funcionalmente conectado de alguna manera con la zona plegada de c-Src (Maffei et al., 2015; Pérez et al., 2013b).

1.3. Función, señalización celular y cáncer en c-Src

La modificación postraduccional más extendida es la fosforilación de proteínas. Las quinasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato de una molécula de ATP a un grupo hidroxilo de las cadenas laterales de treonina, serina o tirosina. Las fosfatasas serán las enzimas encargadas del proceso inverso de recolectando de estos residuos los grupos fosfatos.

Este cambio postraduccional, aunque modesto, puede tener un importante efecto sobre el sustrato, por ejemplo; con interacciones del nuevo grupo di-anión fosfato con grupos cargados positivamente o la creación de enlaces con hidrógeno. Se puede entender esta fosforilación y desfosforilación como un mecanismo de encendido/apagado que es específico y reversible lo cual promueve una respuesta selectiva dependiente del tiempo por parte de un estímulo externo. Un control más exhaustivo de la actividad y expresión de las quinasas y fosfatasas proveerá de unos medios para un dominio más preciso y la manifestación de patrones y redes complejas.

Por todo esto podemos entender porque una de las principales funciones biológicas de la fosforilación es la señalización celular y el control de los ciclos celulares. La evolución de estas vías de señalización van de la mano con el aumento de complejidad en los organismos, siendo elementos reguladores centrales para el apropiado y coordinado comportamiento celular, fundamentalmente en organismo superiores. Una regulación anormal es más decisiva en la neoplasia, entendida como una des-regulación en la proliferación celular, con la capacidad de invadir y sobrevivir si es del tipo

maligna (Blume-Jensen & Hunter, 2001). La perturbación de este frágil equilibrio entre las funciones de crecimiento, división y apoptosis celular promueve la posibilidad de un cáncer.

El término “kinome” (G. Manning et al., 2002), hace referencia al conjunto de proteínas quinasas que residen en el genoma de una especie, para los humanos comprende más de 500 quinasas que suponen el 2% del genoma. Dentro de este “kinome” las fosforilaciones de serinas son las más usuales con un 86,4%, seguidas por las de treoninas (11,8%) y, por último, pero no menos importante, las de tirosina (1,8%) (Johnson, 2009). Siendo esta última la que tiene menos representación pero que experimenta un crecimiento exponencial con la aparición de los metazoos (animales) y por tanto asociadas a organismos complejos (Gerard Manning et al., 2002).

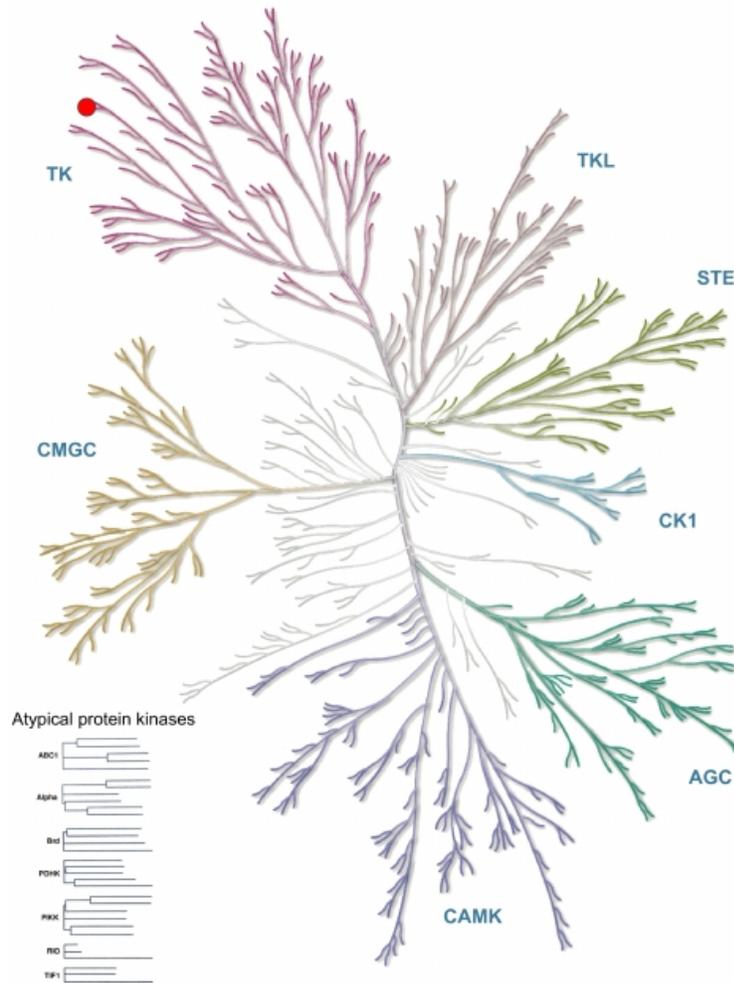


Figure 1.7: Mapa del “kinome” humano proporcionado por Cell Singaling Techonology, Inc. El círculo rojo representa la Src.

Las tirosina quinasas están infrarepresentadas respecto al resto de quinasas, tanto en su número total como en la cantidad de sustratos fosforilados pero tienen una gran relevancia en la transducción de señales (L. Wang et al., 2004). Concretamente, c-Src y su familia de quinasas (SFK) están íntimamente conectadas con una posición crítica en la señalización y controlan procesos celulares esenciales como la diferenciación, proliferación, motilidad y supervivencia (Thomas & Brugge, 1997). De esta manera,

cuando hay una respuesta anormal a estímulos, se generan una serie de respuestas en las vías de señalización que previenen un crecimiento descontrolado y que generan apoptosis.

Sabiendo que c-Src fue el primer protooncogén descubierto y que es un centro de señalización que se encuentra en la mayoría de tipos celulares, se empezó una búsqueda para encontrar como podría estar c-Src relacionada con el cáncer. Desde los principios de los 80s y durante los 90s hay numerosos estudios que destacan una sobre-actividad en c-Src para arias patologías tumorales tales como: cáncer de mama, colon, próstata, pulmón, vejiga, cerebro y páncreas, entre otros (R. B. Irby & Yeatman, 2000). Inesperadamente no se han encontrado casi mutaciones activadoras, una de las pocas es la informada en 1999 (Rosaly B. Irby et al., 1999), lo que si se ha encontrado es que si c-Src esta sobre-expresada con alta actividad esta íntimamente relacionada con el inició y especialmente con la progresión del tumor. Un ejemplo son los mecanismos dependientes de Src en la metástasis osea latente en el cáncer de mama (Zhang et al., 2009).

La relevancia de c-Src pasa por el hecho de que no solo esta proteína esta relacionada con procesos tumorales sino que muchos de sus sustratos también lo son, siendo en en un gran numero de casos una combinación con otros efectores celulares que promueven el potencial oncogénico de c-Src. Los colaboradores mas importantes asociados a c-Src son los receptores de EGF, la tirosina quinasa FAK y receptores de hormonas sexuales (Ishizawar & Parsons, 2004).

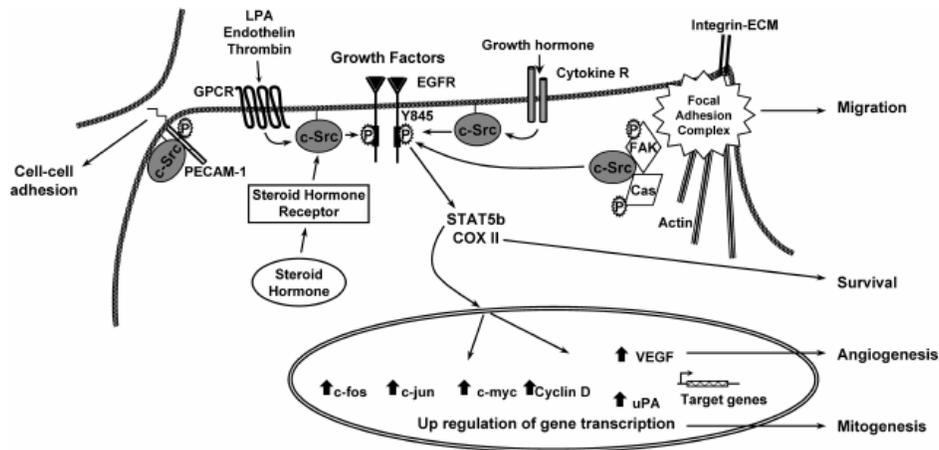


Figure 1.8: Proceso oncogénico regulado por c-Src. Reproducido con permiso de Ishizawar & Parsons (2004)

Siendo el cáncer colorectal uno de los más estudiados, se tiene conocimiento de que una sobre-actividad de c-Src esta en las etapas iniciales de la enfermedad, aumentando la progresión y asociado a un diagnostico precario (Cartwright et al., 1990; Robbins et al., 1993). Con estos resultados y otros encontrados que relacionan este tipo de proteínas con cáncer, las quinasa han pasado a ser una importante diana terapéutica durante los últimos 20 años (Zhang et al., 2009) constituyendo un buen ejemplo de farmacología molecular dirigida moderna.

Uno de los primeros fármacos desarrollados para una quinasa fue el imatinib, el cual actúa sobre la quinasa oncogénica Bcr-Abl y que sirve para tratar la leucemia de mielógena crónica, este nuevo fármaco supuso un hito en el campo (Capdeville et al., 2002). La FDA aprobó en el 2016 el uso de 28 inhibidores de tirosina quinasa, siendo la mayoría de inhibidores para enfermedades tumorales como diana terapéutica (Wu et al., 2016). La mayoría de estos inhibidores tienen acción en el sitio de unión de nucleótidos del dominio catalítico, siendo competidores de ATP.

Sin embargo, el problema surge al querer imitar o actuar donde el ATP generando algunos problemas importantes, sobretodo provenientes del sitio de unión de la diana terapéutica y su selectividad debido a lo usual que es en la naturaleza. El problema de la selectividad viene dado de que puede interferir con la actividad de otras quinasas que tengan un sitio de unión similar generando efectos inesperados. Se han encontrado mas de 500 tirosina quinasa que tienen unión de nucleótidos, y otras ~2000 proteínas que también tienen este sitio de unión, reflejando el problema de la selectividad para este tipo de inhibidores y dificultando la predicción de toxicidades inesperadas. El otro gran inconveniente es la farmacoresistencia adquirida, debido a mutaciones en el dominio catalítico, estas complicaciones suelen surgir de la fuerte influencia selectiva inducida por los efectos citotóxicos de la medicación/tratamiento.

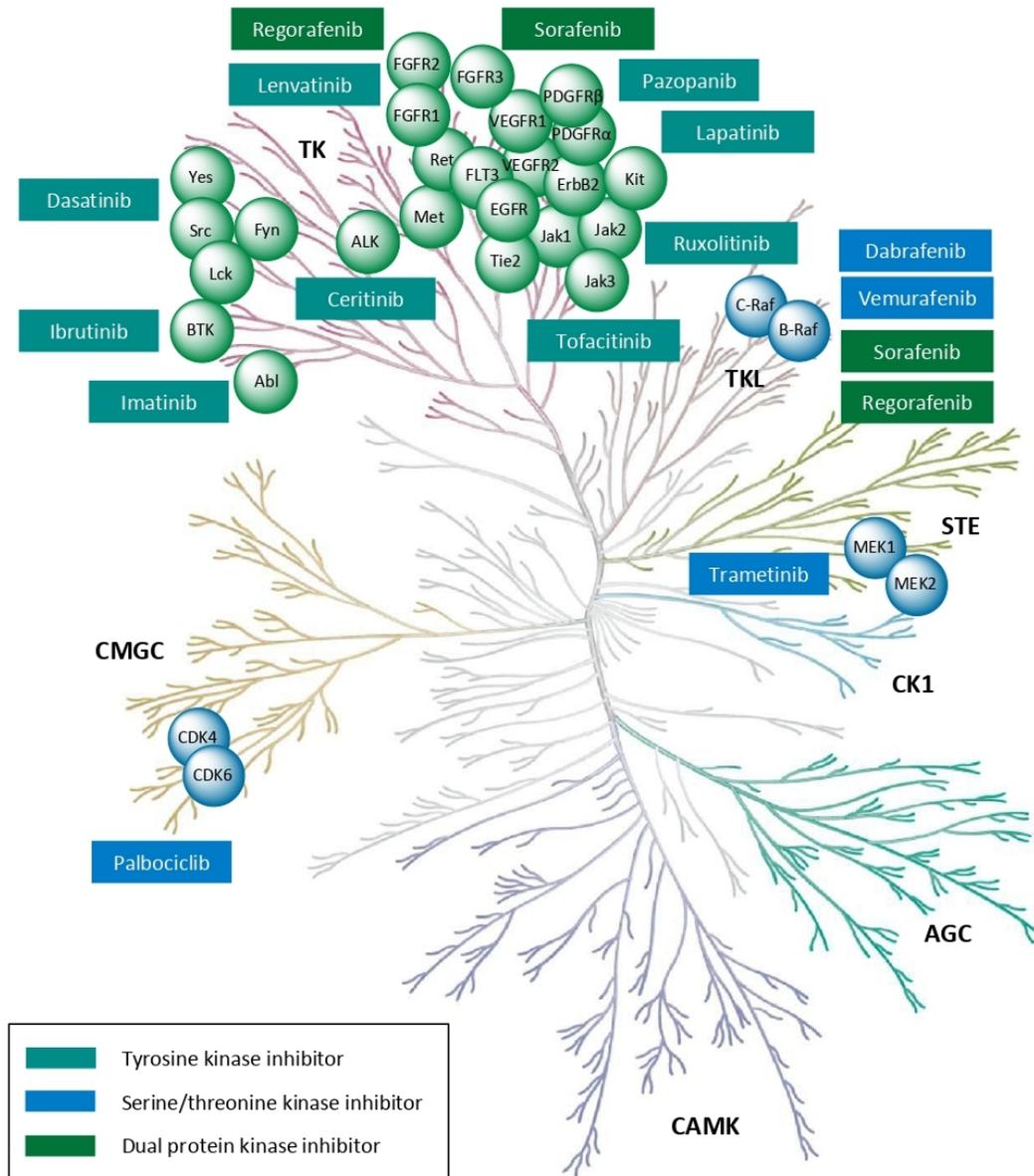


Figura 1.9: Inhibidores de quinasa aprobados hasta 2016 superpuestos sobre el “kinome” mostrados en la figura 1.7 con las enzimas objetivo. Reproducido con permiso de Wu et. al (2016).

Estos inconvenientes han hecho que se busquen alternativas para la inhibición de las quinasas, como por ejemplo aprovechar el efecto sinérgico de la combinación de varios fármacos, como el uso de varios inhibidores o un inhibidor con otro fármaco como la rapamicina, otro mecanismo desarrollado es el direccionamiento alostérico. Siendo el GNF-2 de este último tipo, es interesante porque este fármaco actúa sobre el sitio de unión del miristato en el Bcr-Abl (Fallacara et al., 2014). Debido al aumento de comprensión estructural de estas quinasas, sus mecanismos e interacciones, podemos esperar que se proporcione nuevos fármacos eficientes en un futuro próximo (Cowan-Jacob et al., 2014; Zhang et al., 2009), como se pretende realizar en esta tesis.

En nuestro caso particular de estudio c-Src, lo que nos hemos encontrado, a sido, que a pesar del fuerte conocimiento que se tiene de la proteína, las problemáticas descritas previamente han limitado mucho su éxito (Koscielny et al., 2017). A pesar de ello, hasta la fecha se han desarrollado tres inhibidores de c-Src que han logrado llegar a fase clínica IV de su investigación; Dasatinib, Bosutinib y Vandetanib. Hay otros inhibidores desarrollados que están aun en fase III como son el; Saracatinib, Ilorasertib, KX2-391 y el XL-228. Aunque todos están compitiendo con el ATP el KX2-391 tiene la peculiaridad de unirse a la región de unión a péptido del dominio SH1 catalítico.

La gran similitud estructural que hay entre c-Src y su familia de quinasas (SFK) impide la especificidad a la hora de buscar un fármaco solo de c-Src, siendo un asunto pendiente relevante para el diseño preciso de nuevas estrategias de inhibición terapéutica. A día de hoy el desarrollo de fármacos sobre c-Src sigue abierto y pongo énfasis en el hecho que se ha de buscar otros mecanismos que no sean el antagonico de ATP, dirigiéndose a otras regiones, como utilizar métodos alostéricos, mejorando la eficiencia la especificidad y evitando problemas de toxicidad fuera de nuestra diana de interés (Dar & Shokat, 2011). Para esta tesis nos fijamos en el dominio Único de c-Src, el cual seria una lugar de acción específico y discriminatorio respecto las otras SFK.

1.4. Regiones desordenadas de proteínas como dianas terapéuticas

El diseño de fármacos contra dianas con estructuras rígidas bien definidas es un campo de trabajo relativamente bien establecido sobre el que trabajan un gran número de grupos académicos e industriales. La cristalografía de rayos X ha sido el motor del diseño racional de fármacos basado en la optimización de moléculas con capacidad de unirse a cavidades bien definidas en la estructura tridimensional de la proteína y directamente conectadas con las regiones funcionalmente importantes, como el centro activo de enzimas.

Las posible dianas terapéuticas que no tienen cavidades bien definidas, se consideran “undrugable”, aunque hay autores que prefieren en calificativo menos negativo de “dianas especialmente difíciles” o “recalcitrantes”.

Entre las dianas recalcitrantes se encuentran las interacciones proteína-proteína, en las que la superficie de contacto es habitualmente muy extensa, con múltiples contactos electrostáticos e hidrofóbicos distribuidos en una región relativamente plana de contacto entre ambas proteínas. De las aproximadamente 650.000 interacciones proteína-proteína, solamente un 2% habían sido consideradas dianas terapéuticas (Mabonga & Kappo, 2019)

Algunos de estos proyectos han tenido éxito, como el caso de Venetoclax (Green, 2016) que fue el primer fármaco aprobado por la FDA dirigida a la interacción proteína-proteína entre BCL2 y BAX/BAK. La inhibición de esta interacción desbloquea la apoptosis de células cancerosas.

Estimulados por la crisis sanitaria de la COVID-19, un grupo de investigadores publicaron un estudio de las interacciones entre las proteínas de SARS-Cov-2 y proteínas humanas e identificaron 66 proteínas humanas para las cuales existían fármacos, 29 de ellos aprobados por la FDA para uso humano. Un estudio de estos compuestos permitió identificar algunos que mostraban actividad antiviral (Gordon et al., 2020).

Este ejemplo reciente ilustra un nuevo paradigma para el “diseño” de fármacos para dianas “recalcitrantes”: i) el diseño empieza con la comprensión de los mecanismos de actuación para identificar las dianas importantes; ii) el desarrollo de un proceso de cribado que permita enfocar la búsqueda sobre las regiones de interés; iii) se investigan exhaustivamente fármacos ya aprobados con el objetivo de lograr un reposicionamiento (“repurposing”) de los mismos.

Las regiones desordenadas son la otra gran categoría de dianas recalcitrantes. De hecho muchas interacciones proteína-proteína están mediadas por regiones desordenadas e importantes regiones de factores de transcripción son intrínsecamente desordenadas. Un reciente artículo de revisión expone los avances en el uso de moléculas pequeñas para modular la actividad de factores de transición (Henley & Koehler, 2021).

Una de las estrategias que se han utilizado contra dianas desordenadas, para escapar del problema de las bajas afinidades de los ligandos pequeños frente a regiones desordenadas son el uso de compuestos que se unen covalentemente a la región diana. Un ejemplo reciente es el desarrollo de un fármaco contra el factor de transición Myc que aprovecha la inusual presencia de una cisteína en una región desordenada (Boike et al., 2021). Una estrategia parecida había sido utilizada en el caso de KRASG12C (Lito et al., 2016).

En contraste con la unión covalente, otro compuesto que se une a Myc causando un cambio en su equilibrio conformacional e inhibiendo su interacción con Max es sAJM589 (Choi et al., 2017). Este compuesto mantiene a Myc en su forma desordenada y puede interpretarse que es un modulador de un “fuzzy complex”, directamente relacionado con el tema de esta tesis.

NSC635437 es un fármaco encontrado en un cribado extensivo de EWS-FLI1, otra diana desordenada que interacciona con una helicasa de RNA que es esencial para el mantenimiento de sarcomas de Ewin. (Erkizan et al., 2009). El mismo grupo demostró que un péptido con la secuencia 823-832 de la helicasa de RNA inhibía la misma interacción. Este ejemplo muestra dos estrategias posibles para buscar fármacos contra regiones desordenadas: el cribaje masivo de quimiotecas o el uso de péptidos de la propia diana o de otras proteínas que interaccionan con ella.

El uso de péptidos como fármacos contra regiones desordenadas está basado en la idea de que la falta de estructura estable de las regiones intrínsecamente desordenadas las hace localizables a péptidos cortos, si todas las interacciones necesarias están presentes en un segmento continuo de la secuencia. Esta condición no siempre se cumple. Un buen ejemplo es el caso de Ralaniten, un inhibidor del receptor de andrógeno.

La región intrínsecamente desordenada del receptor de andrógeno ha sido un caso ampliamente estudiado. Distintos cribados de fuentes naturales han identificado compuestos que interaccionan con el segmento N-terminal desordenado del receptor de andrógeno: nifatenoato que es un compuesto que se une covalentemente (Meimetis et al., 2012). Las sintokamidas que son productos extraídos de una esponja (Banuelos et al., 2016). El compuesto más prometedor es Ralaniten, un producto sintético optimizado a partir de EPI-067 extraído de una esponja, curiosamente como producto derivado de un

compuesto industrial. Ralaniten se une simultáneamente a varias regiones distantes, lo que sugiere que reconoce un plegamiento transitorio (De Mol et al., 2016).

En noviembre de 2015, el ralaniten en forma de su acetato y como pro-droga, empezó los ensayos clínicos (NCT02606123) del que sería el primer compuesto contra una región intrínsecamente desordenada que llegara a este nivel de ensayo. Los resultados fueron buenos, si bien tenía algunos problemas de farmacocinética (Obst et al., 2019). Hoy hay un nuevo compuesto mejorado (EPI-7386) que empezó su ensayo clínico el Julio 2020 (NCT04421222).

Otro ejemplo de diana desordenada es la región 28-90 de p27 que modula la actividad de quinasas dependientes de ciclina (CDK). Utilizando RMN como técnica de cribado se encontraron moléculas pequeñas que, sin causar el plegamiento de la región desordenada, causan un desplazamiento de poblaciones dentro del mapa conformacional (Ban et al., 2017).

Otro ejemplo de fármaco contra una región desordenada es Trodusquemine, un producto natural que interacciona con la región C-terminal de PTP1B. Esta fosfatasa de tirosina está sobreexpresada en cáncer de mama y su región C-terminal desordenada tiene carácter regulador (Hao et al., 1997) mediante un mecanismo intramolecular, similar a la situación encontrada en el “fuzzy complex” de Src.

Aunque existen inhibidores de PTP1B su falta de selectividad es un problema que no se encuentra en Trodusquemine. Los primeros ensayos clínicos (NCT00509132) mostraron una buena tolerancia y, junto con los de ralaniten (mencionado más adelante), fueron los primeros ensayos clínicos de fármacos contra regiones desordenadas.

El grupo de J.L. Neira ha encontrado inhibidores de la proteína NUPR1, una proteína asociada a estrés que se encuentra sobre-expresada en muchos tipos de cáncer, aunque los primeros estudios se centraron en cáncer de páncreas. Esta proteína, de 82 aminoácidos, es intrínsecamente desordenada. Utilizando un cribado basado en fluorescencia, complementado con estudios de calorimetría y RMN, este grupo logró identificar dos compuestos estructuralmente relacionados, trifluoreperazina, y “fluphenazine”, que se unen a NUPR1. La proteína se mantiene desordenada, pero adopta una conformación local particular. La trifluoperazina es un fármaco utilizado como antipsicótico para tratar síntomas de esquizofrenia. Los ensayos clínicos demostraron que paraba el crecimiento de tumores implantados en ratones, aunque a dosis altas causaba efectos neurológicos que impedirían su uso en ensayos clínicos. La optimización de la estructura de la trifluoperazina dio lugar a ZZW-115 que causa la remisión casi total de tumores implantados con 30 días de tratamiento sin ningún tipo de síntomas neurológicos aparentes. Este compuesto es activo en múltiples tipos de células cancerosas. Se ha demostrado que ZZW-115 también actúa sobre NUPR1, aunque no se ha podido demostrar que no tenga otras dianas. La unión es formando un “fuzzy complex” con la proteína (Santofimia-Castaño et al., 2019).

Además de las estrategias basadas en la unión de ligandos a las regiones desordenadas, deben mencionarse estrategias alternativas basadas en modificar la abundancia de la proteína diana, en vez de modular su actividad. La primera de ellas es evitar la expresión de la proteína bloqueándola a nivel de RNA mensajero (Hu et al., 2020). La segunda es promover la degradación selectiva de la proteína diana a través del proteasoma. En este caso, sin embargo, el problema es parecido al caso del diseño de inhibidores ya que implica encontrar ligandos selectivos que dirijan la ubiquitin-ligasa a la proteína diana.

Ejemplos recientes han tenido éxito en el caso del receptor de andrógenos (Ponnusamy et al., 2017) (Hwang et al., 2019).

1.5. Fluorescencia

El fenómeno que ocurre cuando un cuerpo es capaz de absorber energía al recibir una radiación incidente y este es capaz de posteriormente emitirla en forma de luz, se le llama luminiscencia. Un tipo particular de luminiscencia es la fluorescencia, la cual consiste en el proceso por el cual una molécula, generalmente llamada fluoróforo, irradiada por una fuente de energía en el rango de longitud de onda corta (radiación gamma, rayos X, UV, luz visible, etc.), absorbe dicha energía para, posteriormente, emitirla en forma de radiación electromagnética a una longitud de onda mayor (Holler et al., 2007)

Desde el siglo XVI se tienen conocimiento del fenómeno de la fluorescencia pero no es hasta el 1852 por G.G. Stokes que se acuña el término en su estudio sobre la “refrangibilidad” donde describía la propiedad de la fluorita para absorber radiación más allá del violeta y emitirla en forma de luz azul, llamando a este proceso fluorescencia a partir del nombre de este mineral. (George Gabriel Stokes, 1852).

Desde entonces este efecto se ha ido encontrado tanto en compuestos orgánicos como inorgánicos. En compuestos orgánicos, la fluorescencia de interés está normalmente asociado a compuestos con dobles enlaces conjugados, habitualmente compuestos aromáticos, que proveen estados energéticos con niveles de energía suficientemente próximos para absorber luz en la región del ultravioleta cercano o el visible y re-emitirla en forma de fluorescencia. La emisión de luz fluorescente es uno de los posibles mecanismos de relajación de las especies excitadas por absorción de un fotón. Existen otros mecanismos no radiativos que compiten con la fluorescencia, por lo que no todas las moléculas que absorben luz son fluorescentes.

Para explicar de manera física lo que ocurre durante el proceso de fluorescencia hay que entender que en los átomos o moléculas los electrones están distribuidos en niveles de energía cuantizados, lo que significa que para saltar de un nivel a otro se necesita la absorción de un fotón con una energía concreta, igual a la diferencia entre los niveles implicados ($E=h\nu$). Sin ninguna fuente de energía externa los electrones se distribuyen ocupando los niveles de menor energía. Esta situación se denomina estado fundamental. El mecanismo por el cual ocurre la fluorescencia está basado en tres etapas.

Inicialmente el fluoróforo es irradiado por una fuente externa que proporciona fotones de la energía adecuada para excitar a los electrones a niveles electrónicos más elevados según la cantidad de energía recibida. Este proceso se esquematiza en el diagrama de Jablonski (figura 1.10A) el cual es muy útil para explicar este proceso. Cada nivel electrónico contiene un gran número de subniveles, que corresponden a distintos valores de energía vibracional, igualmente cuantizada. Al promocionar un electrón de su estado fundamental S_0 a un nivel electrónico de alta energía como el S_2 , el subnivel vibracional de llegada no va a ser el más bajo posible ya que la geometría de equilibrio del estado fundamental es distinta de la del estado excitado y la absorción del fotón es rápida comparada con los movimientos de vibración. La relajación dentro de los niveles vibracionales del estado excitado conduce hasta su estado vibracional más bajo.

El regreso al estado fundamental por emisión de un fotón, implicará un salto energético más pequeño que el que se produjo durante la absorción y, por tanto, tiene una longitud de onda mayor. En la fluorescencia, tanto la absorción de la luz como la emisión implican niveles de energía de la misma multiplicidad que el estado fundamental (singlete = electrones con sus espines apareados). Estos procesos son rápidos y la vida de estos estados electrónicamente excitado, aunque vibracionalmente

relajados es de unos nanosegundos. En algunos casos, desde el estado excitado singulete, se puede pasar a un estado con una multiplicidad diferente (triplete = dos electrones con sus espines paralelos). Estas transiciones están prohibidas y, si ocurren, lo hacen con una baja probabilidad. Si el sistema acaba en un estado triplete, la emisión de un fotón para volver al estado fundamental (singulete) es igualmente improbable con lo cual la vida de los estados triplete es mucho más larga (centésimas de segundos hasta horas). Este proceso de emisión, también a longitudes de onda mayores que las de absorción pero con un tiempo de respuesta mucho más lento que en el caso de la fluorescencia, se llama fosforescencia.

Las características fotofísicas que definen la fluorescencia son los espectros de excitación y emisión, que indican las longitudes de onda donde se produce la absorción de luz y la fluorescencia, los coeficientes de extinción, que indican la eficiencia de la absorción de luz a cada longitud de onda, el rendimiento cuántico de la emisión (la relación entre el número de fotones absorbidos y emitidos) y el tiempo de vida de la fluorescencia. En los experimentos de estado estacionario, en los que la muestra es irradiada de forma continua mientras se observa la emisión, el tiempo de vida no es un parámetro medible. Si se usa luz polarizada, la eficiencia de la absorción de luz dependerá de la relación angular entre el plano de polarización de la luz incidente y el llamado dipolo de transición. La orientación de los dipolos de transición influye en la eficiencia de los procesos de transferencia de energía que se explicarán en el siguiente apartado. Sin embargo, en condiciones isotrópicas los efectos observados son el promedio de todas las orientaciones posibles.

La intensidad de la fluorescencia está relacionada con el producto del coeficiente de absorción por el rendimiento cuántico. Este último puede disminuir si en el entorno hay especies que puedan facilitar la relajación no radiativa a partir de los estados excitados (“quenching”). El entorno molecular (polaridad del disolvente) puede hacer variar la diferencia de energía entre los estados fundamental y excitado, dando lugar a desplazamientos en la posición de los máximos tanto de excitación como de absorción (PerkinElmer, 2000).

La fluorescencia es una técnica muy sensible ya que el ruido de fondo puede ser esencialmente cero y por tanto es posible detectar con un detector suficiente sensible, la emisión de un pequeño número de fotones y, además, el flujo de fotones se mantiene a lo largo del tiempo mientras se mantenga la excitación. Esto ha permitido los estudios de moléculas individuales mediante microscopía de fluorescencia. Aun sin llegar a estos niveles de sensibilidad la fluorescencia permite detectar concentraciones fisiológicas de biomoléculas marcadas con fluoróforos apropiados y ha tenido un impacto muy importante en numerosas aplicaciones biomédicas. En la vida cotidiana, la fluorescencia permite generar luz visible a partir de longitudes de onda más cortas en los tubos de luz fosforescentes en el pasado y ahora con los leds.

1.5.1. FRET

La técnica principal utilizada en esta tesis para el cribado de bibliotecas de compuestos químicos, se basa en una variante de la fluorescencia que se da solo cuando hay dos fluoróforos suficientemente cerca con las características apropiadas para permitir la transferencia de energía de un fluoróforo donador a uno aceptor. A este fenómeno se le llama FRET que son las siglas en inglés de “Förster Resonance Energy Transfer” debido a Theodor Förster que lo describió ahora hace más de medio siglo (Forster, 1946).

Cuando un fluoróforo (donador) se encuentra en el estado excitado y cerca de otro fluoróforo que contenga diferencias de energía entre sus niveles de energía que sean comparables a las del donador, puede producirse la transferencia de energía entre ambos. Esta transferencia no es radiativa sino que implica el acoplamiento de los niveles de ambos fluoróforos a partir de interacciones dipolares. Estas interacciones dependen de la distancia, y por ello, es necesaria la proximidad física de donador y aceptor. El resultado de dicha transferencia es que el aceptor queda en su estado excitado y puede emitir un fotón (fluorescencia) pero esta fluorescencia tendrá lugar a la longitud de onda característica del aceptor, no del donador, tal como se representa en la figura 1.10B.

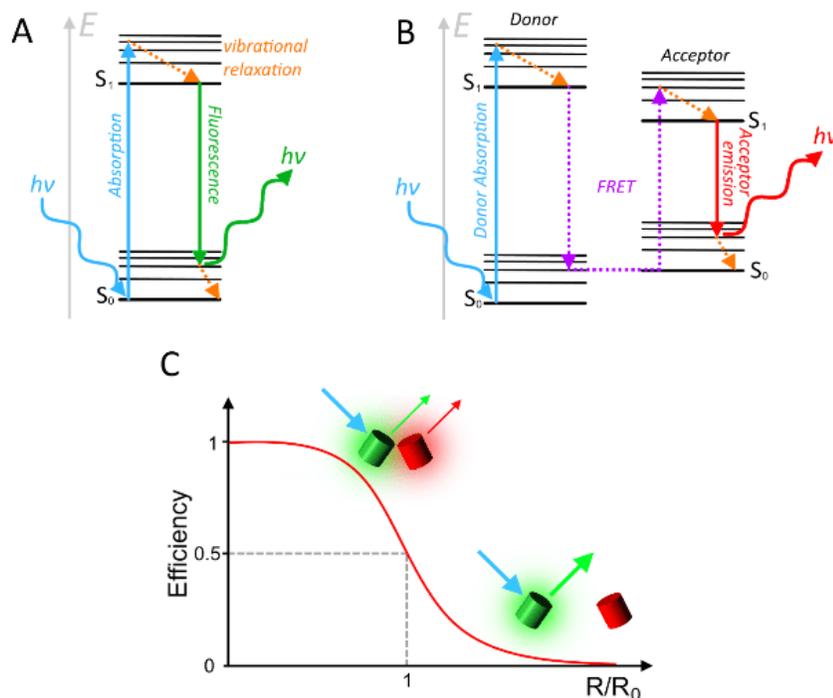


Figura 1.10: Principios básicos de fluorescencia y FRET. (A) Diagrama de Jablonski para explicar el efecto de la fluorescencia. (B) Diagrama de Jablonski para explicar el efecto FRET. (C) Correlación entre la distancia y la eficiencia del FRET. El radio de Förster (R_0) es la distancia a la cual el 50% de la energía es transferida vía FRET. Reproducido con el permiso Hochreiter (2015)

La eficiencia de este proceso según Förster depende del inverso de la distancia elevada a la sexta potencia descrita en la ecuación siguiente y representada en la figura 1.10C:

$$E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6} \quad (1)$$

Donde R es la distancia entre los fluoróforos y R_0 es la distancia de Förster que se define como la distancia media a la cual un donador dona el 50% de su energía al aceptor. Si la orientación entre los dipolos de transición es fija, R_0 también depende de la orientación que tengan estos.

$$R_0 = 0,2108 [k^2 \% i F I_0 n^{-4} J]^{1/6} \quad (2)$$

Cada par de fluoróforos tendrá su propia R_0 definida por la orientación (k), el rendimiento cuántico del fluoróforo donador en ausencia del aceptor (Φ_0), el índice de refracción del medio que intervenga (n), J se definirá por el grado de solapamiento que hay entre el espectro de emisión del fluoróforo donador (F_D , integral normalizada a 1) y el espectro de absorción del aceptor (escalado a su coeficiente de extinción molar máxima, ϵ_A) (Hochreiter et al., 2015).

$$J = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3)$$

Para dar lugar al FRET se necesitan una serie de condiciones entre fluoróforos. La más importante y básica es el buen solapamiento entre los espectros de emisión y absorción del donador y aceptor respectivamente. El nivel de solapamiento mínimo para tener suficiente FRET se asume que es a partir del 30% para poder tener una detección fiable (Lovell et al., 2009). El siguiente factor que determina la eficiencia del FRET es la proximidad entre los fluoróforos. El rango de distancias en las que podemos medir este fenómeno es típicamente entre 1-10nm (dependiendo del radio de Förster del par de fluoróforos utilizado). Debido a que la eficiencia depende de esta distancia a la sexta potencia, a distancias mayores se imposibilita que se de esta transferencia de energía. Finalmente las otras variables a tener en cuenta son la orientación y el rendimiento cuántico, tal y como se describe en la ecuación (2), el rendimiento cuántico (Φ) sería la relación entre los fotones emitidos y los fotones absorbidos por la molécula, y a mayor rendimiento cuántico por parte del fluoróforo tendremos un rendimiento mayor de la señal FRET y una mejor orientación de los dipolos en el espacio resultara en una mayor efecto FRET (Shrestha et al., 2015). En la práctica, dado que las orientaciones fluctúan, la medida estructural típicamente medida en los experimentos FRET es la distancia (promedio) entre los fluoróforos.

Muchos sensores basados en FRET se han utilizado ampliamente como reglas espectroscópicas para medir distancias y monitorizar una gran diversidad de procesos bioquímicos que conllevan cambios de distancia al nivel donde FRET es sensible. Algunos de estos procesos son interacciones proteína-proteína, cambios conformacionales y actividad enzimática (Lam et al., 2012a; Miyawaki, 2011). Algunas de estas medidas son directas mientras que otras son indirectas (por ejemplo la actividad de una proteasa puede detectarse si el corte separa un par de fluoróforos que mostraban FRET entre ellos). Otra ventaja descrita para los biosensores FRET, en contraste de otras técnicas bioquímicas, es que esta se mide de manera óptica y por tanto es una técnica muy poco invasiva y compatible con el estudio de células *in vivo* (Miyawaki, 2011).

Dependiendo de la disposición de los fluoróforos dentro de nuestro sistema de estudio podemos encontrar dos tipos de FRET: El intramolecular, donde tanto donador y aceptor se encuentran anclados en la misma molécula y lo que proporciona información sobre cambios conformacionales de la moléculas que darán cambios en el FRET. Por el contrario, en el FRET intermolecular cada fluoróforo (donador y aceptor) se encuentra en moléculas diferentes y por lo tanto los cambios en FRET se darán cuando estas moléculas estén próximas entre si. Las interacciones proteína-proteína pueden estudiarse utilizando FRET intermolecular (Miyawaki, 2011; Piston & Kremers, 2007).

Entre los fluoróforos utilizados en la construcción de biosensores FRET podemos distinguir tres tipos: moléculas orgánicas pequeñas fluorescentes (como los compuestos Alexa Fluor que son derivados de la rodamina), puntos cuánticos (“quantum dots” Qds), y las proteínas fluorescentes (FP) que a diferencia de los otros dos, pueden codificarse genéticamente y son particularmente útiles para

los estudios de FRET en células vivas. La ventaja de la codificación genética en las FP evita que se tenga que enlazar el fluoróforo a la molécula usando reacciones químicas o a través de anticuerpos, como los otros dos casos (Masharina et al., 2012).

En nuestra tesis se decidió el uso de las proteínas fluorescentes para formar un par-FRET y generar un sensor-FRET capaz de detectar cambios conformacionales en c-Src.

1.6. Proteínas fluorescentes y biosensores-FRET

Todas las proteínas fluorescentes (FP) que utilizamos hoy en día para estudiar interacciones a corta distancia o para marcar células en vivo, provienen de la avGFP (Green Fluorescent Protein) aislada y obtenida por Osamu Shimomura en los principios de los 60s a partir de la medusa *Aequorea victoria* (Shimomura, 2009; Tsien, 1998a). Esta se mantendría en cierta oscuridad y no sería hasta los 90s que Douglas Prasher junto Martin Chalfie conseguirían clonar el código genético de avGFP y se empezaría a entender el potencial de este tipo de proteínas, debido a la capacidad de insertar un gen que exprese GFP y que fuese observable por microscopia de fluorescencia (Chalfie et al., 1994). Los primeros estudios se llevaron a cabo en *C.elegans* demostrando su utilidad como marcador genético de expresión (Chalfie et al., 1994). Poco después se demostraría su utilidad para seguir/monitorizar/trazar el movimiento de las proteínas dentro de las células (Tsien, 1998b).

A pesar del gran potencial de la GFP esta tenía una serie de inconvenientes que hacían necesaria su modificación para poder usarse en células. Estos esfuerzos fueron conseguidos por Roger Tsien el cual sería pionero en el desarrollo de nuevas proteínas fluorescentes mediante una extensiva ingeniería proteica. A partir de entonces ha habido un gran desarrollo de nuevas proteínas fluorescentes intentando mejorar sus propiedades fisicoquímicas y creando proteínas fluorescentes de diferentes “colores” al desplazar el espectro de absorción y emisión del cromóforo de GFP (Schmid & Neumeier, 2005). Por todo esto finalmente en 2008 se dio el premio Nobel de química a tres investigadores, los Drs Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Tsien .

Como podemos observar en la figura 1.13. La estructura de estas proteínas consiste generalmente en un barril β con 11 cadenas que contiene en su interior una única α -hélice que se posiciona en el centro del barril. Esta hélice contiene los residuos que, por un conjunto de reacciones químicas que se conocen como maduración, dan lugar a la formación del cromóforo.

1.6.1. Maduración de las proteínas fluorescentes

Para que estas proteínas sean fluorescentes son necesarios dos pasos: el correcto plegamiento de la proteínas y la formación del cromóforo. La estructura terciaria adoptada por las proteínas fluorescentes permite la formación del cromóforo de forma espontánea, sin que se requiera ningún enzima o cofactor, excepto la presencia de oxígeno molecular. El cromóforo queda protegido en el interior del barril β , evitando que pueda experimentar quenching por parte de las moléculas del disolvente (Remington, 2006).

La formación del cromóforo es un proceso muy estudiado y depende directamente de tres aminoácidos responsables de generar una molécula con un sistema de dobles enlaces conjugados capaces de tener fluorescencia. Posteriormente al buen plegamiento de la molécula en el centro de esta

quedan de forma co-planar tres aminoácidos que siguen la secuencia (Xaa65-Tyr66-Gly67) para las proteínas fluorescentes más extendidas que son las verdes y rojas (GFPs y RFPs) con sus múltiples variantes. En otras proteínas fluorescentes, la tirosina podrá ser substituida por otro aminoácido que contenga un anillo como por ejemplo son los casos de la proteína azul SBFP2 (Ser65-His66-Gly67) o la mTurquoise2 (Ser65-Trp66-Gly67). Otro caso especial sería la de la proteína amarilla SYFP2 (Gly65-Trp66-Gly67) que aunque aparentemente siga la regla tiene la Tyr203 que se conjuga con la Tyr66 extendiendo el sistema π (Moore et al., 2012b).

El proceso de maduración, de manera básica, es formar un anillo entre el Xaa65 (dependiendo de la proteínas fluorescente será un aminoácido o otro) y la Gly67 mediante una ciclación que crea un sistema de 5-hidroxiimidazolidinona, la extensión de la conjugación mediante una oxidación con oxígeno molecular seguida de eliminación de peróxido de hidrógeno y deshidratación da lugar a las especies fluorescentes. Las proteínas fluorescentes rojas implican un procesamiento adicional, también oxidativo, que extiende la conjugación a lo largo del esqueleto peptídico. En la siguiente figura proponemos un mecanismo de formación de estos cromóforos (Moore et al., 2012a)

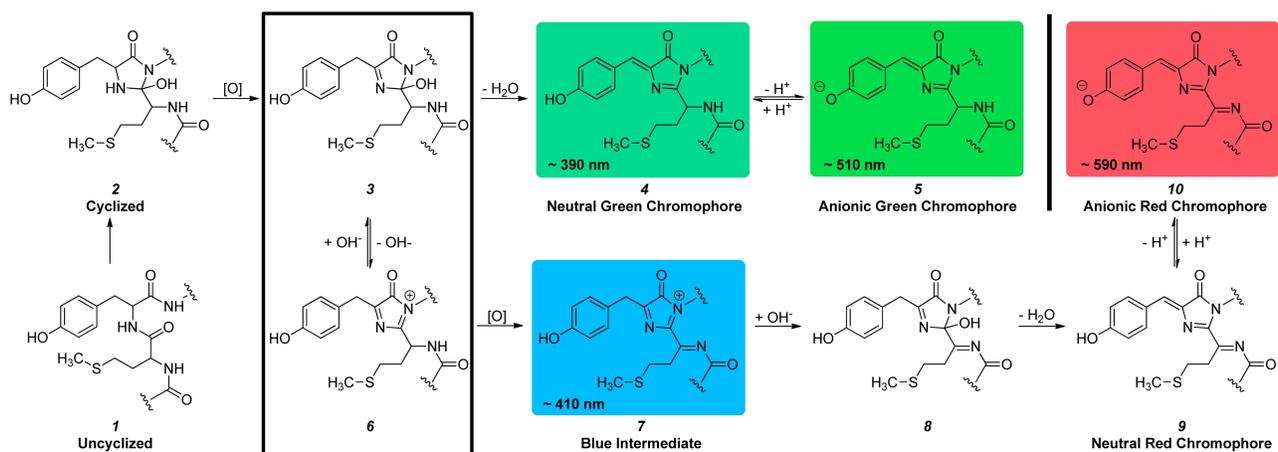


Figura 1.11: **Mecanismo de maduración del cromóforo.** Mecanismo de maduración propuesto por Strack et al.[7] es una vía ramificada para la formación de cromóforos rojos o verdes. Los productos intermedios y finales en esta vía son observables por espectroscopia de absorción y están codificados por colores y etiquetados con la longitud de onda aproximada a su absorción máxima. El punto de ramificación está indicado por un cuadro. Este mecanismo está extraído del doi: 10.1371 / journal.pone.0052463.g001

1.6.2. Tipos de Biosensores-FRET

El uso de proteínas fluorescentes para hacer FRET ha sido usado para una multitud de aplicaciones, haciendo difícil a veces poner una línea definida para saber cuando un método es un biosensor o no.

En esta sección definiremos la aplicabilidad del FRET según si hay un cambio en el FRET o no y como se ha producido este. Lo más común es pensar en un FRET intramolecular donde las dos proteínas fluorescentes, donador y aceptor, forman parte de un complejo mayor. Por el contrario tenemos los de FRET intermolecular que ocurrirá cuando las proteínas fluorescentes están ancladas a diferentes proteínas y buscamos un aumento de FRET cuando están se acercan. Este método es más común para determinar interacción entre proteínas. En la siguiente sección hacemos un breve resumen del tipo de Biosensores-FRET que hay según la transformación bioquímica que haga variar el FRET.

En la tabla 1 presentamos una serie de ejemplos de estas posibles transformaciones estudiadas por FRET.

Tipo de FRET	Aplicación	Ejemplo de Objetivo	Referencia
Corte	Apoptosis	Caspase-3	(X. Xu et al., 1998)
	Necroptosis	RIPK1 y RIPK3	(Sipieter et al., 2014)
	Autofagia	Atg4A y Atg4B	(Li et al., 2012)
	“ECM-remodellin”	MT-MMP1	(Ouyang et al., 2008)
Cambios conformacionales	División celular	CyclinB1-Cdk1	(Gavet & Pines, 2010)
	Transducción de señales	AKT	(Miura et al., 2013)
	Mecanotransducción	FAK	(Seong et al., 2013)
	Quantificación metabólica	ATP	(Imamura et al., 2009)
	“Drug Efficiency”	Src	(Nobis et al., 2013)
	Interacción células T	Lck	(Paster et al., 2009)
Fuerza Mecánica	Adhesión Focal	Vinculin	(Grashoff et al., 2010)
	Tension cortante con fluidos (“Shear fluid shear stress”)	PECAM-1	(Conway et al., 2013)
Cambios micro-ambientales	O ₂ y EOR	ROS	(Bernardini et al., 2015)
	pH	pH	(Awaji et al., 2001)

Tabla 1: Ejemplos de sensores FRET basado en su transformación bioquímica. Ejemplos extraídos de Hochreiter (2015)

1.6.2.1. FRET basado en el corte

Uno de los métodos más utilizados y simples, se basa en escindir en un lugar específico del biosensor-FRET. Las proteínas fluorescentes estarán próximas entre sí para dar una señal clara de FRET y cuando se corte el biosensor habrá una pérdida de FRET, normalmente esta escisión está producida por enzimas que cortan en un lugar específico de la secuencia. Siendo uno de los métodos más útiles también conlleva un problema y es su irreversibilidad a diferencia de otros tipos de aplicaciones FRET. Algunos usos son para estudiar la apoptosis, necroptosis, autofagia y “ECM-remodelling” (remodelación de la matriz extracelular) (Hochreiter et al., 2015).

1.6.2.2. FRET basado en cambios conformacionales

Este tipo de biosensores, juntos con los de corte, son de los más utilizados. En este biosensor buscamos un cambio de conformación por algún proceso biológico. Estos cambios pueden darse por diversos motivos como una modificación postraduccional como es la fosforilación, o un cambio conformacional por algún tipo de alteración en el ambiente, como un desplazamiento en la polaridad colindante. Una de las grandes ventajas reside en la versatilidad a ser sensibles a diferentes factores, pudiendo estudiar un gran rango de procesos biológicos, además de ser reversibles en muchos casos. Los ejemplos más comunes son; división celular, transducción de señales, transducción mecánica, cuantificación metabolito, eficacia de drogas, interacciones con células-T (Hochreiter et al., 2015).

1.6.2.3. FRET basado en fuerza mecánica

La estructura terciaria de las proteínas tiende a modificarse por si misma o un cambio por parte del entorno, una manera diferente de modificar la estructura terciaria es el uso de la fuerza mecánica. Un buen ejemplo de esto es las proteínas de la tela de araña. Estas generan segmentos helicoidales que pueden comprimirse o extenderse proporcionando una gran elasticidad (Van Beek et al., 2002). Algunos ejemplos son; Adhesión focal o corte por estrés de fluido.

1.6.2.4. FRET basado en cambios micro-ambientales

A diferencia de las categorías anteriores que buscan un incremento o descenso del FRET por cambios en la distancia del donador y el aceptor, en esta categoría utilizamos la sensibilidad de los fluoróforos para ciertas condiciones (Olenych et al., 2007). Por ejemplo la YFP (“Yellow Fluorescent Protein”) es un fluoróforo dependiente de su ambiente, lo que lo ha hecho una elección popular para este tipo de aplicaciones, algunos ejemplos serían: Especie reactiva de oxígeno y O_2 , cambios de pH.

1.6.3. Parejas de Biosensores-FRET

Desde hace unas décadas las proteínas fluorescentes se han utilizado extensivamente en el estudio de células y de interacciones proteína-proteína y ya hemos comentado algunas de sus aplicaciones. Pero para utilizar FRET es importante saber que par de fluoróforos vamos a usar porque dependiendo de su combinación pueden cumplir todos los requisitos para formar un par-FRET o simplemente tener dos proteínas fluorescentes sin FRET. Las combinaciones de proteínas fluorescentes más utilizadas para experimentos FRET se describen a continuación.

1.6.3.1. Par-FRET CFP-YFP

La combinación más común utilizada inicialmente para FRET fue la formada por CFP (“Cyan Fluorescence Protein”) como donador y YFP (“Yellow Fluorescent Protein”) como aceptor. Una de las ventajas de esta combinación es que las proteínas azules (cian) tienen un gran rendimiento cuántico, como la mTurquoise2 ($\Phi = 0.93$), Aquamarine ($\Phi = 0.89$) o la mCerulean3 ($\Phi = 0.87$). Otra gran ventaja es su larga vida útil (Ai et al., 2006; Erard et al., 2013; Goedhart et al., 2012; Markwardt et al., 2011). Por el otro lado con las YFP tenemos el problema de que son más sensibles al entorno, especialmente al pH, la concentración de cloro y la cantidad de O_2 disponible durante la formación del cromóforo. Se ha intentado evitar estos problemas con nuevos modelos de YFP como la mVenus, mCitrine, sEYFP que tienen una menor sensibilidad al pH y al cloro (Griesbeck et al., 2001; Koushik et al., 2006; Shaner et al., 2005). Aun y con todo, este par FRET sigue sufriendo de algunas desventajas como el “photobleaching” de YFP, el solapamiento de los espectros de absorción (figura 1.12A) y la posible foto-conversión de YFP a una CFP (Lam et al., 2012b). Además, los biosensores basados en pares CFP-YFP muestran un rango dinámico de respuesta limitado debido a que, al tener un valor pequeño de la distancia de Förster, un pequeño aumento de la distancia entre los cromóforos puede hacer pasar la respuesta desde su valor máximo a no ser observable.

1.6.3.2. Par-FRET GFP-RFP

Siendo también una de las combinaciones más utilizadas y extendidas, el par-FRET por GFP-RFP soluciona gran parte de los problemas que tienen las CFP-YFP, tienen una mejor fotoestabilidad y una mayor separación de los espectros de absorción al estar más desplazados sus espectros como se ve en la figura 1.12B (Helmchen & Denk, 2005). La desventaja de esta pareja de FPs es el bajo brillo de las RFPs haciendo que la emisión FRET sea a veces demasiado débil para detectar por encima de la cola de emisión del espectro de GFP (Tsutsui et al., 2008). En los últimos años se han ido añadiendo mejoras para que fueran más fotoestables y brillantes, como son la generación de las Clover por parte de las GFP y las Ruby por las RFPs (tabla 2). En resumen, a día de hoy debido a las mejoras producidas en brillo y fotoestabilidad los pares GFP-RFP de FRET han incrementado su atractivo para estudios en células en vivo por encima de las CFP-YFP.

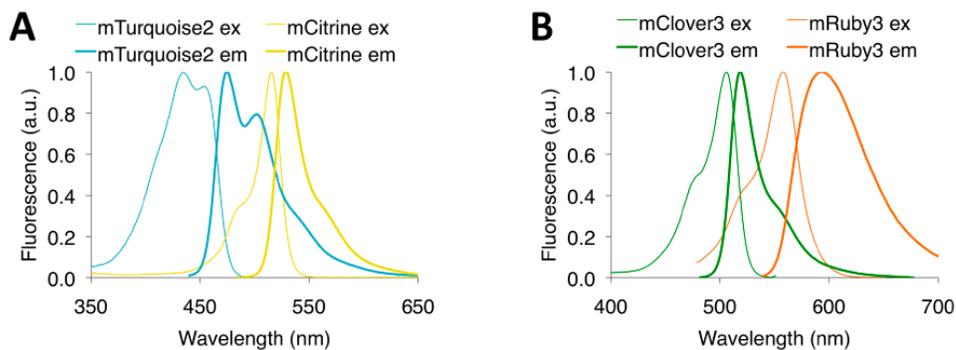


Figura 1.12: Espectros normalizados de absorción y emisión de FPs representando un par FRET. (A) mTurquoise2-mCitrine, un CFP-YFP par. (B) mClover3-mRuby3, un GFP-RFP par.

1.6.4. Proteínas mClover3 y mRuby3

En nuestro caso, para esta tesis vamos hablar un poco más sobre mClover3 y mRuby3, al ser la proteínas fluorescentes utilizadas en la mayor parte de la tesis. Comentar que el prototipo inicial del biosensor FRET para la región N-terminal intrínsecamente desordenada de c-Src, estaba formado por la pareja GFP y mCherry. A principios de 2016 salió a la luz un par de proteínas que hasta la fecha tenían una serie de mejoras respecto a las anteriores, hablamos de mRuby3 y mClover3 (figura 1.13). Uno de los inconvenientes de usar el par GFP-RFP para FRET pasan por el “photobleaching” y una lenta maduración de los aceptores RFP. Previamente si había desarrollado el par mClover-mRuby2 el cual ya indicaba mejores espectrales en el resto de pares GFP-RFP, siendo la pareja con mayor eficiencia, rango y rango dinámico FRET hasta el momento de la nueva generación (Bajar et al., 2016).

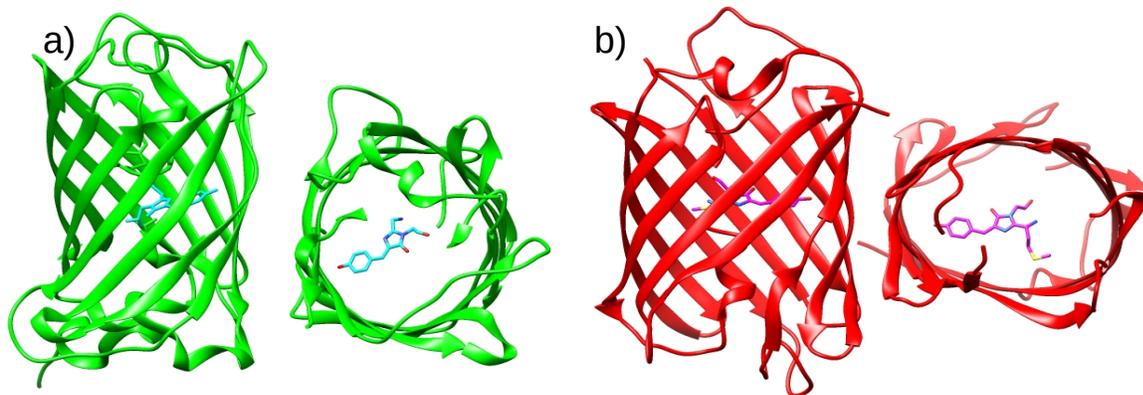


Figura 1.13: Estructura tridimensional de proteínas fluorescentes: Para a) tenemos la estructura cristalizada de mClover3 en vertical y horizontal (para ver cromóforo) (Codigo PDB:5WJ2). En b) tenemos Estructura cristalizada de mRuby3 en vertical y horizontal (para ver el cromóforo) (Codigo PDB: 3U0M).

A partir de un diseño semi-racional, se modifico la secuencia en mRuby2 para intentar aumentar su fotoestabilidad y su brillo, lo cual genero la proteína roja fluorescente más brillante y fotoestable hasta la fecha, siendo un 200% más fotoestable y un 35% más brillante que su predecesor, también ha sido mejorado el radio de Förster. En la tabla 2, donde comparamos mRuby3 con otras RFP podemos ver su evolución positiva respecto mCherry, una de las RFP más conocidas y usada en esta tesis para el prototipo del biosensor.

Con mClover3 se hizo de una manera similar a mRuby3, utilizando su predecesor mClover hizo un diseño semi-racional para mejorar su brillo y fotoestabilidad, finalmente tras varias pruebas se llego a obtener a mClover3 que tiene un aumento del 60% en la fotoestabilidad pero sin conseguir un aumento en su brillo, aunque mClover3 no podemos decir que sea la GFP más optimizada si que está en el top de las GFP compitiendo, tal vez, con la mNeonGreen (tabla 2), una FP también de ultima generación.

En la tabla siguiente se comparan los valores más importantes de estas proteínas fluorescentes de nueva generación con las clásicas GFP, RFP.

Proteína	λ_{ex}^a	λ_{em}^b	ϵ^c	Φ^d	BR ^e	pK _a ^f	Foto estabilidad ^g	Maduración ^h	Estructura cuaternaria
GFP's									
mEGFP	488	507	56	0,6	34	6	150	25	Dimero debil ⁱ
Clover	505	515	111	0,76	84	6,6	50	30	Dimero debil ⁱ
mClover3	506	518	109	0,78	85	6,5	80	Sin datos	monomero
mNeonGreen	506	517	116	0,8	90	5,7	158	10	monomero
RFP's									
mCherry	587	610	72	0,22	16	4,5	96	40	monomero
mKate2	588	633	63	0,4	25	5,4	84	20	monomero
mRuby2	559	600	113	0,38	43	4,7	123	150	monomero
mRuby3	558	592	128	0,45	58	4,8	349	<150	monomero

Tabla 2: Propiedades fotofísicas de proteínas fluorescentes rojas y verdes: ^aExcitación máxima en nm. ^bEmisión máxima en nm. ^cCoefficiente de extinción molar en mM⁻¹ cm⁻¹. ^dRendimiento cuántico. ^eBrillo; producto de ϵ y Φ . ^fpH en el cual la fluorescencia tiene el 50% de su máximo. ^gTiempo de blanqueo (photobleaching) desde 1000 hasta 500 fotones por segundo. ^hTiempo de fluorescencia en obtener la mitad del valor máximo después de exponerse a oxígeno. Los datos presentados han sido obtenidos del artículo (Bajar et al., 2016) y la web <http://www.fpvis.org/FP.html>

Para el par FRET se han elegido esta par, mClover3 y mRuby3, basado en los resultados obtenidos por el departamento de Bioingeniería de la universidad de Standford (Bajar et al., 2016) En la siguiente tabla presentamos varios pares FRET donde podemos observar las mejoras tanto por la propia FP como el par-FRET, en cuestión de eficiencia y radio de Förster. Los mejores par-FRET para generar un biosensor más sensible sería utilizar la combinación mClover3-mRuby3 o la mNeonGreen-mRuby3, para nuestra tesis escogeremos la primera.

Par FRET	Φ_d^a	ϵ_A^b	R_0^c (nm)
mEGFP-mCherry	0,6	72	5,4 ^d
Clover-mCherry	0,76	72	5,8 ^d
Clover-mRuby2	0,76	113	6,3 ^d
mEGFP-mRuby3	0,6	128	5,8
Clover-mRuby3	0,76	128	6,5
mClover3-mRuby3	0,78	128	6,5
mNeonGreen-mRuby3	0,8	128	6,5

Tabla 3: Valores de r_0 de pares-FRET de GFP y RFP. Rendimiento cuántico del donador. Coeficiente de extinción del aceptor en unidades mM⁻¹ cm⁻¹. Radio de Förster calculado asumiendo una orientación interfluorocoro ($k^2=2/3$). Datos sacados de (Bajar et al., 2016)

Objetivos

1. Desarrollo de un sistema de cribado de alto rendimiento para la identificación de moduladores del Elemento Regulador N-terminal de Src, que incluye las regiones intrínsecamente desordenadas de la proteína formando un complejo intramolecular difuso (“fuzzy complex”) nucleado por el dominio SH3.
2. Diseño y caracterización de un biosensor fluorescente sensible a variaciones de distancia entre los extremos del sistema formado por los dominios SH4, Único y SH3 de Src.
3. Desarrollo de un protocolo de preparación de muestras y análisis de una quimioteca personalizada con 1669 compuestos.
4. Validación y seguimiento de los compuestos identificados en el cribado inicial.

Capítulo 2

Diseño y caracterización del Biosensor CLOBY

2.1. Diseño del Biosensor

Como se ha comentado en los apartados (1.2-1.3) la proteína Src es de un gran interés a nivel médico ya que se encuentra sobre-expresada o sobre-activada en diversos tipos de cánceres humanos como el cáncer colorectal y el de mama. Esta elevada actividad en Src se relaciona con una mala prognosis en los tipos de cánceres nombrados. Sin embargo, a diferencia de otros oncogenes, es raro encontrar mutaciones de Src que causen cáncer. La relación entre Src y cáncer se basa en los procesos regulatorios de la proteína.

Buscar fármacos anti-Src en el dominio SH1 para la inhibición de la actividad quinasa ha sido la aproximación clásica hasta la fecha, concretamente, el sitio de unión de ATP que es altamente conservado. Esto se ha visto reflejado en la creación de potentes inhibidores de Src (Wu et al., 2016) pero con una selectividad muy baja ya que el dominio de unión de ATP es compartido por un gran número de quinasas. Otro problema añadido a la búsqueda de inhibidores de c-Src es que c-Src está implicado en numerosos procesos de regulación y señalización celular por lo cual una inhibición no selectiva de c-Src puede tener efectos positivos y negativos dificultando encontrar un equilibrio. Por ejemplo c-Src tiene un efecto neuroprotector que se anula cuando se bloquea su actividad quinasa (Kumar et al., 2014). Aunque existen algunos compuestos que se han ensayado clínicamente, en algunos casos por su actividad frente a otras quinasas (como Abl), hasta ahora no hay ningún compuesto en fase clínica que explote la inhibición selectiva de c-Src.

En el apartado 1.2.1. hablo sobre que la región N-terminal de Src constituye un elemento de regulación no canónico de Src. Los mecanismos no canónicos de regulación se basan en la modulación por el entorno de diversas interacciones, en general de carácter débil, que individual o colectivamente confieren una respuesta individualizada dependiendo del entorno. Así, es esperable que distintos tipos celulares respondan a un estímulo de forma diferente. Resultados anteriores del grupo mostraron, por ejemplo, que un mutante en la región desordenada de Src humana inyectado en *oocitos* de *Xenopus* determina una respuesta fisiológica, igual a la que induce la propia proteína Src de *Xenopus*, mientras que el mismo mutante humano induce apoptosis una vez el *oocito* ha avanzado a la siguiente fase de maduración (Amata et al., 2013b). Por tanto, la respuesta celular es distinta dependiendo del nivel de desarrollo. Todo esto nos muestra como las regiones desordenadas pueden ser sensibles al entorno tanto a través de cambios conformacionales como a través de modificaciones post-traduccionales y poseen las características que, si pudieran ser moduladas, permitirían aspirar a encontrar inhibidores de Src con selectividad no sólo respecto a otras quinasas sino respecto a los tipos de célula en que Src actúa.

La falta de una estructura tridimensional estable asociada con una elevada flexibilidad conformacional es lo que dificulta un diseño racional de fármacos en proteínas intrínsecamente desordenadas. Por otro lado, aunque los resultados obtenidos hasta ahora con el dominio Único desordenado de c-Src reflejan que es importante dado que modula la regulación, aun no conocemos los mecanismos exactos por el cual las mutaciones introducidas en esta región causan los efectos observados. La información estructural obtenida hasta la fecha nos indica que la región desordenada de

c-Src forma un complejo intramolecular difuso (“fuzzy complex”, abreviado FC) con la región SH3 como núcleo envuelta por las regiones desordenadas, el dominio Único y SH4 de c-Src (Arbesú et al., 2017b).

La hipótesis de trabajo para el diseño de nuestro biosensor parte de saber que pequeñas mutaciones en la región desordenada modulan las interacciones del FC y que dicho efecto podría ser imitado por moléculas pequeñas, dando lugar a una nueva familia de fármacos que modulen la actividad quinasa de c-Src. Por lo tanto, este FC podría ser una diana potencial para el diseño de fármacos con actividad selectiva para determinados tipos celulares. Un escenario optimista sería aquel en el cual la proteína modificada por unión al fármaco retuviera su carácter protector, pero resultara ineficiente para promover el desarrollo tumoral.

En vista que no podemos utilizar el diseño racional o un modelo de estructura estática para diseñar moléculas que se unan o modulen la actividad del FC de c-Src, la aproximación elegida en esta tesis es el cribado masivo de una quimioteca comercial utilizando técnicas de HTS (High Throughput Screening) enfocado a detectar cambios inducidos en el FC.

Con el fin de encontrar nuevos fármacos, la estrategia a seguir consiste en la detección de los cambios ocurridos en la distancia entre los extremos N-t y C-terminal de la construcción de c-Src que contiene los elementos del FC (dominios SH4, Único y SH3) flanqueados por un par de fluoróforos que den lugar a FRET.

2.2. Primer prototipo del sensor: Rover

Previamente al biosensor utilizado en esta tesis hubo varios prototipos, el primero se preparó por derivatización química de dos grupos cisteína introducidos en las posiciones N-t y C-terminal respectivamente. Estas cisteínas se hacían reaccionar con una mezcla de dos moléculas orgánicas fluorescentes (Alexa Fluor, derivados de la rodamina). El problema de este prototipo radicaba en la falta de quimioselectividad entre ambas cisteínas dando como productos mezclas estadísticas de cuatro tipos de moléculas, siendo el 50% de ellas incapaces de dar FRET, al tener el mismo fluoróforo, y el otro 50% una mezcla de dos moléculas distintas ambas con capacidad de dar FRET al tener unidos dos cromóforos diferentes. Los resultados preliminares revelaron que, a pesar de las limitaciones, la unión de un péptido que se une al dominio SH3 y distorsiona el FC causaba un cambio en la fluorescencia, validando, inicialmente, la aproximación elegida.

Una vez descartada la introducción de los grupos fluorescentes mediante derivatización química debido al problema de regioselectividad que presentaban, se decidió hacer las siguientes aproximaciones utilizando la fusión de proteínas fluorescentes mediante la introducción de los genes correspondientes, en fase, antes y después de la secuencia de ADN que codifica la proteína c-Src. La proteína de fusión así obtenida contiene dos proteínas fluorescentes distintas ancladas a los extremos N-t y C-terminal a c-Src eliminando así el problema de regioselectividad.

La aproximación inicial fue realizada con las proteínas fluorescentes GFP y mCherry, dado que, como se muestra en el apartado 1.6.4, son ejemplos conocidos de un par FRET. Otra razón de su elección fue el hecho de ser proteínas utilizadas anteriormente, por separado, en el laboratorio. La obtención de esta proteína se llevó a cabo mediante el diseño de un gen sintético que albergara mCherry, c-Src (dominios SH4, Único y SH3) y GFP consecutivamente y que se expresaría en *E.coli*. Este diseño inicial contaba con un par de espaciadores y una cola de histidinas al final de la secuencia de aminoácidos como se muestra en la figura 2.1. A esta construcción se le dio el nombre de Rover (unión de **Rojo** y **verde**).



Figura 2.1: Representación de los dominios de Rover. mCherry unido por un espaciador a la región N-terminal de c-Src (Dominios SH4, Único, SH3), que se une con otro espaciador a la GFP

La caracterización de Rover se llevó a cabo observando las condiciones en que fuese observable el FRET y este además fuese intramolecular evitando la contaminación de otros procesos intermoleculares como se describen en el apartado 1.5.1.

2.2.1. Estudio de la concentración de Rover

Inicialmente buscamos la concentración óptima de trabajo en la cual podríamos evitar las interacciones intermoleculares, esto se determinó midiendo la respuesta de fluorescencia del aceptor (mCherry) al irradiar Rover a la longitud de onda de excitación del donador (GFP) en función de la concentración de Rover. Mientras la respuesta de fluorescencia/concentración se mantenga directamente proporcional podemos suponer que solo hay FRET intermolecular. Los resultados obtenidos indican que a concentraciones por encima de los 3 μM Rover empieza a mostrar indicios de FRET intermolecular (figura 2.2a).

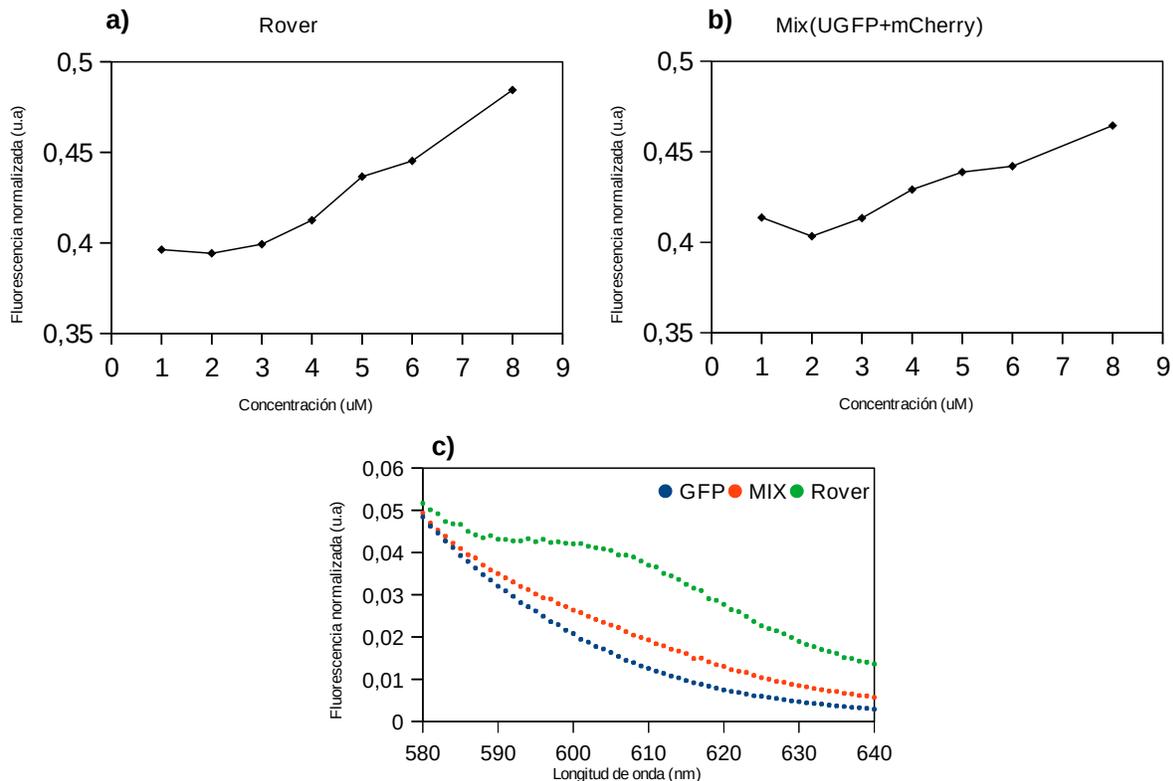


Figura 2.2: Efecto de la concentración sobre la fluorescencia de Rover. (a) Fluorescencia de Rover a diferentes concentraciones a la longitud de onda de 610 nm (máximo de emisión de mCherry). (b) Fluorescencia del Control de Rover (MIX, unión del construcción U Src y GFP y mCherry en solución) a diferentes concentraciones a la longitud de onda de 610 nm (máximo de emisión de mCherry). (c) Expansión del espectro de Fluorescencia a la concentración de 1 μM de Rover el control (MIX) y GFP sola. Expansión espectral de la región de emisión de mCherry.

Podemos observar resultados similares en el control de Rover en la figura 2.2b, consistido por mCherry y una construcción que contenía el USrc de c-Src y fusionado con GFP. Esta mezcla de los dos cromóforos, como parte de moléculas distintas, puede dar lugar, únicamente, a FRET intermolecular.

2.2.2. Estudio de la temperatura de Rover

Una vez encontrada la concentración óptima de trabajo pasamos a estudiar su estabilidad respecto a la temperatura, observando si había ruptura de las interacciones entre la región desordenada y el SH3. Tanto GFP como mCherry son proteínas fluorescentes muy optimizadas y resistentes a la temperatura, al menos hasta 65°C (tienen un pérdida de fluorescencia del 50% a 78°C) (Tsien, 1998a) y por tanto no se verán tan afectadas por el cambio de temperatura pero si que lo estarán las regiones desordenadas de c-Src, promoviendo la ruptura del FC, permitiendo ver de que forma alternaciones del FC afectan la distancia entre las dos proteínas fluorescentes fusionadas en sus extremos. El estudio de la temperatura se realizó en el intervalo de 4°C hasta 70°C con intervalos de 2°C entre medidas.

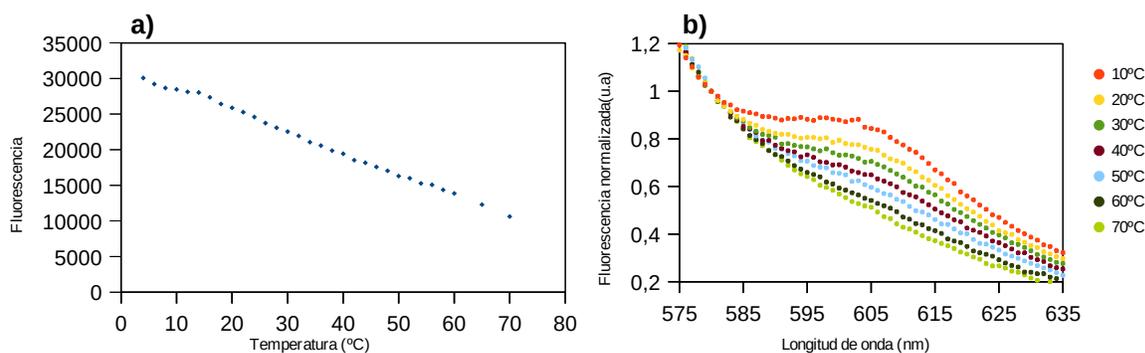


Figure 2.3: Variación de la intensidad de la fluorescencia de Rover con la temperatura. (a) Variación de la fluorescencia de Rover a 610 nm (máximo de mCherry). (b) Expansión del espectro de fluorescencia de Rover respecto la temperatura. Expansión de la región de emisión de mCherry.

Se observa una disminución de la emisión del aceptor al aumentar la temperatura indicando un aumento de la distancia entre los dos fluoróforos compatible con la desestabilización del FC. A la temperatura máxima alcanzada la pérdida de FRET es total y los espectros obtenidos son iguales a los que se observan en una mezcla de las dos proteínas fluorescentes cuando no están unidas entre ellas.

El cambio de temperatura causa un pequeño cambio del máximo de emisión hacia longitudes de onda superiores, un efecto que ya había sido descrito para GFP (Savchuk et al., 2019), pero la fluorescencia se mantiene confirmando la estabilidad de las proteínas fluorescentes en el rango de temperaturas estudiado. La disminución de FRET es lineal con la temperatura y no sigue el perfil sigmoidal típico de las curvas de desnaturalización, pero debe recordarse que las interacciones que implican la región desordenada son difusas y por tanto no debe esperarse el comportamiento cooperativo que da lugar a un perfil sigmoidal.

2.2.3. Efecto del péptido VSL12 sobre Rover

Una vez hallamos la concentración de trabajo para evitar interacciones intermoleculares y que mediante la temperatura comprobamos que el sensor puede alterarse para perder el FRET y que por

tanto puede modularse este efecto, demostrando así su función de sensor, el siguiente paso era demostrar que los cambios producidos en el sensor corresponden también con los de USH3 y que por tanto la adición de dos proteínas fluorescentes no afecta al estado conformacional de c-Src. Para esto usaremos el péptido VSL12 (VSLARRPLPPLP) que adopta una conformación de poliprolina (PPP) (Rickles et al., 1995) y se une al dominio SH3, compitiendo con algunas de las interacciones del dominio único pero preservando el FC, a través de las interacciones entre los dominios SH4 y SH3 (Pérez et al., 2013a).

La adición de un exceso del péptido VSL12 causa un descenso importante de la fluorescencia de Rover. Normalizando respecto al máximo de fluorescencia (expansión figura 2.4) se observa un ligero descenso de la emisión del aceptor, pero se mantiene el FRET, por lo que puede deducirse que el FC se mantiene y la interacción del péptido VSL12, aunque afecta ligeramente al FC no aumenta sustancialmente la distancia entre los dos fluoróforos.

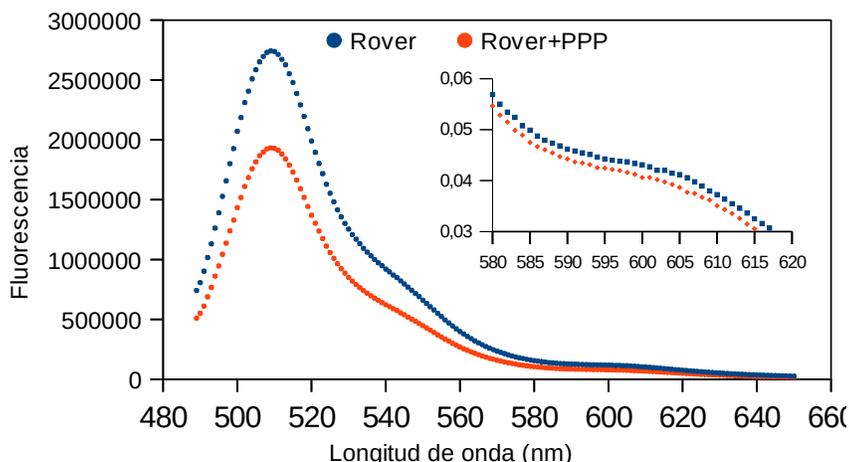


Figura 2.4: Resultados del efecto del péptido de poli-prolina en la emisión del espectro de fluorescencia de Rover. Los puntos azules corresponden a Rover y los rosas a Rover afectado por el PPP. A la derecha una expansión de la fluorescencia normalizada en la región de FRET (emisión de mCherry)

2.2.4. Estudio de Rover en RMN

Finalmente, una vez determinadas las condiciones de trabajo y el funcionamiento del sensor es imprescindible discernir si la adición de las proteínas fluorescentes afecta a las interacciones nativas entre los dominios SH4, Único y SH3. Para este proyecto el uso de RMN será esencial para estudiar nuestros sensores y si conforman un FC como USH3. La espectroscopia de Correlación Heteronuclear de un Único Cuanto, también llamada HSQC es el método de RMN para estudiar proteínas en nuestro proyecto, donde se ha usado muestras marcadas con ^{15}N (^1H , ^{15}N - HSQC).

Observando los desplazamientos químicos de RMN podemos mapear los residuos de Rover y compararlos con USH3 y ver que residuos se hayan afectados por la adición de GFP y mCherry. Los cambios de desplazamiento combinados de los núcleos de ^1H y ^{15}N entre la región común de dos moléculas relacionadas (e.g. Rover y USH3) o de la misma molécula en condiciones experimentales distintas, se representan en un diagrama de Perturbación de Desplazamientos Químicos (CSP).

La comparación se centró en las regiones desordenadas que, a priori, se espera que no estén directamente afectadas por la adición de las proteínas fluorescentes, excepto los primeros residuos del dominio SH4 cercanos al espaciador que los separa de la proteína Cherry. Por otra parte, trabajando a 278 K las señales procedentes de las proteínas globulares se encuentran ensanchadas minimizando el posible solapamiento con las señales de interés. Los espectros de RMN se muestran en el Anexo:

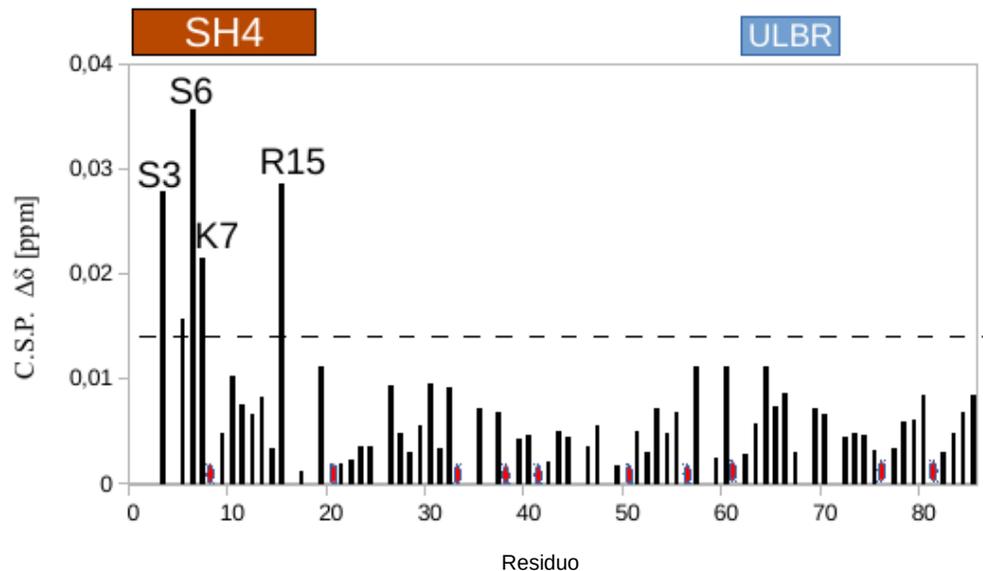


Figura 2.5: Diagrama de perturbación de desplazamientos químicos en los dominios SH4 y único de Rover respecto a USH3. Los residuos de prolina, no observables, están señalados en rojo. La línea en negra punteada indica el valor de la media de las perturbaciones del decil inferior más 5 desviaciones estándar. Figura directamente extraída de la tesina de Master de G.Iruela Martín.

Las mayores diferencias de desplazamientos químicos entre Rover y USH3 (Figura 18) se encuentran en los residuos iniciales (S3, S6, K7 y R15), la region N-terminal donde el fluoroforo mCherry esta fusionado al dominio SH4 de Rover.

Se observan cambios menores alrededor del residuo 30, que corresponde a una región rica en glicinas, y la región alrededor de los residuos E60 y F64 en la denominada ULBR(“Unique Lipid Binding Region”). Sin embargo no se observan cambios significativos en A55 o T37 que son residuos diagnósticos de la formación del FC (Maffei, 2015), por lo que puede deducirse que el FC se mantiene en presencia de las proteínas fluorescentes fusionadas.

En este apartado también quisimos comprobar que la modulación de la unión del dominio Único al SH3 causada por el péptido VSL12 es análoga en Rover y USH3 y que las proteínas fusionadas no introducen cambios significativos en el FC (figura 2.6).

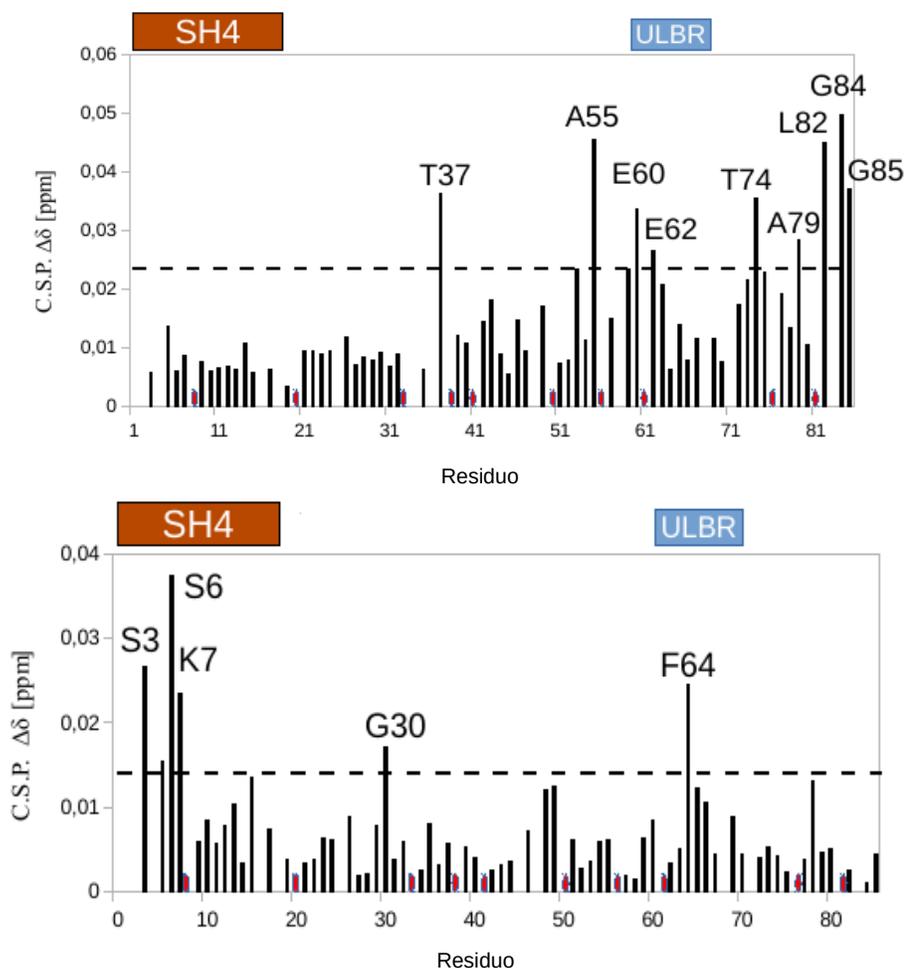


Figura 2.6: Perturbación de desplazamientos químicos causada por el péptido VSL12. A) Comparación de Rover en presencia y ausencia de VSL12. B) Comparación de Rover y USH3 (dominios SH4 y Único), ambos en presencia de VSL12. Los residuos de prolina, no observables, están señalados en rojo. La línea en negra punteada indica el valor de la media de las perturbaciones del decil inferior más 5 desviaciones estándar. Figura directamente extraída de la tesina de Master de G.Iruela Martín.

Los cambios observados al añadir el péptido VSL12 afectan a los mismos residuos del dominio único que anteriormente se había demostrado que estaban afectados por la unión de este péptido a USH3: los residuos T37, A55, E60, K62, T74, A79, L82, G84 (Maffei et al., 2015) y por tanto confirmando que Rover conserva los mismos puntos de interacción entre el dominio SH3 y Único, aun y con la presencia de proteínas fluorescentes. Por otro lado, no se observan cambios en el dominio SH4, que participa en el FC pero no está afectado por la unión de VSL12 en USH3.

Este efecto puede observarse en la Figura 2.6 en la que se comparan los desplazamientos químicos de la región desordenada en presencia de VSL12. La interacción de VSL12 con el dominio SH3 compete con la interacción entre la región desordenada y el SH3. Las interacciones que son distintas son las directamente relacionadas con la unión de las proteínas fluorescentes al SH4: los residuos iniciales S3, S6, K7 en Rover se ven perturbados por mCherry al igual que en sus formas nativas (Rover vs USrc). Los pequeños cambios observados en los residuos G30 y F64 son consistentes con las pequeñas diferencias observadas entre Rover y USH3 en ausencia de VSL12.

Aunque los resultados con el péptido VSL12 confirman que las medidas de FRET pueden ser utilizadas para detectar interacciones de compuestos que afecten el “fuzzy complex”, estos resultados

preliminares pusieron de manifiesto algunas limitaciones del método que llevaron a diseñar un nuevo biosensor.

Las principales limitaciones de Rover era la baja eficiencia de FRET y los problemas de reproducibilidad debidos a la maduración incompleta de los cromóforos que podía variar entre preparaciones distintas.

El nuevo diseño se basó en el uso de un par de proteínas fluorescentes distinto y la introducción de un control interno que permitiera comparar la eficacia del efecto FRET de preparaciones del sensor que pudieran mostrar distintos niveles de maduración del cromóforo.

2.3. Diseño optimizado: CLOBY

Para el diseño del sensor optimizado se cambio de las proteínas fluorescentes GFP y mCherry por el uso de las novedosas mClover3(GFP) y mRuby3(RFP) (Bajar et al., 2016). Estas proteínas fluorescentes de ultima generación tienen una serie de mejores sustanciales en comparación con sus predecesores, principalmente, su rendimiento cuántico fluorescente (ϕ) y sus coeficientes de extinción molar(ϵ) que juntos resultan en una mayor fluorescencia por parte de la proteína. Estos cromóforos muestran también un aumento sustancial de su fotoestabilidad, aumento en la velocidad de maduración y la optimización de la proteína para evitar la formación de dímeros, algo común en otras proteínas fluorescentes (Kotera et al., 2010; Vinkenburg et al., 2007). El par mClover3/mRuby3 forma un par FRET más eficiente con un radio de Förster de 6.5 nm. El nombre del sensor CLOBY refleja los nombres de las proteínas fluorescentes que lo constituyen **CLO**ver y ru**BY**. La tabla 3 contiene una comparativa de FPs de Rover con CLOBY y otros pares FRET.

El gen sintético fue producido por la compañía ATG:biosynthetics, con codones optimizados para la expresión en *Escherichia coli*, e insertado en un vector PET19b-X con una cola de histidinas para facilitar su posterior purificación. Este vector fue transformado en células *E.coli* OMNIMAX (Novagen) para su secuenciación y en células *E.coli* B121(DE3) para su expresión, la cadena de aminoácidos descrita abajo esta extraída a partir de la cadena de nucleótidos obtenidos en la secuenciación del gen sintético producido. A continuación se muestra la construcción de CLOBY y su secuencia de aminoácidos (figura 2.7).



```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
MGHHHHHHH HHSSGHIDD DKHMVSKGEE LFTGVVPILV ELDGDVNGHK FSVRGEGED ATNGKLT LKF ICTTGKLPVP WPTLVTTFGY GVACFSRYPD
110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
MKQHDFFKS AMPEGYVQER TISFKDDGTY KTRAEVKFEG DTLVNRIELK GIDFKEDGNI LGHKLEYNFM SHVYVITADK QKNCIKANFK IRHNVEDGSV
210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
QLADHYQQNT PIGDGPVLLP DNHYLSHQSK LSKDPNEKRD HMLLLEFVTA AGITHGMDL YKGGGENLYF QGSNKSKPKD ASQRRRSLEP AENVHGAGGG
310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
AFPASQTPSK PASADGHRGP SAAFAPAAAE PKLFGGFNS DTVTSPQRAG PLAGGVITTFV ALYDYESRTE TDLSEFKKER LQIVNTEGD WWLAHSLSTG
410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
QTGYIPSNYV APSDSGSAGG ANAMVSKGEE LIKENMRMKV VMEGSVNGHQ FKCTGEGEGR PYEGVQVMRI KVIEGGPLPF AFDILATSFM YGSRTFIKYP
510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
ADIPDFFKQS FPEGFTWERV TRYEDGGVVT VTQDTSLEDG ELVYNVKVRG VNFPSNGPVM QKKTGWEPN TEMMYPADGG LRGYTDIALK VDGGGHLHCN
610     620     630     640     650     660
FVTYRSKKT VGNIKMPGVH AVDHRLERIE ESDNETYVVQ REVAVAKYSN LGGGMDELYK

```

Figura 2.7: Estructura de dominios y secuencia de CLOBY. El código de colores permite distinguir los elementos de la proteína de fusión: Tag de histidinas (amarillo), mClover3 (verde), Sitio de corte de la proteasa TEV (rosa), dominios SH4 (lila), Único (azul), SH3 (naranja), mRuby3 (rojo), (el resto son espaciadores entre c-Src y las FPs).

Otro cambio en el sensor fue la introducción de un sitio de corte con la proteasa TEV, con la cual mejoramos el control previo de Rover y solventamos problemas de reproducibilidad ya que con esta proteasa escindimos CLOBY y quedan separadas las proteínas fluorescentes, aunque ambas continúan en la muestra. De esta forma, la mezcla de proteínas generada por el corte TEV tiene exactamente los mismos cromóforos de la muestra de CLOBY que proviene, pero sin poder presentar FRET (intramolecular), con esto los cromóforos en el control y el sensor mostrarán idénticos niveles de maduración y constituyen un control interno, necesario cuando se vayan a comparar un gran número de muestras que utilizarán distintos lotes de CLOBY.

La figura 2.8(A,B) muestra los espectros de fluorescencia de CLOBY antes y después del tratamiento con TEV. Se observa claramente la pérdida de la transferencia de energía, que da lugar a un aumento de la fluorescencia del donador y la pérdida de fluorescencia en la región de emisión de mRuby3. La comparación de los espectros normalizados acentúa el cambio provocado por la pérdida de FRET.

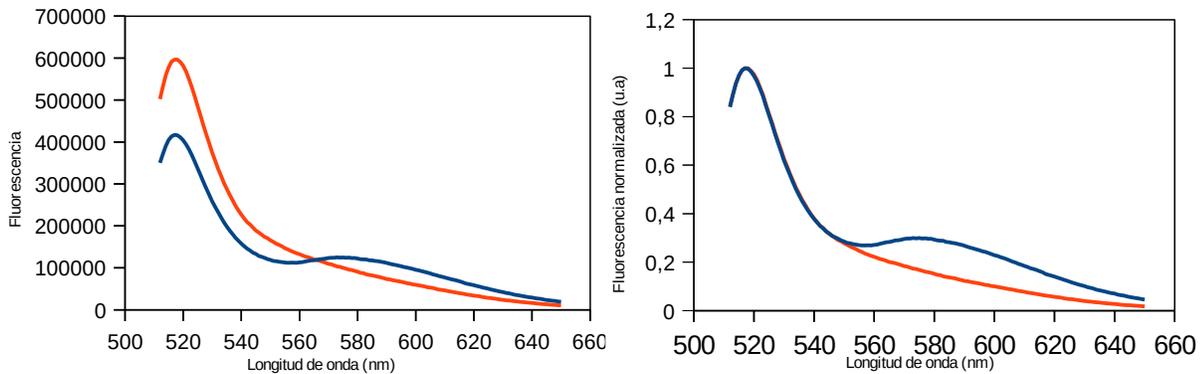


Figura 2.8: (Izquierda) Espectros de fluorescencia de CLOBY(azul) y CLOBY_TEV(rojo); (Derecha) Espectros normalizados, CLOBY (azul) y CLOBY_TEV (rojo)

Al igual que en Rover el problema de la maduración de las proteínas fluorescentes y concretamente las RFPs tiene su origen en que la especie fluorescente proviene de la modificación de varios residuos de la proteína original en un proceso que requiere el correcto plegamiento de la proteína e implica un paso de oxidación mediante oxígeno molecular y la pérdida de una molécula de agua (en

el cromóforo verde) y de agua más dos protones adicionales en el cromóforo rojo, siendo estas últimas limitantes para la total maduración de las RFPs y dando lugar entre otras cosas a un rendimiento de maduración más bajo en mRuby3 que en mClover3, donde con mRuby tendremos entre el 50-70% de la muestra de proteína bien madurada y con mClover3 con un rendimiento del 85-95% de muestra bien madurada (la variación dependerá del lote de proteína expresado).

Un problema adicional asociado a la maduración de mRuby3 y otras RFP's es que se produce una reacción secundaria que da lugar a una forma truncada. Esta segunda especie se observa por electroforesis SDS-PAGE y ha sido confirmada por espectrometría de masas (figura 2.9), puede separarse de la forma madura por cromatografía de exclusión molecular, aunque la separación es sólo parcial. La masa observada experimentalmente de la forma truncada (53406 Da, figura 2.9) se corresponde aproximadamente con la masa de 53408 esperada de Cloby truncado a partir de la secuencia MYG que es la que da lugar al cromóforo de mRuby, más la pérdida de una molécula de agua en la maduración de mClover3. Las dos unidades de masa restantes podrían corresponder a una insaturación adicional, como la observada en la maduración de mRuby3.

Dada que la cantidad de CLOBY necesaria para los ensayos es mucho menor que la obtenida en las expresiones típicas, seleccionando las primeras fracciones de elución puede obtenerse CLOBY no contaminado por la forma degradada.

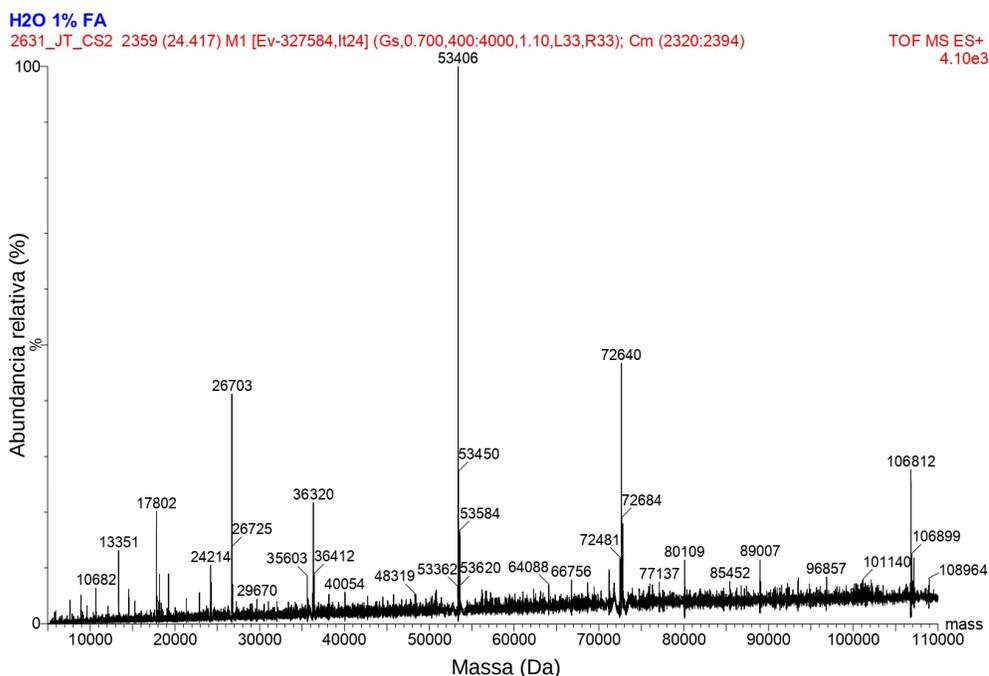


Figura 2.9: Espectro de masas deconvolucionado de la segunda especie resultante de la truncación de CLOBY

La estructura correcta de Cloby fue confirmada por espectrometría de masas (figura 2.10). La masa de 72639 corresponde a la proteína en la que la primera metionina ha sido procesada. El peso molecular teórico de la proteína sin madurar es 72680. La diferencia se debe a la maduración de los cromóforos que implica la pérdida de dos moléculas de agua y al menos una insaturación adicional en otras proteínas fluorescentes.

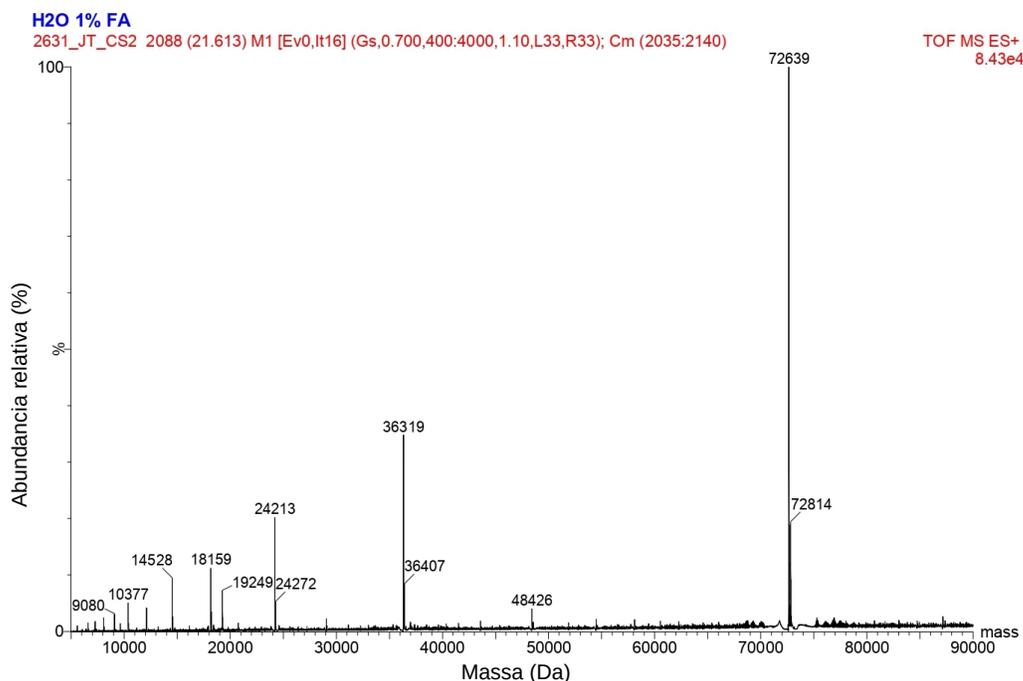


Figure 2.10: Espectro de masas deconvolucionado de CLOBY

2.4. Estudio por RMN de CLOBY y CLOBY-TEV

La figura 2.11 muestra los espectros ^1H - ^{15}N -HSQC de CLOBY, CLOBY-TEV y USH3 medidos a 278 K y 298 K. Los espectros a 278K están dominados por las señales de la región desordenada que es común a los tres sistemas. Puede observarse que la mayoría de desplazamientos químicos son idénticos, demostrando que el entorno de la región desordenada no está afectado por la presencia de las proteínas fluorescentes. Los espectros a 298K muestran un gran número de señales que corresponden a los dominios globulares y que muestran una mayor dispersión espectral.

El número de picos visibles es mayor en CLOBY y CLOBY-TEV que en USH3 debido a la contribución de las señales de mClover3 y mRuby3. El mayor número de picos se observa en CLOBY-TEV que contiene mClover3 libre. La intensidad de alguno de los picos del dominio SH3 se atenúa en el orden USH3, CLOBY-TEV, CLOBY, consistente con el aumento del tiempo de correlación experimentado por este dominio en presencia de una o las dos proteínas fluorescentes fusionadas. Es interesante que CLOBY-TEV mantiene la proteína mRuby3 unida al dominio SH3, sin embargo la intensidad de las señales del dominio SH3 disminuyen considerablemente cuando mClover se encuentra unida al dominio SH4, en el otro extremo de la región desordenada.

Esta observación es consistente con el mantenimiento de la interacción SH4-SH3 que estabiliza el “fuzzy complex”.

La figura 2.12 muestra expansiones de algunas regiones de los espectros de CLOBY, CLOBY-TEV y USH3 superpuestos en las que se muestra que la mayoría de las señales de USH3 no están afectadas por la presencia de las proteínas fluorescentes con la excepción de algunos residuos cerca del extremo N-terminal de SH4 que se encuentran directamente afectados por la presencia del espaciador que une a la proteína mClover3, y algún residuo cerca del extremo C-terminal del dominio SH3 que está unido a mRuby3.

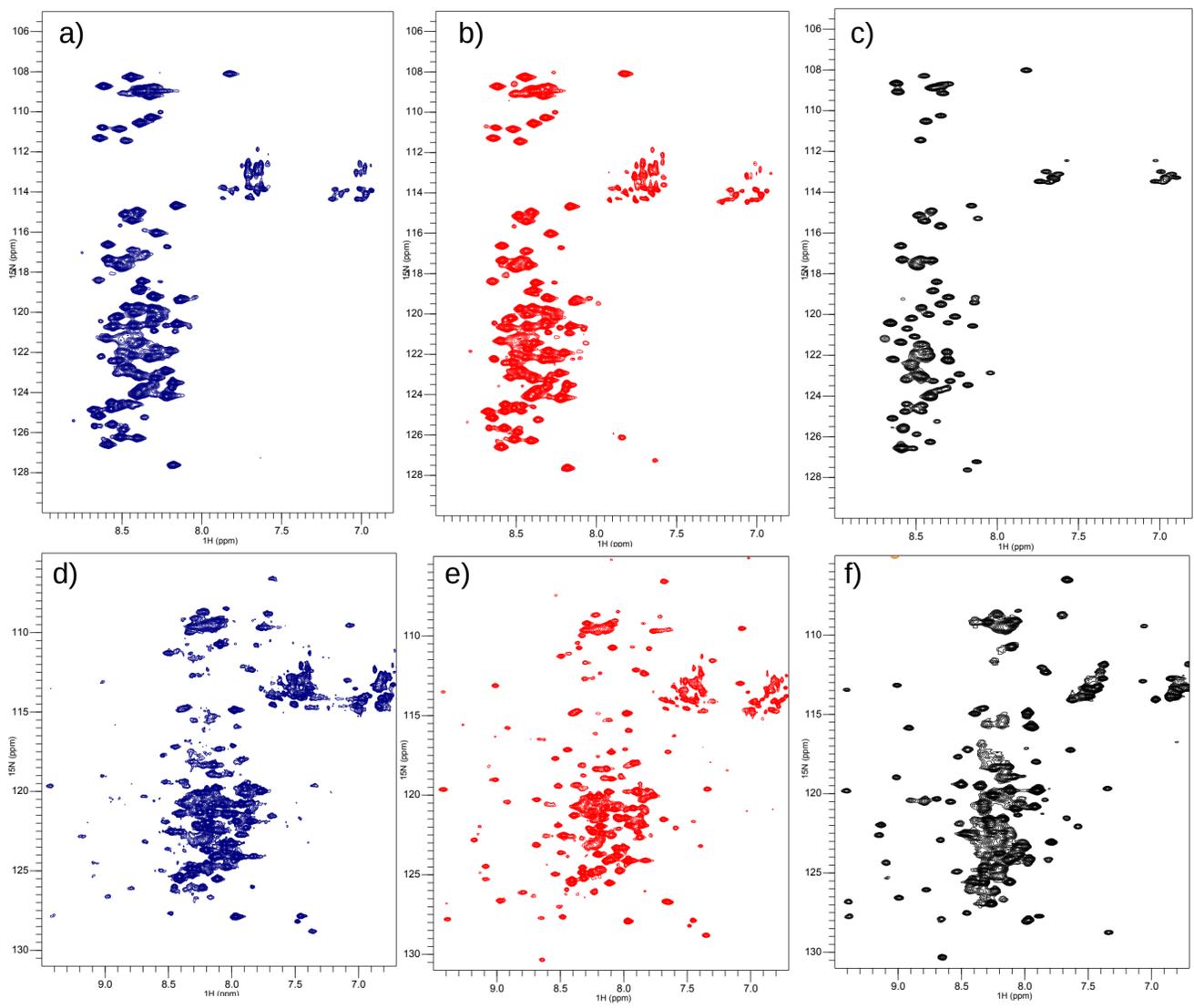


Figura 2.11: Espectros ^1H - ^{15}N -HSQC de CLOBY (A,D); CLOBY-TEV (B,E); y USH3 (C,F) medidos a 278 K (A-C) o 298 K (D-F). Los espectros fueron medidos en un equipo de 600 MHz a una concentración de proteína de 150 μM .

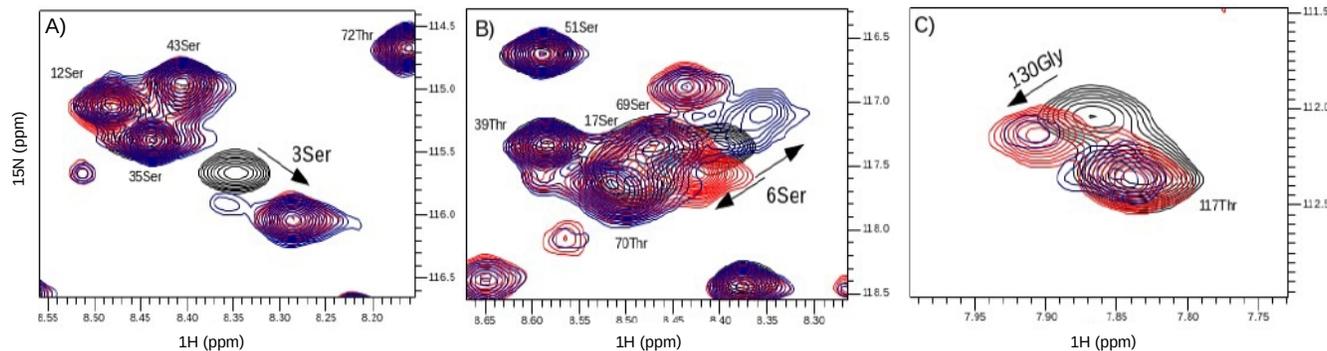
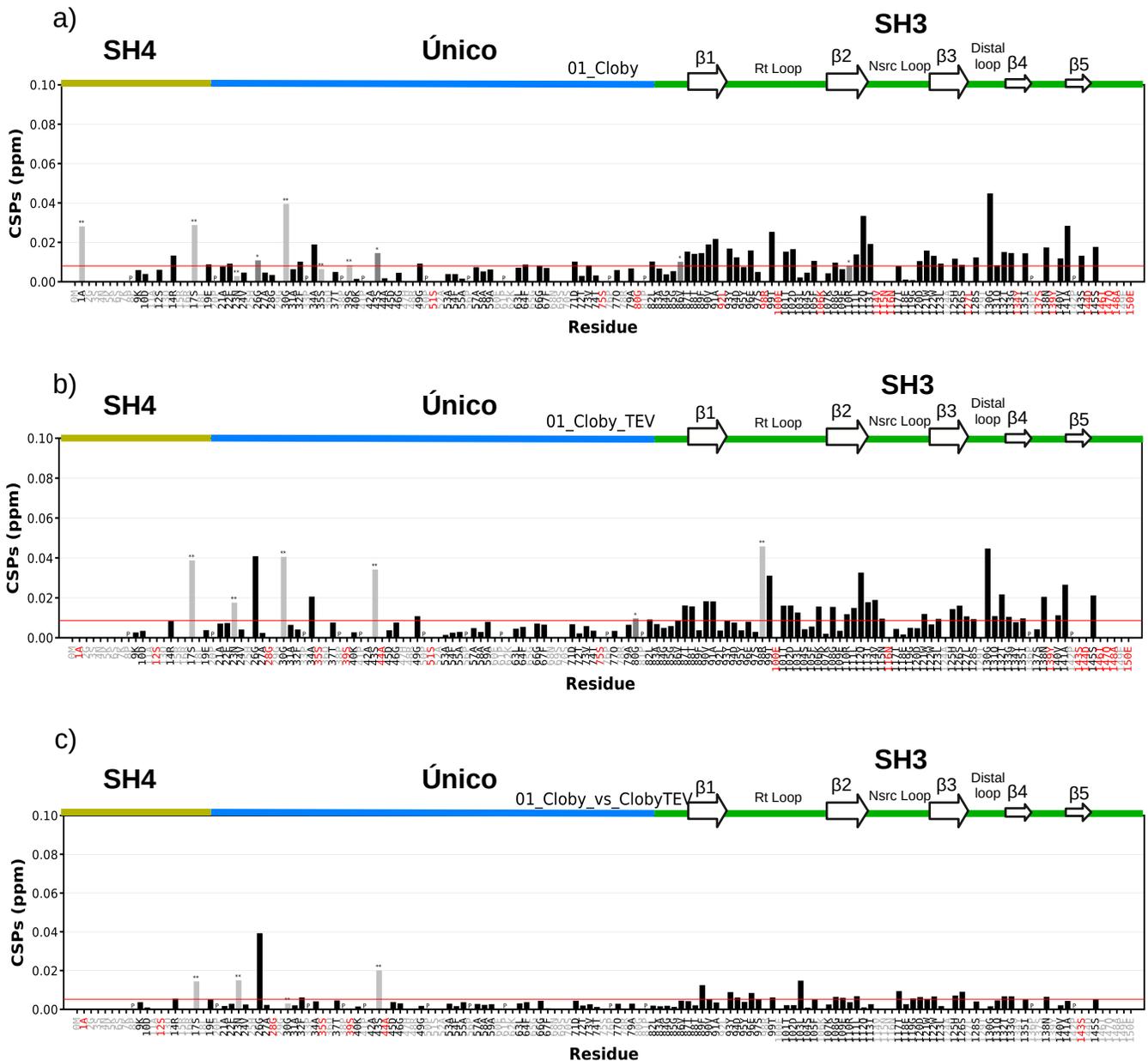


Figura 2.12: Expansión de una superposición de regiones seleccionadas de los espectros ^1H - ^{15}N -HSQC de CLOBY (azul), CLOBY-TEV (rojo) y USH3 (negro).

Un análisis detallado de las perturbaciones de desplazamiento químico causadas por las proteínas fluorescentes sobre las señales de USH3 se muestra en la figura 2.13. Las mayores perturbaciones se observan en el dominio SH3, y son algo más importantes en el caso de CLOBY que en CLOBY-TEV, a pesar de que la proteína eliminada por la acción de la proteasa no está directamente unida al dominio SH3. La comparación directa de CLOBY y CLOBY-TEV muestra que los cambios causados por la eliminación de mClover3 son muy pequeños, destacando los cambios en G26 (a 298K en CLOBY-TEV) y R48, aparte de las perturbaciones directamente atribuibles a la unión directa de mClover3. G26 y R48 se encuentran junto a los residuos de histidina (H25 y H47), por lo que no es descartable que su perturbación se origine en ligeras diferencias en el estado de protonación de estos residuos, sea por pequeñas variaciones en el pH real de la muestra, sea por cambios en el pKa de las cadenas laterales de histidina por variaciones en el entorno electrostático en el interior del “fuzzy complex”.



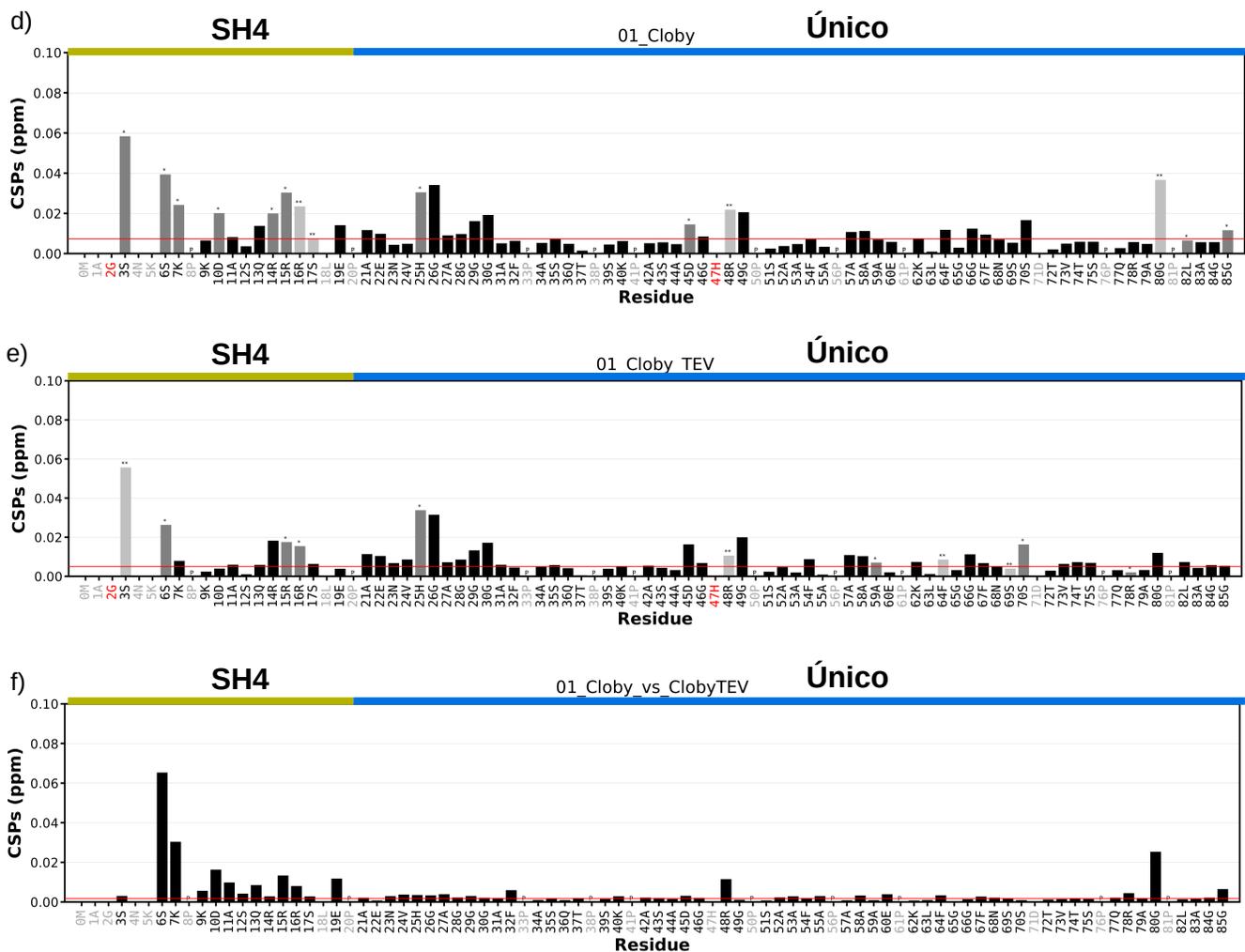


Figura 2.13: (A,B,D,E) Perturbación del desplazamiento químico inducida por la presencia de las proteínas fluorescentes fusionadas en los extremos de USH3 respecto a USH3 nativo medidas a 298 K (A-C) o a 278 K (D-F). (C, F) Perturbaciones causadas por el corte del espaciador entre mClover3 y el dominio SH4 mediante la proteasa TEV. La línea en rojo indica el valor de la media de las perturbaciones del decil inferior más 5 desviaciones estándar. Los valores marcados con asteriscos y bandas grises representan asignaciones con baja fiabilidad. La los residuos en rojo indican picos no asignados en CLOBY y CLOBY-TEV. La marca x en gris representa residuos no asignados en USH3. El símbolo p representa prolina. Figuras producidas por el programa FarSeer-NMR desarrollado en nuestro laboratorio.

Las figuras presentadas obtenidas del programa FarSeer-NMR desarrollado en nuestro laboratorio (Teixeira et al., 2018).

2.5. Efecto de la concentración sobre la fluorescencia de CLOBY

Los estudios previos con Rover nos mostraron que el rango máximo de trabajo óptimo para evitar interacciones intermoleculares está alrededor de 1-3 μM . Teniendo esto en cuenta procedimos a analizar Cloby a diferentes concentraciones para encontrar, al igual que en Rover, la concentración óptima de trabajo. Para ello medimos la fluorescencia de CLOBY entre 510nm y 650nm, excitando a la longitud de máxima excitación de mClover3, $\lambda_{\text{exc}}=506\text{nm}$ y observaremos los cambios producidos en sus máximos de emisión, $\lambda_{\text{em}}=518$ para mClover3 y $\lambda_{\text{em}}=592$ para mRuby3. Para comprobar que el control trabaja de manera similar, una vez purificada CLOBY se separa en dos soluciones, en la que una recibirá el tratamiento TEV y la otra será tratada igual pero sin añadir TEV.

La figura 2.13 muestra el cambio de fluorescencia de Cloby en el rango de concentraciones que va entre 6 μM y 0,1 μM (100 nM). Los resultados muestran un aumento del efecto FRET

intermolecular a concentraciones menores que las observadas en Rover, reflejando así que el uso de proteínas fluorescentes de nueva generación aumenta la eficiencia del FRET y la capacidad de mostrar interacciones no deseadas para este proyecto a concentraciones menores. Como se observa en la figura 2.13(a) podemos ver que la emisión a 592 nm, normalizada respecto a la emisión de mClover3 a 518 nm aumenta con la concentración de CLOBY, indicando que hay una contribución intermolecular al FRET observado. Cabe señalar que el efecto FRET causa una disminución de la fluorescencia directa emitida por el donador, por lo que la normalización respecto a esta intensidad acentúa el cambio observado a 592 nm. A concentraciones suficientemente bajas (entre 0.1 μM y 1 μM) el efecto FRET es independiente de la concentración, por lo que asumimos que persiste únicamente el FRET intramolecular (figura 2.13(a,b)).

El carácter intermolecular del FRET observado a concentraciones elevadas de CLOBY se confirma al estudiar el efecto de la concentración sobre la fluorescencia de CLOBY-TEV en la que las dos proteínas se encuentran a la misma concentración que la muestra de CLOBY de la que proceden, pero no se encuentran unidas. La figura 2.13c,d muestra que a concentraciones mayores de 1 μM el FRET de CLOBY-TEV aumenta con la concentración.

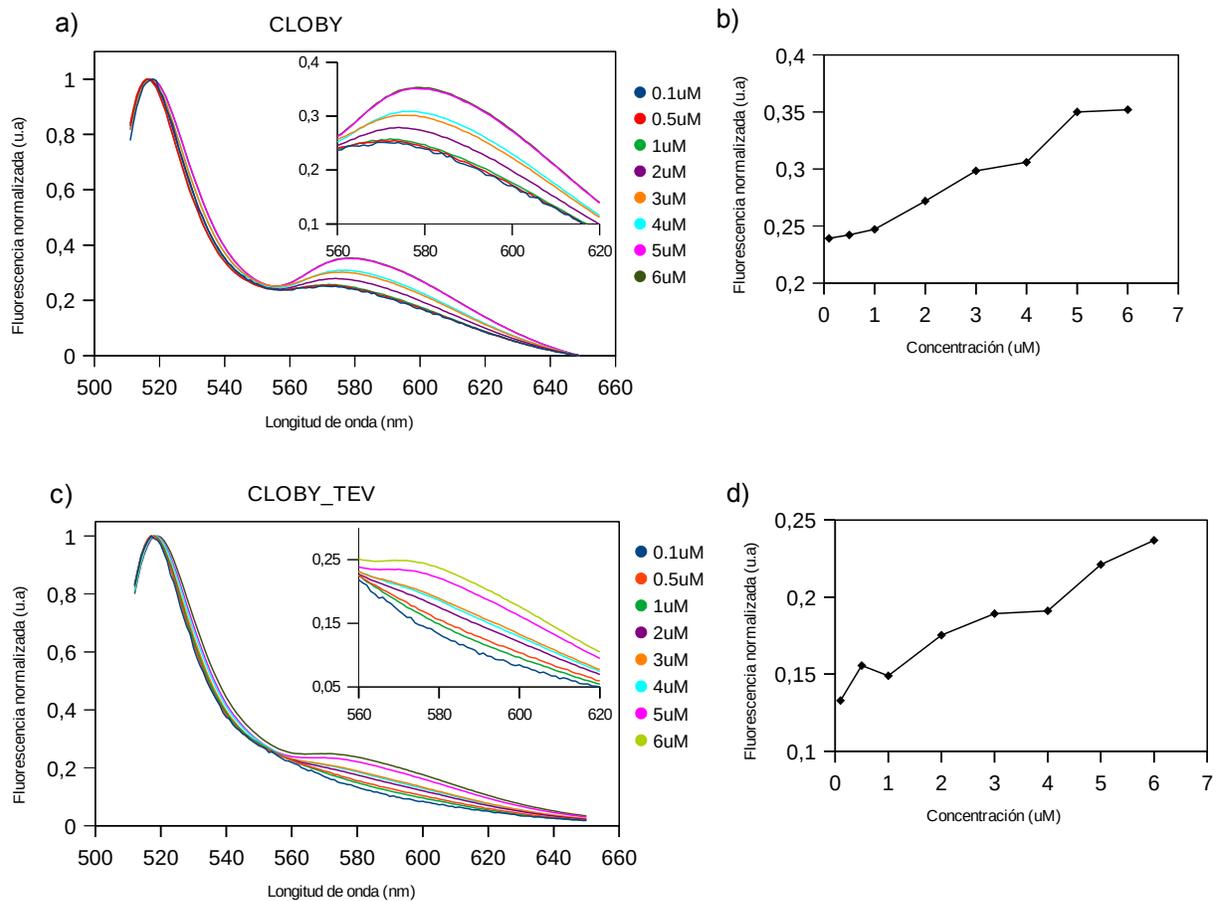


Figura 2.14: (A,C) Espectros de fluorescencia normalizados a diferentes concentraciones (0,1-6 μM) superpuestos con una expansión de la región donde se produce FRET (emisión de mRuby3), a) CLOBY c) CLOBY-TEV. (B,D) Intensidad de la fluorescencia (normalizada) a 580 nm, el máximo experimental en la región FRET (emisión de mRuby3), (C) CLOBY (D) CLOBY-TEV.

Una vez concluido el estudio de concentración óptima de CLOBY el resto de nuestros estudios se realizó a una concentración fija de 1 μM .

2.6. CLOBY como sensor ambiental de Src

La hipótesis de trabajo sobre cual es el papel funcional de la región desordenada de Src, más allá de actuar como espaciador entre los dominios globulares y el dominio de anclaje a la membrana, es que las regiones intrínsecamente desordenadas actúan como sensor ambiental, cambiando el equilibrio conformacional del “fuzzy complex” en respuesta a las condiciones que Src encuentra en un determinado entorno celular. Estas interacciones ambientales pueden incluir cambios en el entorno fisicoquímico (pH, fuerza iónica), interacciones con lípidos, o interacciones con otras proteínas. Las características de las regiones desordenadas pueden también ser activamente moduladas dentro de la célula mediante modificaciones post-traduccionales, por ejemplo fosforilaciones, que son abundantes en regiones desordenadas y están facilitadas por la accesibilidad de los sitios susceptibles de modificación a los enzimas (e.g. quinasas) celulares.

Las interacciones electrostáticas son importantes en los equilibrios conformacionales en los que participan proteínas desordenadas, generalmente ricas en residuos cargados. Se trata de interacciones a larga distancia que pueden interaccionar de forma compleja definiendo los rangos de distancias más favorables entre determinados residuos, e incluso influyendo en la carga global en el caso de residuos de histidina cuyo pKa puede ser modificado por el acercamiento de grupos cargados.

Los dominios SH4, Único y SH3 (residuos 1-145) de Src contienen el mismo número (14) de residuos cargados positivamente (K o R) o negativamente (D o E) y tres residuos de histidina. Su punto isoelectrónico teórico es 7.04. Sin embargo, hay una clara distribución asimétrica de las mismas, con un claro predominio de las cargas positivas en la región desordenada (carga global +4, más dos histidinas) y de las cargas negativas en el dominio SH3 (carga global -4, más una histidina).

mClover3 y mRuby3 tienen una carga global neta negativa y puntos isoelectrónicos de 5.78 y 5.81 respectivamente. CLOBY tiene un punto isoelectrónico calculado de 6.13.

La importancia de las interacciones electrostáticas puede estimarse a partir del efecto de cambios en la fuerza iónica.

2.6.1. Efecto de la fuerza iónica

El efecto de la fuerza iónica se estudió observando los cambios de fluorescencia de una muestra de CLOBY o CLOBY_TEV (1 μ M) en tampón fosfato 50 mM pH=7,5 variando la concentración de NaCl. entre 0 mM y 1200 mM. La fluorescencia se midió excitando mClover3 (λ_{ex} =506) y midiendo la emisión desde λ =512nm hasta λ =650nm.

La figura 2.15(a) muestra espectros de fluorescencia de CLOBY a distintas fuerzas iónicas. Pueden observarse dos efectos distintos en función del rango de concentración de sal. Hasta aproximadamente 300 mM NaCl se observa una disminución de la intensidad de la emisión a 582 nm, como puede observarse más detalladamente en la figura 2.15(b) en la que se muestran los valores normalizados respecto a la fluorescencia a 582 nm. Estos datos indican una disminución del FRET intramolecular al aumentar la fuerza iónica causado por un aumento de la distancia entre las proteínas fluorescentes.

A mayores concentraciones de sal se observa un segundo efecto que es una disminución aproximadamente lineal de la intensidad en todo el espectro, aunque comparando la intensidad a 582 nm en los espectros normalizados se observa un aumento, que podría sugerir una ligera ganancia de FRET.

El control de la fuerza iónica en proteínas ha sido ampliamente estudiado y se sabe que a bajas concentraciones de sal la solubilidad de las proteínas aumenta pero, por otro lado tenemos el efecto contrario cuando aumentamos en exceso la fuerza iónica ya que los iones compiten con el agua para solvatar la proteína de tal manera que acaban haciéndola precipitar. Este efecto se denomina “Salting out” (Duong-Ly & Gabelli, 2014).

El efecto observado en CLOBY a altas concentraciones (no fisiológicas) de sal podría deberse a un efecto de “salting out”. Aunque no se observa precipitación, es posible que se formen agregados solubles lo que podría dar lugar al ligero aumento de FRET observado a altas concentraciones de sal.

Las muestras de CLOBY-TEV muestran únicamente la disminución progresiva de la fluorescencia con la fuerza iónica (Figura 2.15(c,d), confirmando que los cambios en el efecto FRET observado hasta 300 mM NaCl son debidos a la modulación de la distancia entre los dos cromóforos de CLOBY.

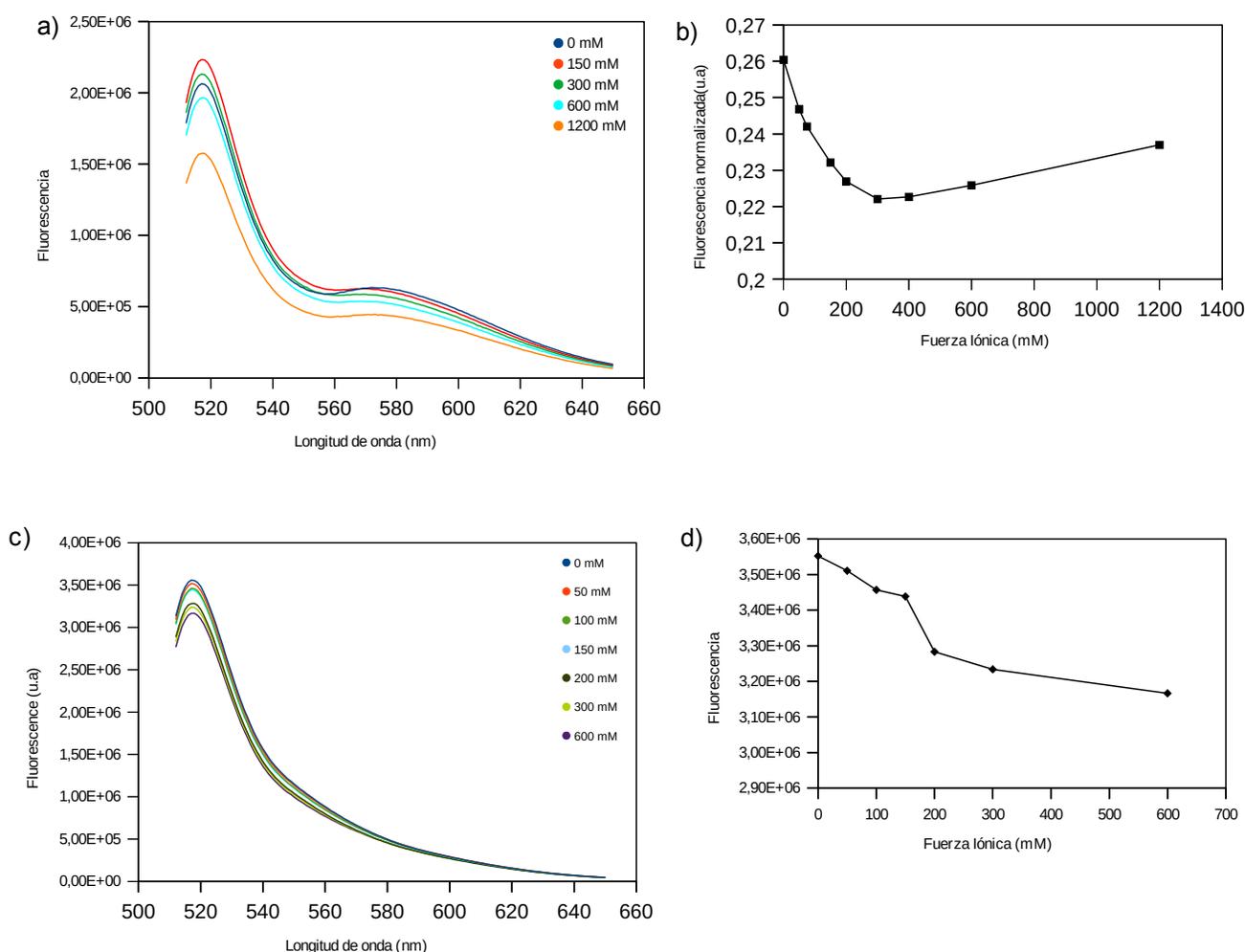


Figura 2.15: (A,C) Espectros de fluorescencia (normalizado para CLOBY) a diferentes concentraciones de NaCl superpuestas, a) CLOBY c) CLOBY-TEV. (B,D) Intensidad de la fluorescencia (normalizada para CLOBY(b)) a 580 nm, el máximo experimental en la región FRET (emisión de mRuby3), (C) CLOBY (D) CLOBY-TEV.

Efecto de la fuerza iónica confirma que las interacciones electrostáticas favorecen la compactación del “fuzzy complex” y al aumentar la fuerza iónica, y por tanto apantallar dichas interacciones, la compactación disminuye.

2.6.2. Efecto del pH

El número de cargas puede modificarse por cambios de pH, que afectan al estado de protonación de las histidinas en un rango de pH cercano al fisiológico. Se midieron espectros de fluorescencia de CLOBY y CLOBY-TEV entre pH 8,0 y 5,5 que incluye el pKa esperado para el grupo imidazol de la histidina. Los resultados se muestran en la figura 2.16(a,c).

Se observa una disminución marcada de la intensidad de la fluorescencia, reminiscente a la observada a alta fuerza iónica. La comparación de los espectros normalizados respecto al máximo de emisión a 518 nm se muestran en la figura 2.16(b,d). Se observa un aumento relativo de la emisión de mRuby3 sugiriendo un pequeño efecto FRET. Sin embargo, por analogía a lo observado a altas fuerzas iónicas, lo más probable es que dicho aumento sea el resultado de agregación en la proximidad del punto isoeléctrico,

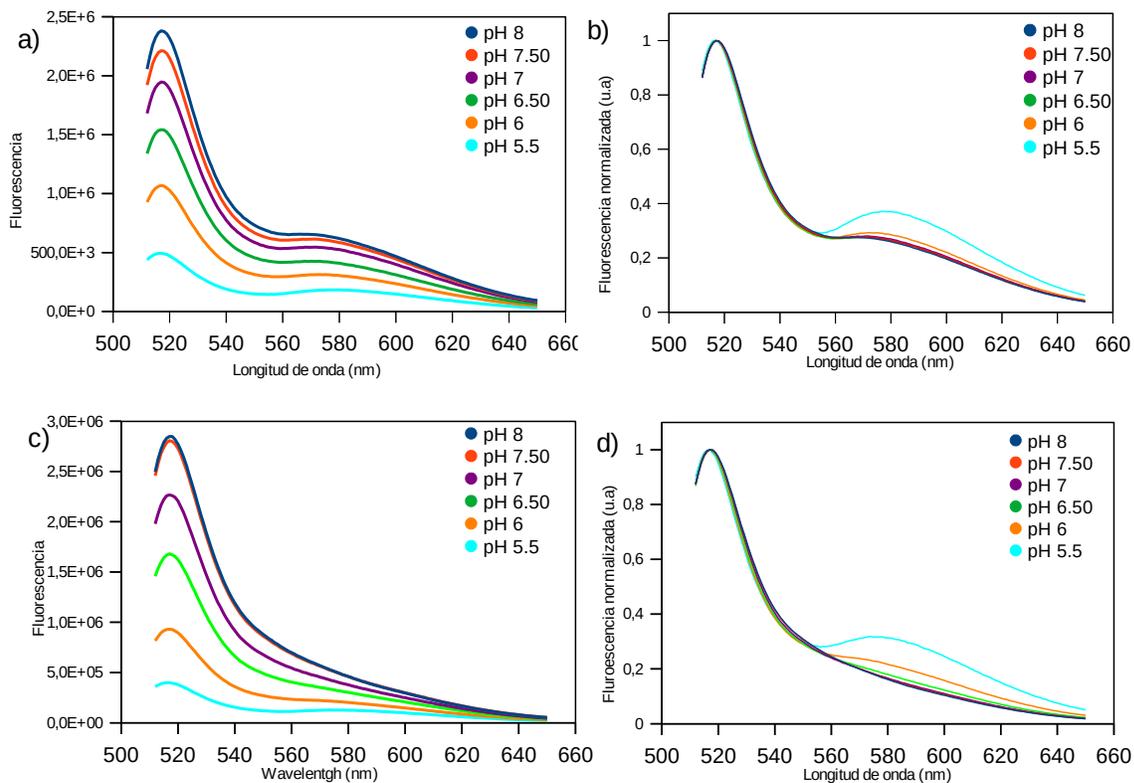


Figure 2.16: (a,c) Espectros de fluorescencia a diferentes pH superpuestos, (a) CLOBY , (c) CLOBY-TEV. (b,d) Espectros normalizados de la fluorescencia a diferentes pH superpuestos, (b) CLOBY, (d) CLOBY-TEV.

El carácter intermolecular del FRET observado en la cercanía del punto isoeléctrico se confirma comparando los espectros de CLOBY-TEV a distintos valores de pH (Figura 2.16 (C, D)).

El efecto FRET observado en la muestra tratada con la proteasa TEV confirma su carácter intermolecular y sugiere que a valores de pH menores de 6 son las proteínas fluorescentes las causantes de la agregación observada. Cabe recordar que el punto isoeléctrico teórico de mClover3 es 5.78.

2.6.3. Fosforilación de CLOBY

Dada la dependencia de la fluorescencia con la fuerza iónica y el perfecto balance de cargas entre el dominio SH3 cargado negativamente y las regiones desordenadas cargadas positivamente, es esperable que la introducción de cargas negativas adicionales por fosforilación de alguno de los residuos de serina y treonina tenga un efecto importante en la región reguladora N-terminal de Src y que alguno de estos efectos, que afecten la compactación del “fuzzy complex” se puedan monitorizar a partir de las variaciones de FRET en CLOBY.

En la literatura se han descrito distintos sitios de fosforilación en el dominio único de Src (Amata et al., 2014). En trabajos anteriores se estudió el efecto de la fosforilación de S17, T37 y S75 mediante la quinasa Cdk5 activada con p25, sobre las regiones desordenadas en ausencia del dominio SH3 (Pérez et al., 2009). Igualmente se detectó la fosforilación de S69 in vivo por una quinasa intrínseca de *Xenopus laevis* (Amata et al., 2013b). Recientemente se ha observado que la quinasa ERK2 puede fosforilar los residuos T37, S43 y S75 (resultados no publicados).

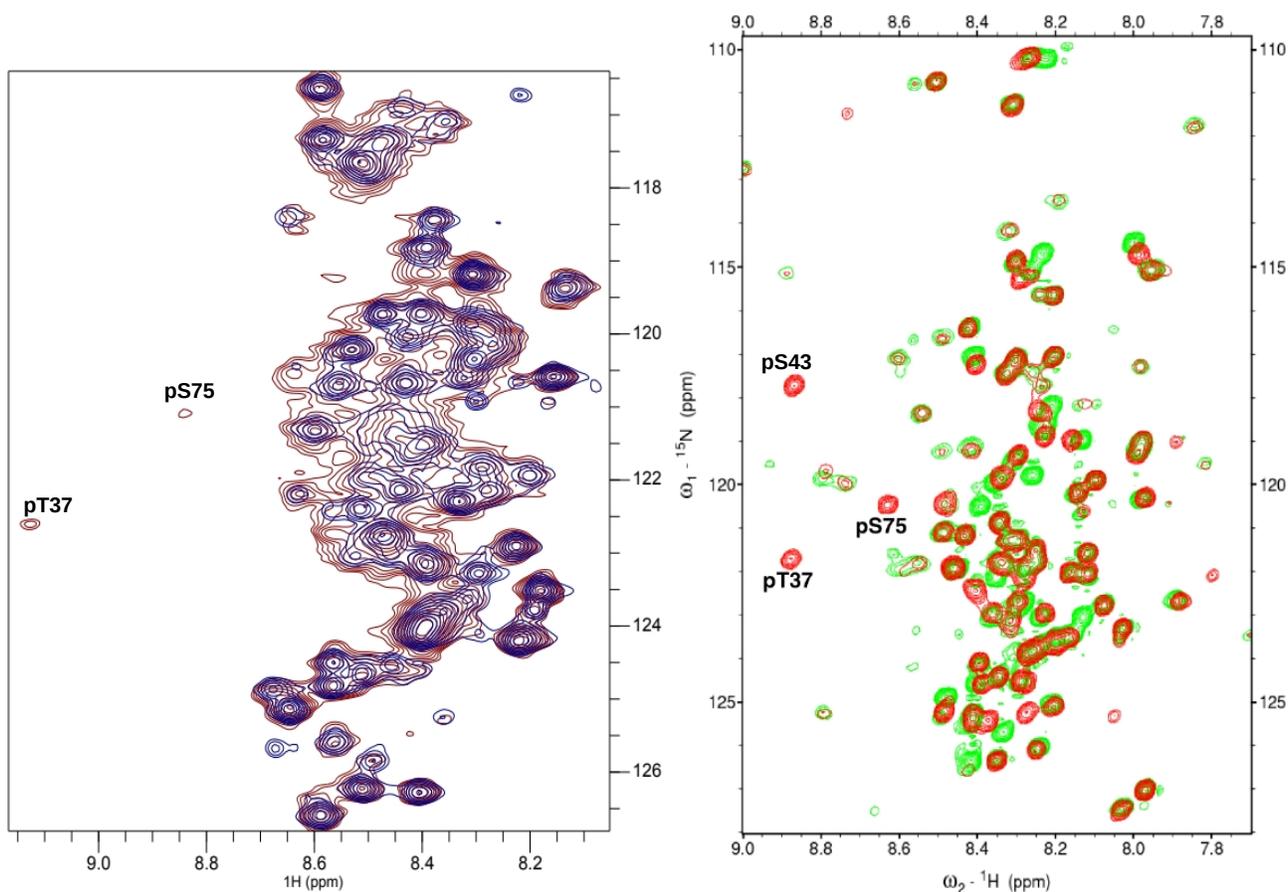


Figura 2.17: Espectros de RMN de las formas no fosforiladas y fosforiladas de CLOBY (con Cdk5 + p25) y USH3 (con ERK2). A la izquierda tenemos el ^1H - ^{15}N -HSQC de CLOBY (azul) y CLOBY fosforilado (granate) medido con un equipo Bruker de 600 MHz. A la derecha tenemos el ^1H - ^{15}N -HSQC de USH3 (rojo) y USH3 fosforilado (rojo), obtenido de la Tesina de Master de S. Yen (Universidad de Toronto, 2018). La interpretación de la fosforilación inesperada en S43 fue realizada en el servicio de espectrometría de masas del IRB, Barcelona.

En este apartado se presenta el efecto de la fosforilación en T37 y S75 o en los dos residuos anteriores más S43 sobre la fluorescencia de CLOBY.

La fosforilación mediante Cdk5 + p25 de CLOBY da lugar a la aparición de las señales de RMN de las formas fosforiladas de T37 y S75 con desplazamientos químicos comparables a los previamente descritos para el dominio único fosforilado (Pérez et al., 2009). La fosforilación con ERK2 da lugar a la aparición de una señal adicional que fue confirmada por espectrometría de masas de péptidos obtenidos por digestión triptica, que correspondía a S43 fosforilado (figura 2.17).

La figura 2.18 muestra los espectros de fluorescencia de CLOBY antes y después de ser tratados con Cdk5 + p25 o ERK2 y ATP.

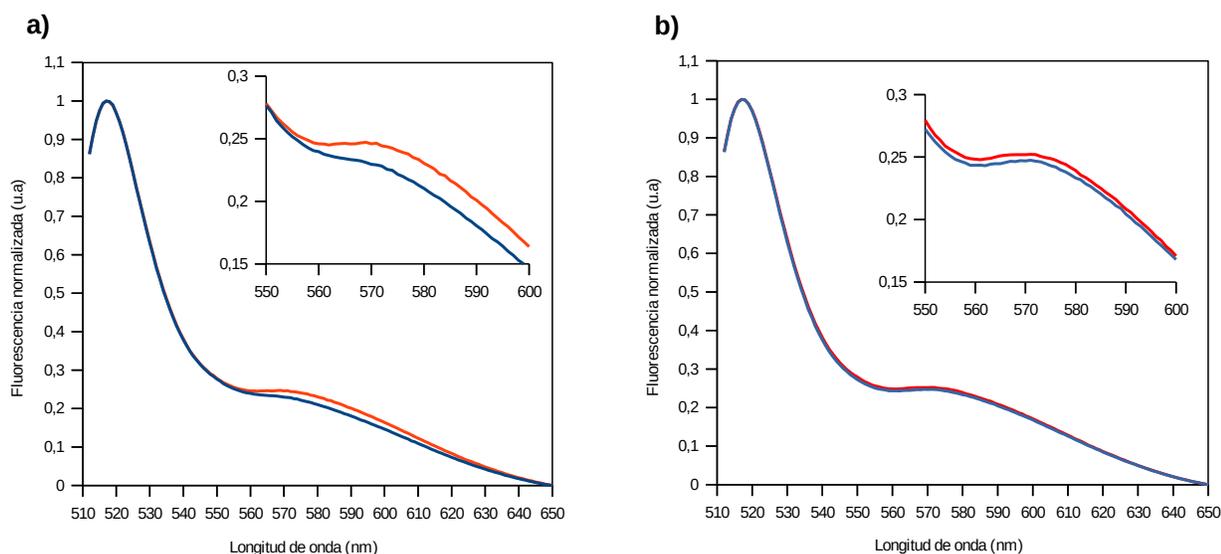


Figura 2.18: Espectros de fluorescencia normalizados de CLOBY fosforilada y sin fosforilar con expansión en la región de FRET (emisión de mRuby3). (a) CLOBY (azul) y CLOBY fosforilada con ERK2 (rojo). (b) CLOBY (azul) y CLOBY fosforilada por Cdk5+p25 (rojo).

El efecto causado por la fosforilación de CLOBY con cualquiera de las dos quinasas es un pequeño aumento de FRET que implicaría una compactación de CLOBY fosforilado, respecto a la forma no modificada. El efecto es muy pequeño cuando CLOBY se fosforila con Cdk5 + p25, que únicamente fosforila las posiciones T37 y S75. Este efecto es mucho más aparente cuando se fosforila con ERK2 que introduce tres grupos fosfato en T37, S43, y S75.

La compactación de CLOBY cuando se fosforila puede resultar sorprendente si se tiene en cuenta únicamente el efecto de la fosforilación en la asimetría de cargas entre las regiones desordenadas y el dominio SH3. La fosforilación del dominio único reduce el exceso de carga positiva y por tanto debería causar una expansión del “fuzzy complex” al disminuir la atracción electrostática con el dominio SH3 cargado negativamente. Sin embargo, el efecto observado es el contrario.

La compactación de CLOBY se confirmó mediante mediadas de dispersión dinámica de la luz (“Dynamic light Scattering”, DLS). Estas medidas fueron efectuadas por F.J. Carvajal en su trabajo de máster. Esta técnica es sensible al cambio de posición de las partículas que dispersan la luz en intervalos muy cortos de tiempo y por tanto proporciona una medida del coeficiente de difusión traslacional, que depende de la superficie en contacto con el disolvente.

Los resultados pueden presentarse como Radio Hidrodinámico que es el radio de una partícula esférica que presentaría el mismo coeficiente de difusión de la molécula estudiada (figura 2.18).

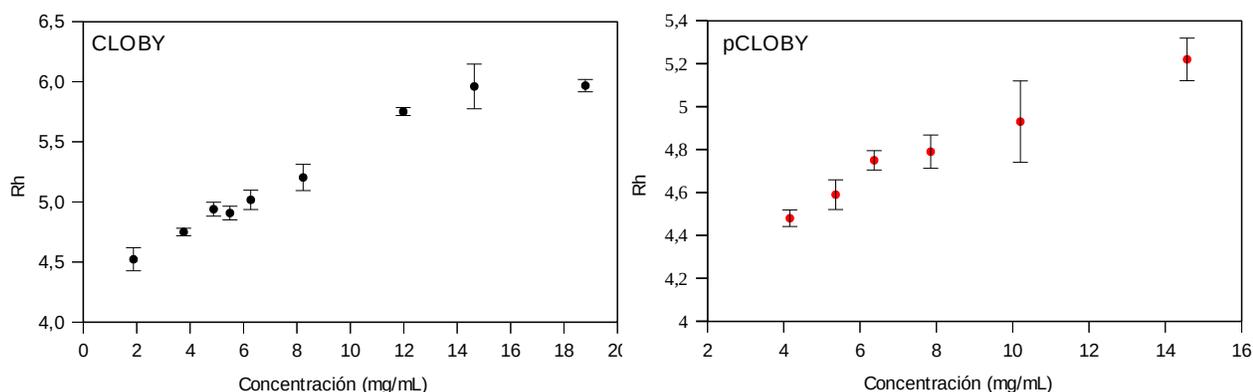


Figura 2.19: Radios hidrodinámicos de CLOBY y CLOBY fosforilada (pCLOBY) en base a la concentración (mg/mL). La barra de error muestra la desviación estándar obtenida a partir de 3 medidas.

Los radios hidrodinámicos de CLOBY, CLOBY-TEV, CLOBY fosforilado y CLOBY-TEV fosforilado en función de la concentración de proteína se presentan en la tabla 4 junto sus desviaciones estándar.

En estos experimentos la proteína fue fosforilada mediante ERK2 y se trabajó en un rango de concentraciones entre 18.9 y 1,9 mg/mL para CLOBY que corresponden a concentraciones entre 250 μ M y 25 μ M. Para CLOBY fosforilado el rango de concentraciones fue entre 4.2 y 14.6 mg/mL.

Estas concentraciones son superiores a las utilizadas en los estudios de fluorescencia. La dependencia con la concentración indica un cierto grado de agregación a altas concentraciones pero los resultados se pueden extrapolar a concentración cero dando valores de radio hidrodinámico de 4.43 nm y 4.24 nm para CLOBY y CLOBY triplemente fosforilado, respectivamente, lo que representa un descenso del 4%.

La compactación causada por la fosforilación de CLOBY podría deberse a la interacción fuerte que puede producirse entre los grupos fosfato y las cadenas laterales de arginina. Hay residuos de arginina en las posiciones 14, 15, 16 (en el dominio SH4), 48, 78 (junto a los sitios de fosforilación en 43 y 75), además de las posiciones 97 y 109 del dominio SH3 (en el RT loop que participa en la interacción con la zona desordenada).

CLOBY			Fosfo-CLOBY			CLOBY-TEV			Fosfo-CLOBY-TEV		
Conc. (mg/mL)	Rh media	SD	Conc. (mg/mL)	Rh media	SD	Conc. (mg/mL)	Rh media	SD	Conc. (mg/mL)	Rh media	SD
18,8	5,97	0,05	14,57	5,22	0,1	7,47	4,02	0,04	3,31	2,79	0,14
14,64	5,96	0,19	10,2	4,93	0,19	5,81	3,89	0,08	2,57	3,78	0,07
11,98	5,75	0,03	7,85	4,79	0,77	4,75	3,84	0,05	2,11	3,77	0,03
8,23	5,2	0,11	6,37	4,75	0,05	3,27	3,79	0,18	1,78	3,74	0,05
6,27	5,02	0,08	5,36	4,59	0,07						
5,49	4,91	0,06	4,16	4,48	0,04						
4,88	4,94	0,06									
3,76	4,75	0,03									
1,88	4,52	0,96									

Tabla 4: Resultados del DLS de CLOBY, CLOBY-TEV y CLOBY, CLOBY-TEV fosforilados (Fosfo-). Rh media: Media de Radios hidrodinámicos (a partir de 3 medidas). SD: Desviación estándar.

Capítulo 3

Cribado de una quimioteca para identificar moléculas que interactúen con la región reguladora N-terminal de Src

3.1. Introducción

El carácter desordenado de la región reguladora N-terminal de Src se mantiene en el “fuzzy complex” intramolecular. No es posible definir un modelo tridimensional estático de dicho complejo y, por consiguiente, no es posible diseñar racionalmente ligandos que interactúen con dicho complejo y modulen sus propiedades. La estrategia elegida ha sido la del cribado masivo de una quimioteca utilizando un biosensor CLOBY y medidas de cambios en la eficiencia del efecto FRET entre las proteínas fluorescentes fusionadas a ambos extremos de la región reguladora de Src. La hipótesis de trabajo es que las interacciones con dicha región pueden hacer cambiar el grado de compactación del “fuzzy complex” lo que resultaría en cambios en las distancias entre ambas proteínas fluorescentes y cambios en la eficiencia de la transferencia de energía. A priori, se considera como un resultado positivo tanto el aumento como la disminución de FRET, ya que no podemos predecir cual va a ser el efecto resultante de esta interacción.

Debe destacarse que esta estrategia no está basada en la medida de la actividad biológica asociada a esta región, es decir, no es un ensayo funcional. Por consiguiente, la posible actividad biológica de los compuestos que se identifiquen mediante ensayos de fluorescencia deberá ser determinada de forma independiente. La ventaja de las medidas de fluorescencia es que permiten el cribado con muy alta eficacia y, por tanto, permite el estudio de un gran número de compuestos. Esta estrategia recibe en inglés el nombre de “High-throughput screening”.

3.2. Preparación de la Quimioteca

La primera decisión estratégica en esta parte del proyecto fue la elección de la quimioteca. Se optó por una quimioteca comercial basada en compuestos que pudieran aportar, por sí mismos, un valor añadido a los ligandos que se pudieran encontrar. En primer lugar se decidió utilizar una colección de compuestos aprobados por la “Food and Drug Administration (FDA)” y que, en su mayor parte, contiene compuestos que están siendo utilizados en clínica, para cualquier tipo de tratamiento. La ventaja de esta quimioteca es que dichos compuestos han demostrado un nivel de toxicidad suficientemente bajo para permitir su uso en humanos. En caso de que alguno de estos compuestos resultara positivo para modular la actividad de Src, la eventual traslación a la clínica sería mucho más fácil. Esta estrategia ha demostrado su utilidad en muchos casos y se conoce en inglés como “drug repurposing”.

Una segunda opción era la búsqueda de compuestos con actividad anticancerosa demostrada, en algunos casos mediante mecanismos de actuación conocidos, pero en otros casos sin que se sepa el modo de actuación. No es descartable tampoco que algunos de los fármacos para los que se conoce un

mecanismo de actuación puedan tener efectos sobre otras dianas, en nuestro caso, la región reguladora N-terminal de Src.

La compañía Selleckchem dispone de la quimioteca (ref L1300) formada por 1443 compuestos aprobados por la FDA. Asimismo ofrece la quimioteca (ref L3000) formada por 424 compuestos con actividad anti cáncer. Ambas colecciones de compuestos tienen un solapamiento importante por lo que se adquirió una quimioteca personalizada (ref L2000) formada añadiendo a las L1300 los 226 compuestos, de la quimioteca L3000 que no estaban aprobados por la FDA. La quimioteca final estaba formada por 1669 compuestos en placas de 96 pocillos, cada uno con 100 μL de una disolución 1 mM del compuesto correspondiente disuelto en DMSO.

3.2.1 Preparación del cribado inicial

Para realizar el screening, debido a que la concentración de trabajo para Cloby es tan bajo (1 μM) y los compuestos de la librería están a 10 μM , para su preservación y facilidad de análisis se realizaron una serie de copias de la fuente madre. Estas copias se realizaron cogiendo 2 alíquotas de 30 μL de cada compuesto de la librería principal, repartidos en las copias A y B, finalmente se recogió 10 μL de cada compuesto y se diluyó con 90 μL de DMSO para tener una concentración de 100 μM facilitando su uso. Todas las alíquotas se traspasaron a otros platillos de 96 pocillos en el mismo orden utilizando un robot Crystal Phoenix RE de Art Robbins Instruments, de la plataforma automatizada de cristalografía del Parque Científico de Barcelona.

El cribado inicial se realizó en placas de 96 pocillos divididas por 8 filas (A-H) y 12 columnas (1-12). Las posiciones de los compuestos en las placas utilizadas para el cribado reproducen las posiciones de las placas de la quimioteca inicial. En la librería de compuestos la última columna estaba libre, así que se decidió que se usaría la última columna como referencia para medir cada placa. En esta columna se añadieron controles con 90 μL de solución de CLOBY o 90 μL de la misma solución de CLOBY tratada con la proteasa TEV + 10 μL de DMSO. La muestra control tratada con la proteasa se indica como CLOBY-TEV.

La preparación de las placas se realizó utilizando el robot Crystal Phoenix. En cada pocillo se añadieron 90 μL de una solución de CLOBY 1.1 μM y 10 μL de la solución del compuesto. De esta manera al final los ensayos se realizaron con Cloby 1 μM y los compuestos a 10 μM en tampón fosfato 50 mM pH 7.5 en presencia de 150 mM NaCl, 0.3 mM EDTA, 0.01% NaN_3 , y 10% DMSO.

Independientemente se prepararon placas de control idénticas a las del ensayo pero con CLOBY sustituido por CLOBY-TEV procedente de exactamente el mismo lote de CLOBY. Tal como se indicó en el capítulo anterior, este control es necesario para homogeneizar las medidas realizadas con distintos lotes de CLOBY que pueden haber experimentado distintos grados de maduración. El control con la proteína cortada por TEV también permite detectar efectos directos sobre alguna de las proteínas fluorescentes no relacionados con cambios de FRET.

La concentración efectiva de CLOBY se obtiene a partir de la absorbancia de mRuby3 y, por tanto, se refiere a la concentración de la proteína madura.

3.2.2 Medidas de fluorescencia en placas

La fluorescencia se midió en un sistema Thermofluor FluoDIA70 trabajando a temperatura constante de 25°C. Si se produce transferencia de energía (FRET) el efecto esperado al excitar mClover3 (donador) es un aumento de la fluorescencia del aceptor (aumento de la emisión a 590 nm) y una disminución de la emisión del donador (fluorescencia a 590 nm).

El equipo utiliza filtros para seleccionar la banda de longitudes de onda utilizadas tanto para la excitación como para la emisión. El filtro utilizado para la excitación cubre el rango 490-510 nm (correspondiente al máximo de excitación de mClover3 a 486 nm). La emisión se midió utilizando filtros en el rango 520-540nm y 580-600nm, que incluyen los máximos de emisión de mClover 3 (530 nm) y mRuby3 (590 nm) respectivamente. Los valores medidos corresponden a la emisión integrada en todo el rango de longitudes de onda. El cambio de emisión que se produce cuando cambia la eficiencia del FRET es mayor en la zona verde que en la zona roja. Este efecto se ve claramente comparando los espectros de emisión de CLOBY y CLOBY cortada con TEV(figura 3.1). El aumento de fluorescencia de mClover3 al separar los dos cromóforos por acción de la proteasa es mayor que la

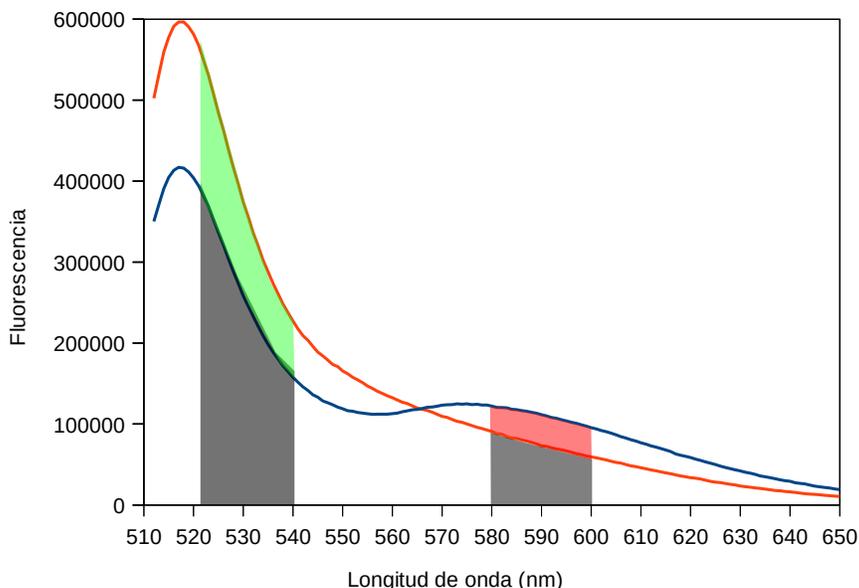


Figure 3.1.: Espectros de Fluorescencia de CLOBY (azul) y CLOBY-TEV superpuestos con sombreado. La banda del filtro 520-540 nm (verde) y la banda del filtro 580-600 nm (roja)

disminución de la emisión de mRuby3.

Dado que se comparan medidas realizadas en distintas posiciones, el equipo FluoDiat70 se ajustó utilizando placas con 100 μ L de la misma solución de CLOBY en todos los pocillos.

3.3. Primer Cribado

En el primer ciclo de cribado el criterio utilizado para identificar los compuestos que interaccionan con CLOBY fue el siguiente: para cada placa (88 compuestos) se calculó la media y la desviación estándar de la fluorescencia de todos los pocillos, excluyendo aquellos que de forma individual difiriesen en más del 10% del valor de la muestra de CLOBY sin compuesto añadido. El proceso se repitió para la placa de control con CLOBY-TEV.

Se seleccionaron en la primera ronda de cribado aquellos compuestos que causaban valores de fluorescencia de CLOBY que estaban tres desviaciones estándar o más por encima o debajo de la media mientras que se mantenían menos de tres desviaciones estándar de la media en el caso de CLOBY-TEV. Aquellos compuestos que causaban cambios de fluorescencia entre una y dos desviaciones estándar en CLOBY pero no en CLOBY-TEV se marcaron como posiblemente afectados y pasaron a la siguiente ronda de cribado. Aunque se analizaron ambas zonas de emisión, la desviación

estándar en la emisión de mRuby3 era mucho mayor y la selección final se basó en la emisión de mClover3.

Esta estrategia se basa en la hipótesis de que la mayoría de los compuestos son inactivos y, por tanto, la media y la desviación estándar en el conjunto son una buena referencia para identificar los compuestos activos. Los casos en los que se observaban grandes efectos sobre la fluorescencia de ambas formas de CLOBY podrían provenir de efectos directos sobre alguna de las proteínas fluorescentes o a interferencias causadas por la propia fluorescencia del compuesto. Estos compuestos se marcaron como “coloreados” y se analizaron manualmente midiendo el espectro completo de fluorescencia.

El resultado de esta primera ronda de cribado redujo la quimioteca inicial de 1669 compuestos a 274 compuestos repartidos de la siguiente forma:

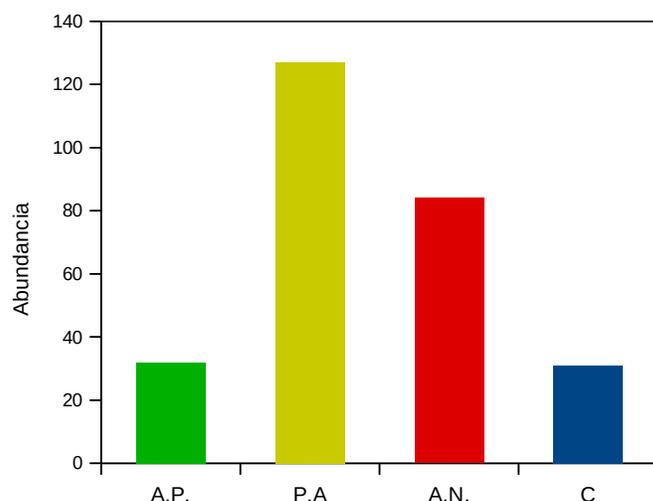


Figura 3.2: Clasificación del cribado inicial según su desviación del valor de medio, sin desviación en el control. (A.P.) Compuestos afectados positivamente, superaban la media en más de 3 veces la SD (desviación estándar). (P.A.) Compuestos Posiblemente Afectados que superaban la media entre 1-3 veces la SD. (A.N.) Compuestos afectados negativamente que se desviaban más de 3 veces la SD por debajo de la media. (C) Compuestos coloreados que tanto el compuesto como el control se desviaban más de 3 veces del valor medio de CLOBY

Los compuestos afectados positivamente muestran un aumento de la fluorescencia a 530 nm que muy probablemente refleje una disminución de FRET. Los compuestos afectados negativamente muestran disminución de la fluorescencia a 530 nm. Esta disminución puede provenir de un aumento de FRET pero también podría indicar otros efectos como que el compuesto proporciona caminos alternativos para la relajación del estado excitado de mClover3 (“Quenching”). Sin embargo, el control con CLOBY-TEV indica que este efecto sólo se produce en el contexto de CLOBY intacto.

3.4. Segundo Cribado

Los compuestos seleccionados en la primera ronda de cribado se analizaron también en placas de 96 pocillos utilizando el equipo FluoDiaT70 pero en este caso, se realizaron medidas a tres concentraciones con dos duplicados por condición y un mayor número de controles con CLOBY y CLOBY-TEV en ausencia de compuesto en cada una de las placas. La preparación de las muestras en cada placa se realizó de forma manual. En la figura 3.3 se muestra un ejemplo de la distribución típica de una placa en la segunda ronda de cribado.

	CLOBY	TEV	CLOBY	TEV	CLOBY	TEV	CLOBY	TEV	CLOBY	TEV	CLOBY	TEV
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	L03F4 10a	L03F4 10a	L03F5 10a	L03F5 10a	L03F8 10a	L03F8 10a	L04B7 10a	L04B7 10a	L04B9 10a	L04B9 10a	L04B10 10a	L04B10 10a
B	L03F4 10b	L03F4 10b	L03F5 10b	L03F5 10b	L03F8 10b	L03F8 10b	L04B7 10b	L04B7 10b	L04B9 10b	L04B9 10b	L04B10 10b	L04B10 10b
C	L03F4 5a	L03F4 5a	L03F5 5a	L03F5 5a	L03F8 5a	L03F8 5a	L04B7 5a	L04B7 5a	L04B9 5a	L04B9 5a	L04B10 5a	L04B10 5a
D	L03F4 5b	L03F4 5b	L03F5 5b	L03F5 5b	L03F8 5b	L03F8 5b	L04B7 5b	L04B7 5b	L04B9 5b	L04B9 5b	L04B10 5b	L04B10 5b
E	L03F4 3a	L03F4 3a	L03F5 3a	L03F5 3a	L03F8 3a	L03F8 3a	L04B7 3a	L04B7 3a	L04B9 3a	L04B9 3a	L04B10 3a	L04B10 3a
F	L03F4 3b	L03F4 3b	L03F5 3b	L03F5 3b	L03F8 3b	L03F8 3b	L04B7 3b	L04B7 3b	L04B9 3b	L04B9 3b	L04B10 3b	L04B10 3b
G	CLOBY +DMSO	CL-TEV +DMSO	CL-TEV +DMSO	CLOBY +DMSO	CLOBY +DMSO	CL-TEV +DMSO	CLOBY +DMSO	CL-TEV +DMSO	CLOBY +DMSO	CL-TEV +DMSO	CLOBY +DMSO	CL-TEV +DMSO
H	CLOBY	CLOBY TEV	CLOBY	CLOBY TEV	CLOBY	CLOBY TEV	CLOBY	CLOBY TEV	CLOBY	CLOBY TEV	CLOBY	CLOBY TEV

Figura 3.3: Distribución de las medidas en el segundo cribado. Primera fila indica si tenemos CLOBY o el Control CLOBY-TEV (TEV). Segunda fila y primera columna indican la posición de la muestra medida. La primera numeración (ejemplo: L03F4) indica placa (L03) y posición (F4) del compuesto medido, la segunda numeración indica volumen (μL) y replica (a,b) del compuesto.

Para cada compuesto se utilizan 2 columnas, en las columnas impares se añaden $90 \mu\text{L}$ de disolución de CLOBY $1.1 \mu\text{M}$ mientras que en las columnas pares se añaden $90 \mu\text{L}$ de CLOBY-TEV, procedente del mismo lote de CLOBY. En las dos primeras filas se añaden $10 \mu\text{L}$ de una solución $100 \mu\text{M}$ del compuesto (indicadas como replica a y b), en las filas tercera y cuarta se añaden $5 \mu\text{L}$ de solución de compuesto y $5 \mu\text{L}$ de DMSO, y en las filas quinta y sexta se adicionan $3 \mu\text{L}$ de solución de compuesto y $7 \mu\text{L}$ de DMSO. Las concentraciones finales de los compuestos son $10 \mu\text{M}$; $5 \mu\text{M}$ y $3 \mu\text{M}$ frente a CLOBY o CLOBY-TEV a una concentración $1 \mu\text{M}$. En la séptima fila se añade $10 \mu\text{L}$ de DMSO (sin compuesto) y en la última fila no se añadió DMSO.

Las últimas filas, además de proporcionar controles de los cambios de fluorescencia al añadir los compuestos también se utilizaron para mejorar el análisis de las placas. Las múltiples muestras en la misma fila se utilizaron para corregir una pequeña desviación sistemática de las medidas correspondientes a distintas columnas y que no se resolvía completamente con el calibrado estándar basado en medidas en las cuatro esquinas de la placa.

Para la segunda ronda de cribado, el proceso de selección utilizado fue el siguiente. Se calculó el promedio y la desviación estándar de los valores de fluorescencia de todas las muestras de CLOBY procedentes del mismo lote (6 por placa) y se compararon con los valores promedio de las dos réplicas para cada una de las tres concentraciones de compuesto. El mismo proceso se realizó con las muestras que contenían CLOBY-TEV. Finalmente, se seleccionaron aquellos compuestos que causaban cambios de la fluorescencia promedio mayores de dos desviaciones estándar de la fluorescencia de CLOBY para al menos dos de las tres concentraciones estudiadas, mientras que a lo sumo causaban una desviación de este orden en una de las tres concentraciones estudiadas cuando se añadía sobre CLOBY-TEV. Este criterio lo cumplen solamente 10 compuestos.

3.3. Tercer cribado

Los compuestos seleccionados en la ronda anterior más los 31 compuestos “coloreados” que no pudieron ser analizados mirando simplemente la fluorescencia a una única longitud de onda (o un estrecho margen de longitudes de onda), se analizaron individualmente midiendo los espectros completos de emisión de CLOBY y CLOBY-TEV en presencia de cada uno de ellos. En este caso los compuestos se analizaron a una concentración 100 μM frente a CLOBY o CLOBY-TEV 1 μM .

Para cada compuesto se dispone de cuatro espectros: CLOBY (-); CLOBY (+); CLOBY-TEV (-); CLOBY-TEV (+). La figuras 3.3,3.4,3.5 muestra los espectros de los 10 compuestos seleccionados en el segundo cribado.

La comparación de los cuatro espectros muestra que, aunque en todos los casos hay una pequeña disminución de la emisión de mClover3, para siete de los compuestos el efecto es muy pequeño o nulo y comparable entre CLOBY y CLOBY-TEV. Los tres compuestos restantes muestran un efecto mayor para CLOBY que para CLOBY-TEV.

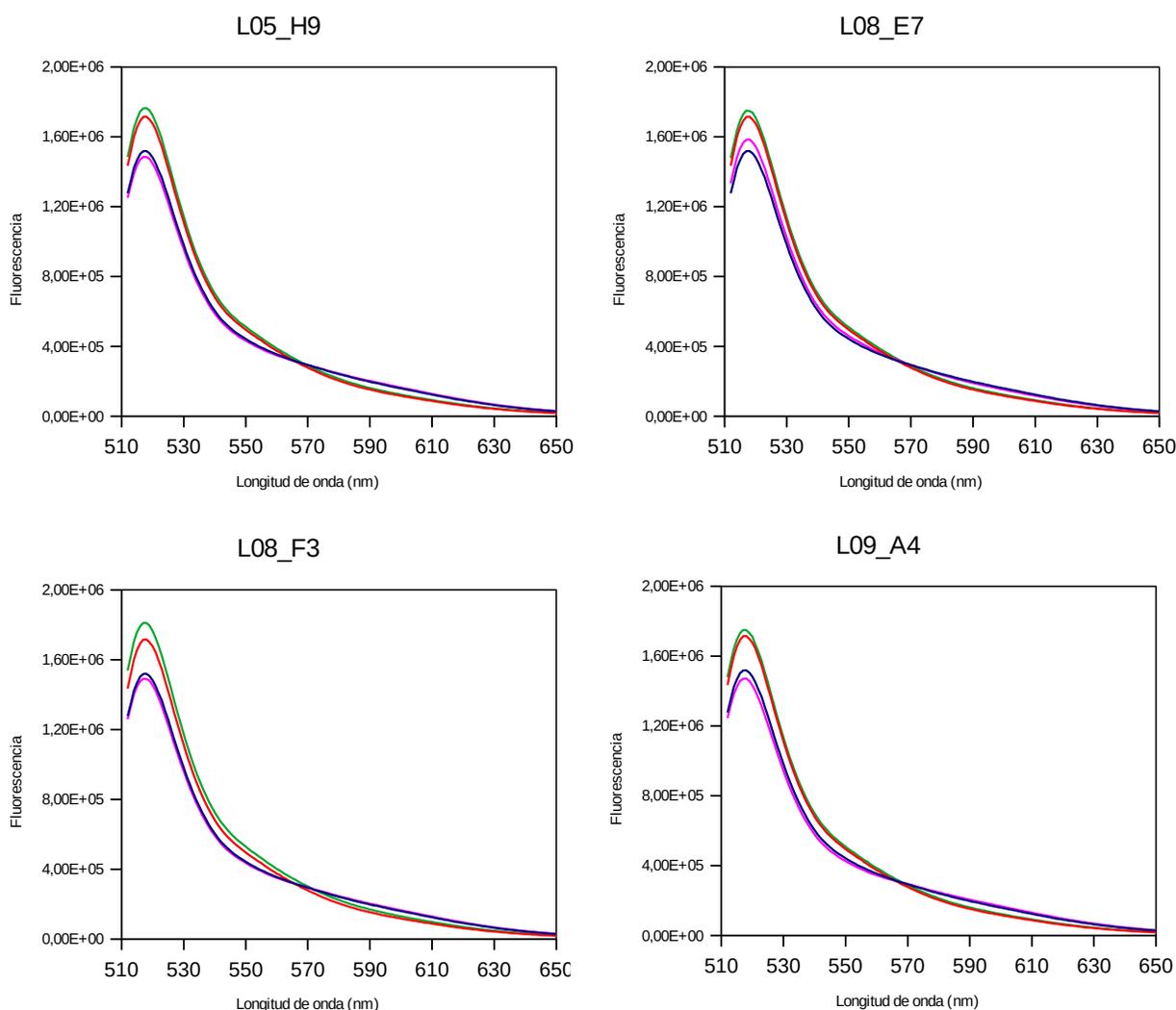


Figura 3.4: Espectros de fluorescencia de CLOBY, CLOBY-TEV y en presencia de compuesto. CLOBY(-)(azul), CLOBY-TEV(-)(rojo), CLOBY(+)(rosa), CLOBY-TEV(+)(verde). Nombre del compuesto en la tabla 5.

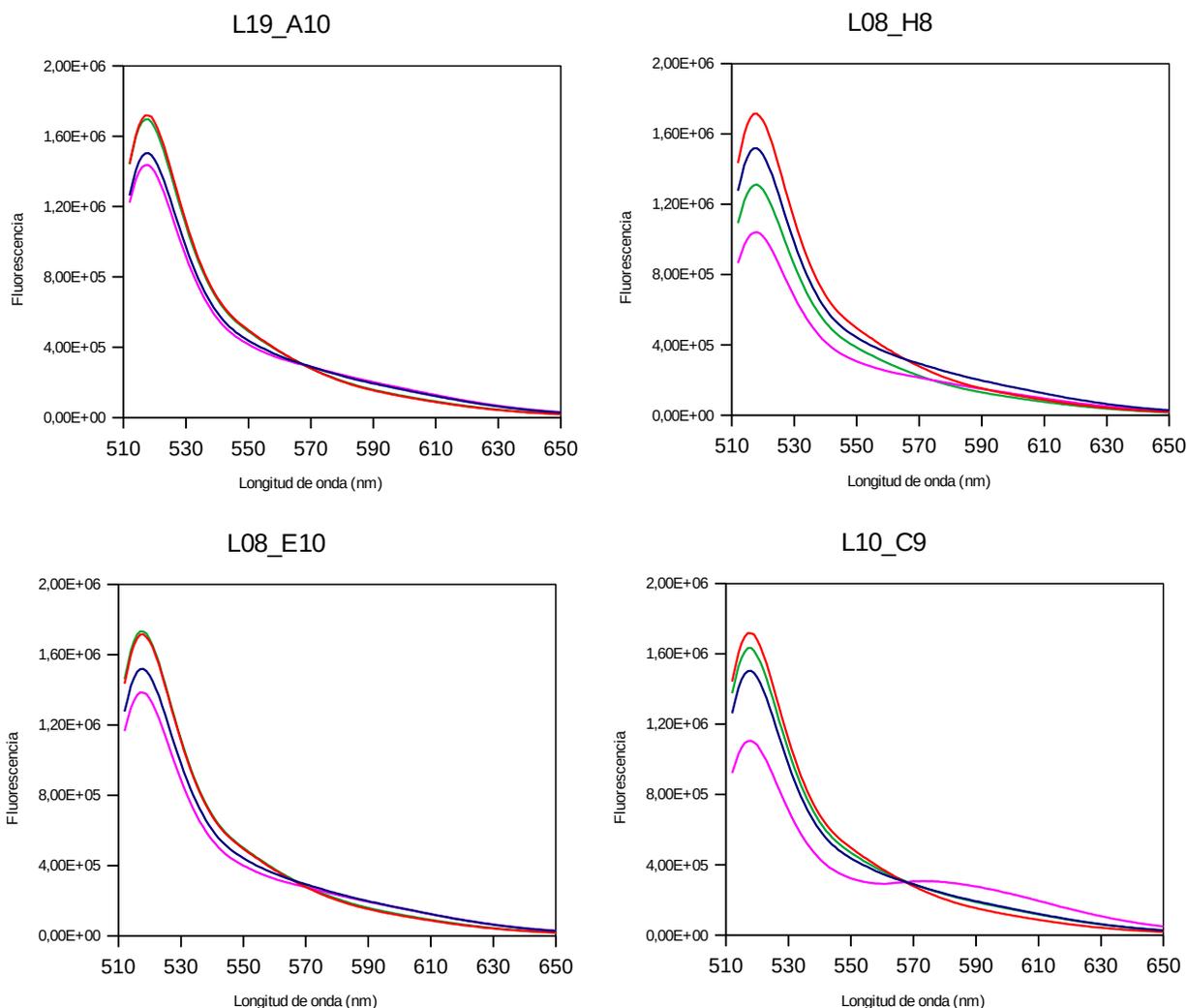


Figura 3.5: Espectros de fluorescencia de CLOBY, CLOBY-TEV y en presencia de compuesto. CLOBY(-)(azul), CLOBY-TEV(-)(rojo), CLOBY(+) (rosa), CLOBY-TEV(+)(verde). Nombre del compuesto en la tabla 5.

Eltrombopag (L8_H8) causa una disminución de la intensidad de la fluorescencia a todas las longitudes de onda tanto en CLOBY como en CLOBY-TEV. Las curvas de CLOBY y CLOBY-TEV se cruzan a 565 nm en ausencia del compuesto pero a 575 nm en presencia de Eltrombopag.

Gossypol (L8_E10) no tiene ningún efecto sobre la fluorescencia de CLOBY-TEV mientras que causa una clara disminución de la intensidad a 520 nm de CLOBY aunque no hay un aumento evidente de la fluorescencia de mRUBY3 que es prácticamente idéntica en presencia y en ausencia de Gossypol.

GW4064 (L10_C9) apenas tiene efecto sobre CLOBY-TEV, sin embargo muestra un importante aumento de FRET observable tanto por la disminución de la emisión del donador mClover3 a 520 nm como por el aumento de la emisión del aceptor mRuby alrededor de 580 nm. Las cuatro curvas se cruzan en un punto isobéptico a 567 nm, consistente en que los efectos observados provienen del desplazamiento del equilibrio entre dos estados, correspondientes a una forma abierta y una forma cerrada de CLOBY.

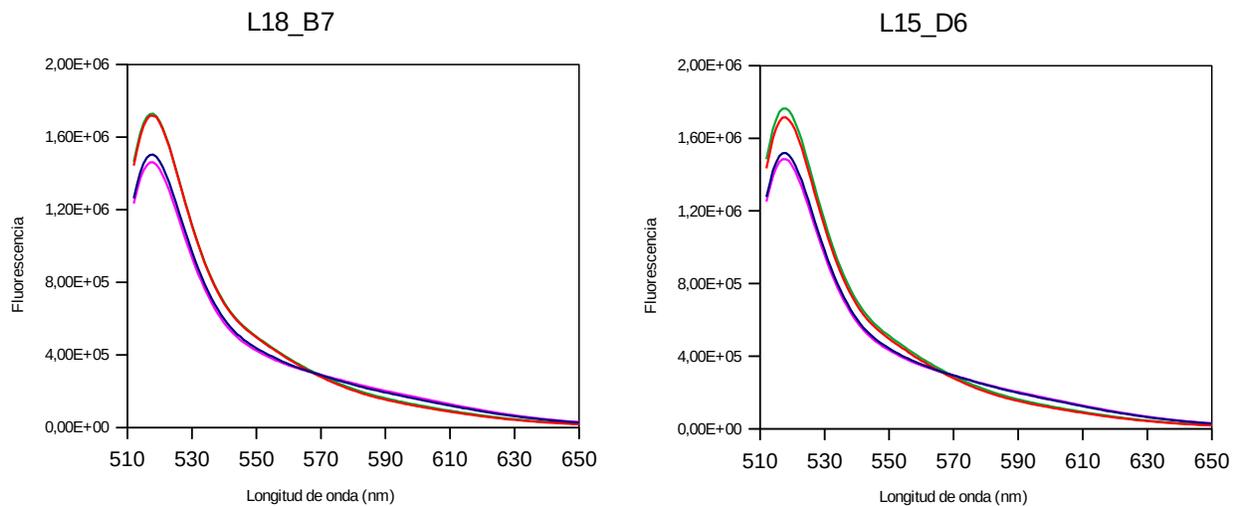


Figure 3.6: Espectros de fluorescencia de CLOBY, CLOBY-TEV y en presencia de compuesto. CLOBY(-)(azul), CLOBY-TEV(-)(rojo), CLOBY(+)(rosa), CLOBY-TEV(+)(verde). Nombre del compuesto en la tabla 5.

Capítulo 4

Seguimiento de los resultados del cribado

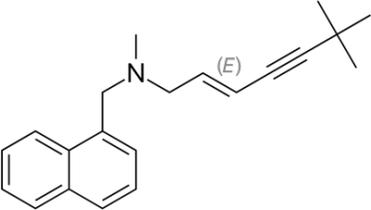
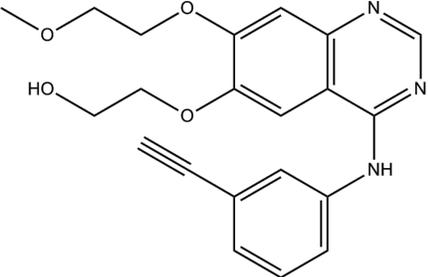
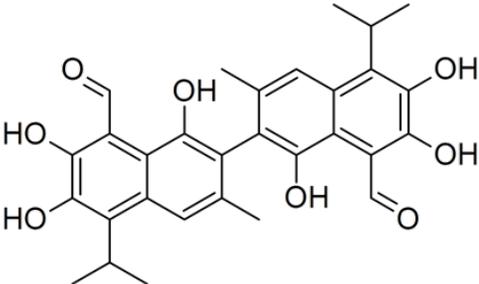
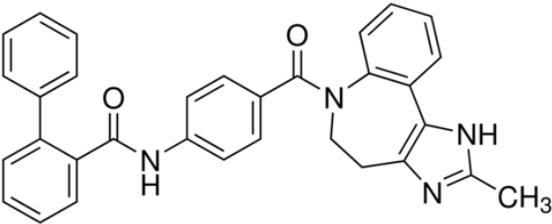
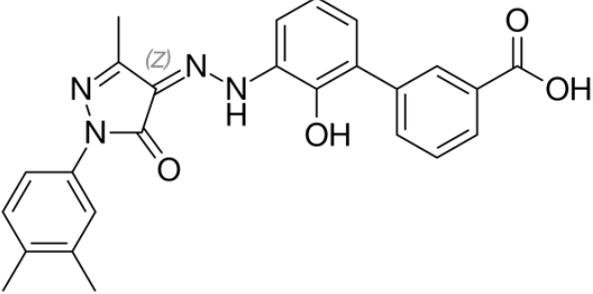
En el capítulo anterior he descrito el proceso de cribado de la quimioteca que permitió identificar candidatos a ligandos de la región SNRE. En este capítulo describiré la evaluación posterior realizada con estos compuestos para poder comparar los resultados del cribado por fluorescencia con los efectos medibles en ausencia de las proteínas fluorescentes.

En primer lugar se analizaron los espectros de RMN de USH3 en presencia de diez compuestos seleccionados. Por otro lado, se llevaron a cabo distintos ensayos en cultivos celulares. Como conclusión se presentarán algunos estudios detallados de compuestos individuales, uno de los cuales es especialmente prometedor y está siendo estudiado en más detalle en estos momentos.

4.1. Estudio por RMN de la interacción con USH3

Se seleccionaron diez compuestos (Tabla 1) para su estudio por RMN utilizando perturbación de desplazamiento químico sobre ^{15}N -USH3. Estos compuestos eran los que presentaban mayores respuestas de fluorescencia en placas y, por tanto, no incluyen los compuestos coloreados que fueron analizados de forma individual más adelante

Los compuestos se adicionaron para conseguir una concentración 100 μM en presencia de USH3 a 150 μM . Desgraciadamente la mayor parte de los compuestos resultaron insolubles y la concentración real de compuesto está limitada por su solubilidad. A pesar de ello, se pudieron observar perturbaciones en los espectros de RMN que se describirán y analizarán a continuación.

Nombre/ (Codigo)	Estructura	Función
Terbinafina (L05_H9)		antifungico
OSI-420 (L08_E7)		Inhibidor EGFR
Gossypol (L08_E10)		Anticonceptivo masculino
Conivaptan (L08_F3)		Antagonista del receptor vasopresina
Eltrombopag (L08_H8)		Agonista del receptor de la trombopoyetina (R-TPO)

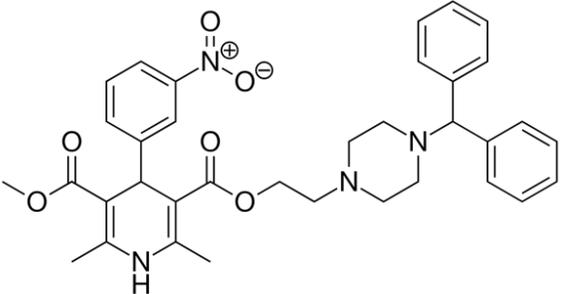
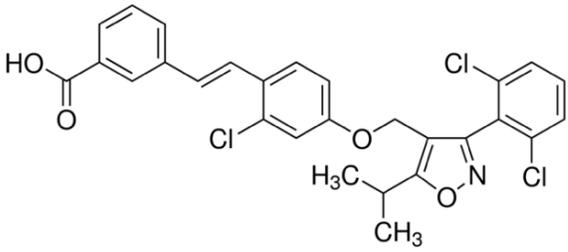
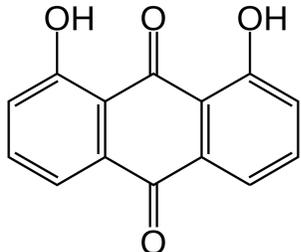
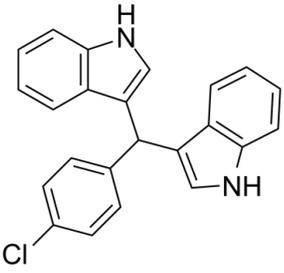
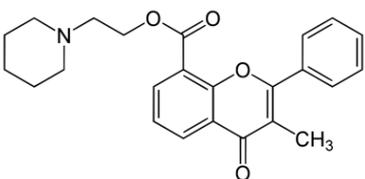
<p>Manidipine (L09_A4)</p>		<p>Inhibidor de canales de calcio</p>
<p>GW4064 (L10_C9)</p>		<p>Agonista del receptor X de farnesoide</p>
<p>Danthron (L15_D6)</p>		<p>Laxante</p>
<p>C-DIM12 (L18_B7)</p>		<p>Agonista de Nurr1. Neuroprotector.</p>
<p>Flavoxate (L19_A10)</p>		<p>Anticolinérgico</p>

Tabla 5: Estructura de compuestos seleccionados en el segundo cribado con su nombre y nomenclatura (código) de placa y posición de la biblioteca de compuestos usada.

El límite para considerar significativa una perturbación de desplazamiento químico se calcula a partir de la media y cinco desviaciones estándar del decil más bajo de todas las perturbaciones medidas. Siete de los diez compuestos analizados muestran perturbaciones significativas.

Los tres restantes, Gossypol, GW4064 y Danthron no interactúan con USH3 aunque causaban cambios muy importantes en el nivel de FRET observado en CLOBY. Estos compuestos posiblemente interactúan directamente con las proteínas fluorescentes en CLOBY pero tienen poco efecto sobre la mezcla de mClover3 libre y el resto de CLOBY con la proteína mRuby3.

Tanto Danthron como GW4064 causan un marcado aumento de FRET que indica una aproximación de las dos proteínas en CLOBY. Gossypol causa una disminución de fluorescencia de mClover3, pero sin un aparente aumento de emisión de mRuby3, por lo que parece más un efecto de apagado (“quenching”) de la fluorescencia de la proteína verde, pero solamente en el entorno de CLOBY ya que no tiene ningún efecto sobre la fluorescencia de CLOBY-TEV.

Estos resultados demuestran que es posible obtener falsos positivos con CLOBY. Sin embargo, al menos en estos ejemplos, dichos falsos positivos son fácilmente identificables ya que la acción directa sobre las proteínas fluorescentes da lugar a cambios muy importantes en los espectros, mientras que las perturbaciones causadas por interacción con la región USH3 son menores. Los otros siete compuestos estudiados por RMN se caracterizan por causar cambios claramente perceptibles en la fluorescencia de CLOBY pero menores que en los casos en que hay una interacción directa con las proteínas fluorescentes.

Los cambios observados en seis de los restantes compuestos están localizados en las mismas regiones de los dominios único y SH4: G2 y S3 en el dominio SH4, y E19, G26-G30, G46-G49, y R78-G80 en el dominio Único. El hecho que distintos compuestos causen cambios en las mismas regiones desordenadas sugiere que dichas perturbaciones reflejan cambios en el “fuzzy complex” independientemente del sitio exacto de la interacción del compuesto. Es significativo que los mayores cambios impliquen residuos en la proximidad de los dos residuos de histidina (H25 y H47), residuos cargados (E19 y R78) o residuos de glicina, así como residuos próximos al extremo N-terminal y a la región próxima a la unión entre el dominio Único y el dominio SH3.

Estas perturbaciones son compatibles con el papel que juegan las interacciones electrostáticas en la compactación del “fuzzy complex” y que se demostró por el efecto de la fuerza iónica sobre la fluorescencia de CLOBY en el capítulo 2.

Cambios en la compactación de la región desordenada modifican la proximidad de residuos cargados y pueden hacer variar ligeramente el pKa de las cadenas laterales de los residuos de histidina, causando perturbaciones de desplazamiento químico en los residuos cercanos. Asimismo, es razonable suponer que los residuos que más fácilmente permiten cambios de compactación sean los de glicina, por su mayor flexibilidad. Finalmente, se ha demostrado previamente (Arbesú et al., 2017a) que el “fuzzy complex” está estabilizado por interacciones entre los dominios SH4 y SH3, lo que justificaría los cambios observados en el extremo N-terminal y la región bisagra que conecta el dominio único con el SH3.

Uno de los compuestos, Flavoxato (figuras 4.2,4.3), presenta un patrón de perturbaciones distinto, en el que las regiones más afectadas son 64-68, y la región C-terminal del dominio SH4 formada por tres residuos consecutivos de arginina, aparte de la región bisagra que es común con los otros compuestos estudiados.

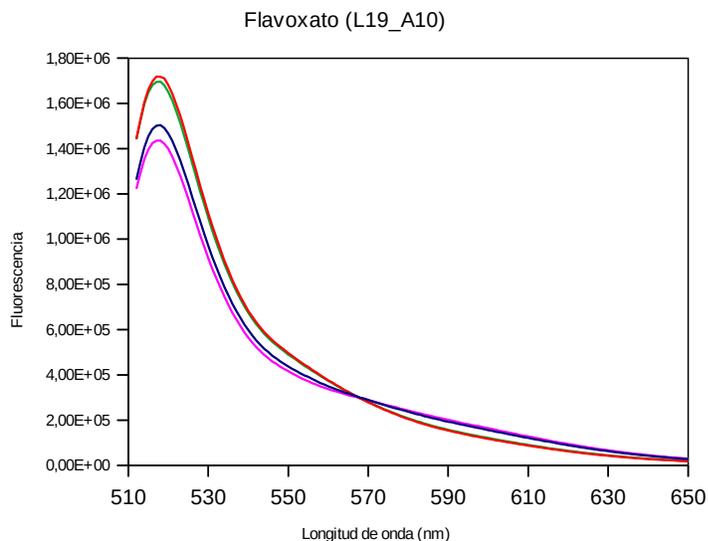
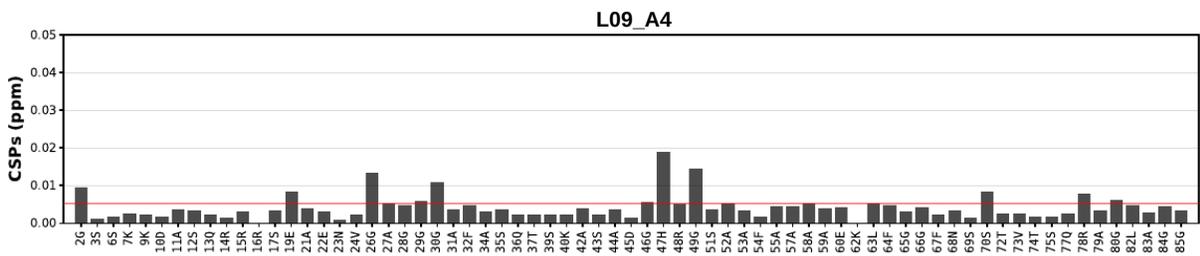
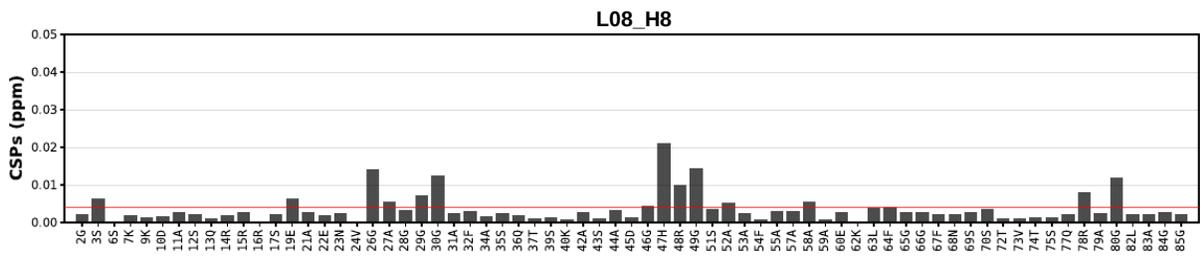
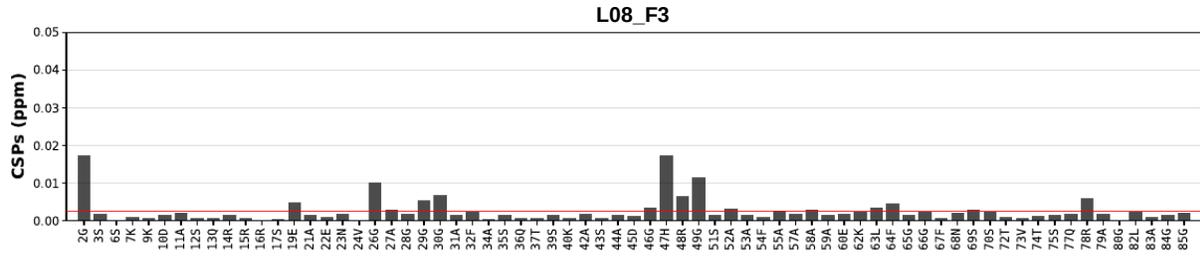
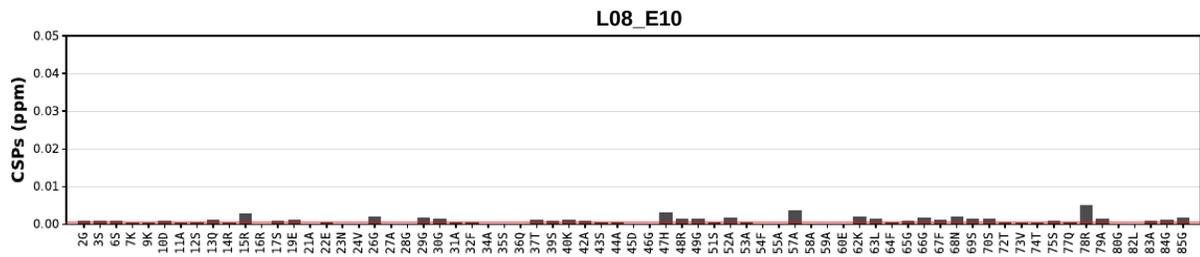
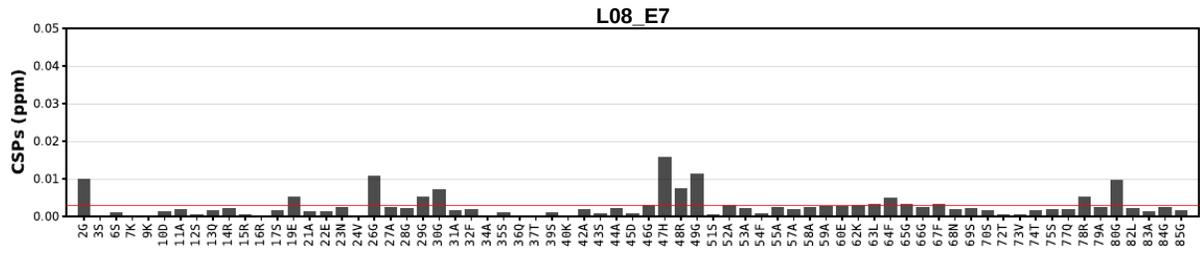
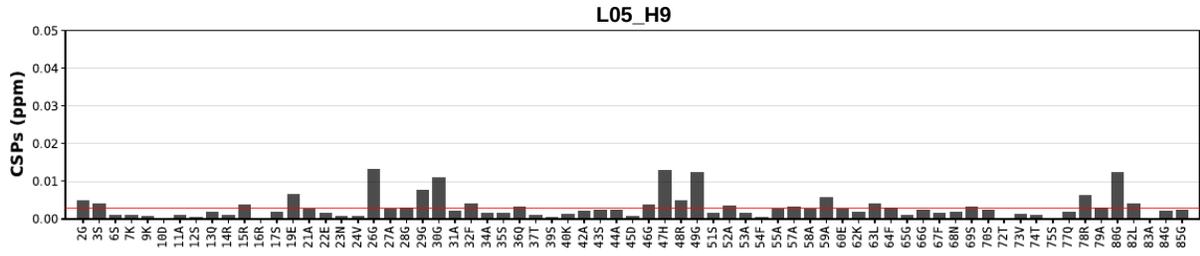


Figura 4.1: Espectro de fluorescencia de: CLOBY(azul), CLOBY-TEV (rojo), CLOBY+Flavoxato(rosa), CLOBY-TEV+Flavoxato (verde). Medidas realizadas a 1 μ M de CLOBY, CLOBY-TEV y 100 μ M de Flavoxate.



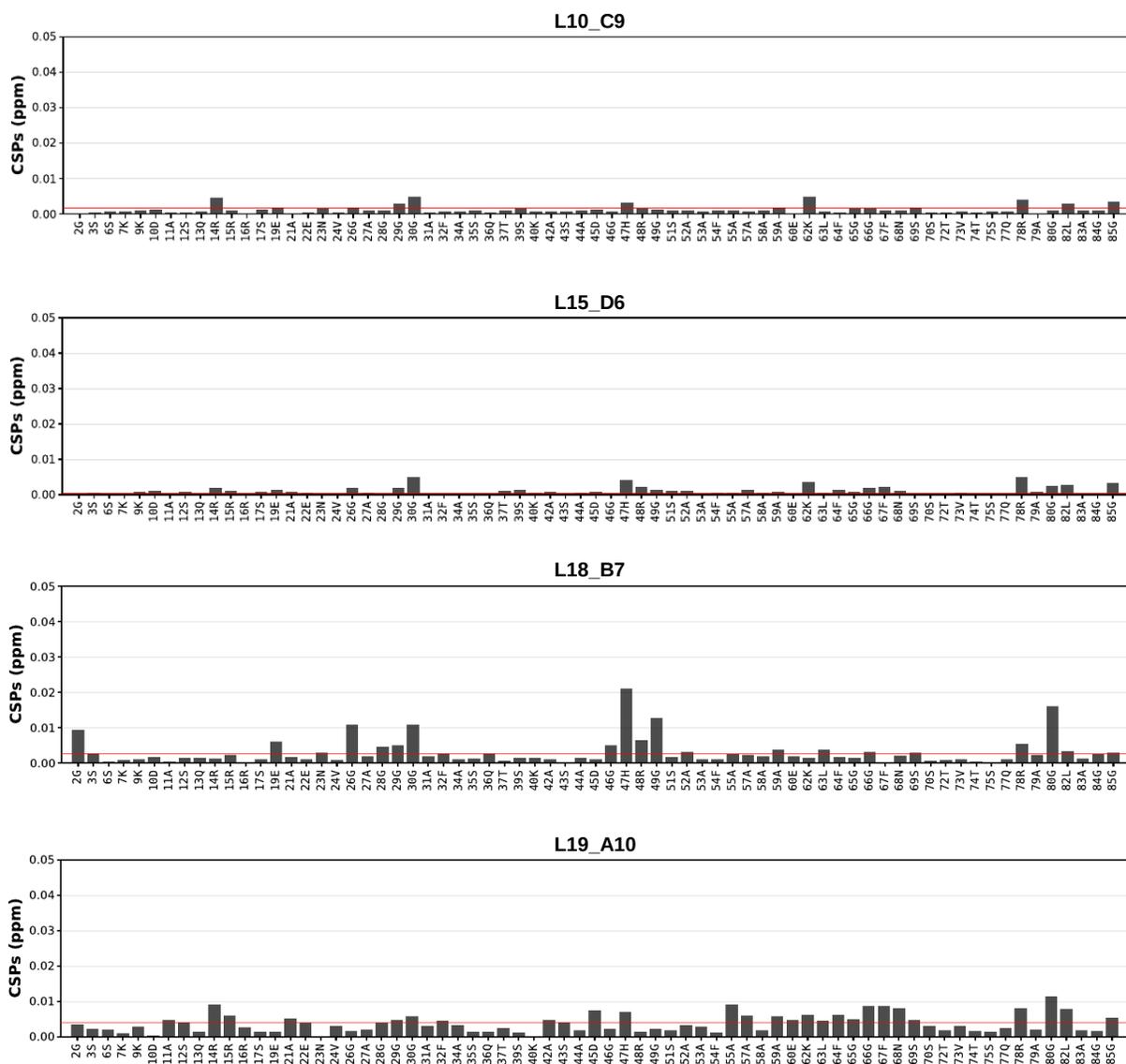


Figura 4.2: Perturbación del desplazamiento químico inducido por la adición de ligando de la tabla 5 sobre el USH3 respecto al nativo, las medidas están a 278 K y recogen las perturbaciones sobre la región IDR de c-Src (dominios SH4 y Único). La línea en rojo indica el valor de la media de las perturbaciones del decil inferior más 5 desviaciones estándar. Los valores marcados con bandas grises representan asignaciones con baja fiabilidad. Figuras producidas por el programa FarSeer- NMR desarrollado en nuestro laboratorio.

El análisis de las perturbaciones observadas en el dominio SH3 se llevó a cabo a 298 K. Los resultados se presentan en la figura WW. Se confirma la ausencia de interacciones significativas por parte de Gossypol, GW4064 y Danthron. Todos los compuestos que muestran interacción muestran cambios en el residuo E100 y en muchos casos R98, confirmando la mayor sensibilidad de los residuos cargados. Eltrombopag y C-DIM12 muestran perturbaciones en N116. Un caso particular es Flavoxate, que muestra una importante perturbación en el lazo RT (residuos 98-103), así como N116 y S128 que sugieren que dicho compuesto interacciona con el dominio SH3 a través del lazo RT.

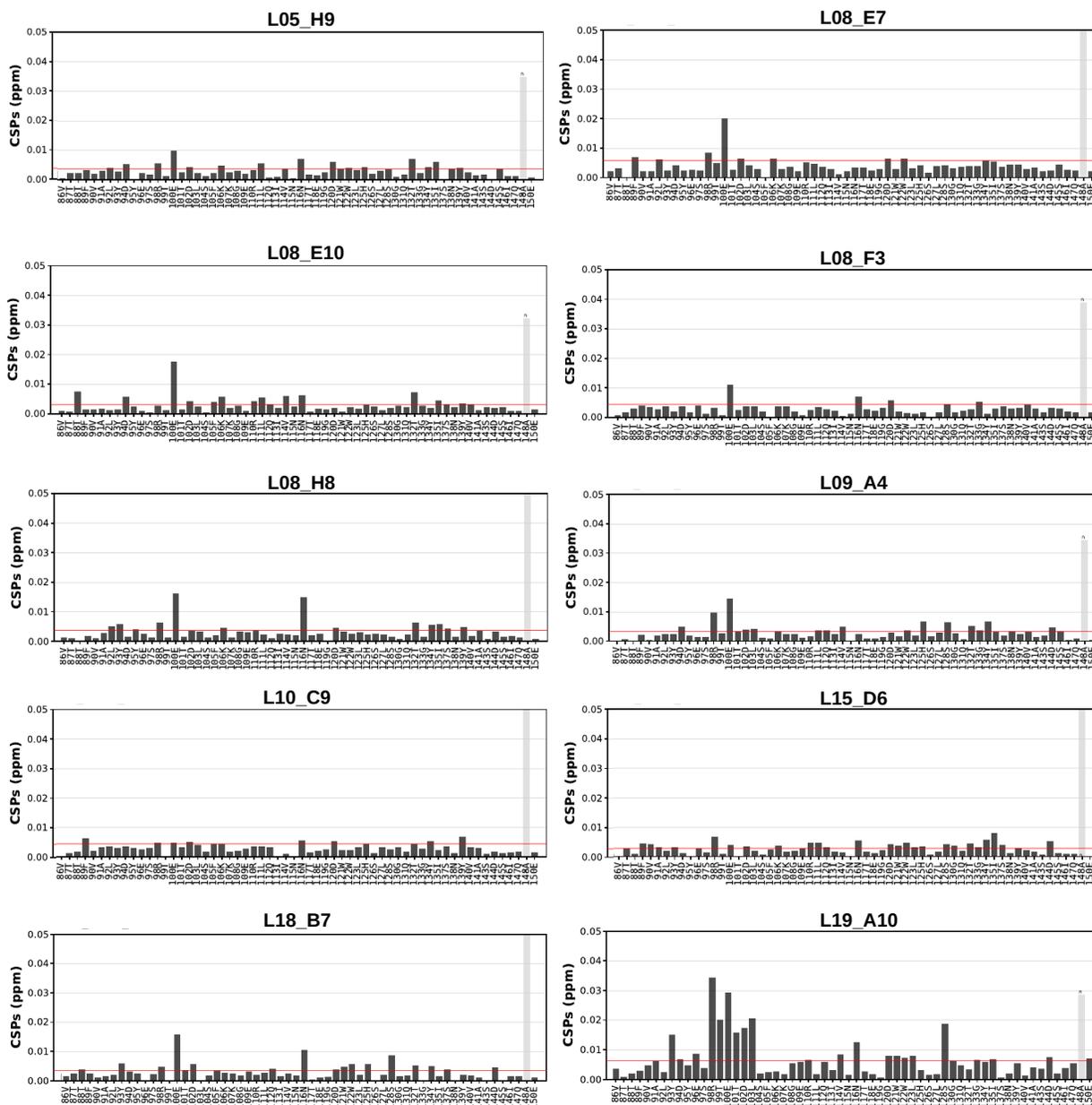


Figura 4.3: Perturbación del desplazamiento químico(CSP) inducido por la adición de los ligandos de la tabla 5 sobre el USH3 respecto al nativo, las medidas están a 298 K y recogen las perturbaciones sobre el dominio SH3 del constructo USH3. La línea en rojo indica el valor de la media de las perturbaciones del decil inferior más 5 desviaciones estándar. Los valores marcados con asteriscos y bandas grises representan asignaciones con baja fiabilidad. Figuras producidas por el programa FarSeer- NMR desarrollado en nuestro laboratorio.

Los espectros de fluorescencia de CLOBY en ausencia y en presencia de 100 μ M Flavoxato (L19_A10) (figura 4.1) muestran únicamente pequeños cambios compatibles con un pequeño aumento de FRET que no se observa en CLOBY-TEV.

Los resultados combinados de fluorescencia con CLOBY (figura 4.1) y de RMN con el segmento USH3 (figura 4.2 y 4.3) sugieren que Flavoxato podría ser un modulador de la actividad de Src que merece un estudio más detallado.

El flavoxato es un relajante de la musculatura lisa y se utiliza en clínica para combatir los espasmos de la vejiga y el tracto urinario en episodios de cistitis de origen diverso. Su mecanismo de

acción no está claro ya que, a pesar de que se describe como anticolinérgico con efecto antimuscarínico, su efecto relajante también podría provenir de su interacción directa con los músculos lisos y no por el bloqueo del receptor muscarínico.

Por razones de tiempo, en esta tesis no se ha podido explorar con más detalle este compuesto y únicamente se llevó a cabo un ensayo preliminar de su toxicidad frente a dos líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB231 y MDA-MB468) disponibles en el propio grupo de investigación. Los estudios fueron llevados a cabo por la Dra. Betlem Mezquita utilizando un test MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega). El control positivo utilizado es ABT199 (venetoclax) un inhibidor de Bcl-2.

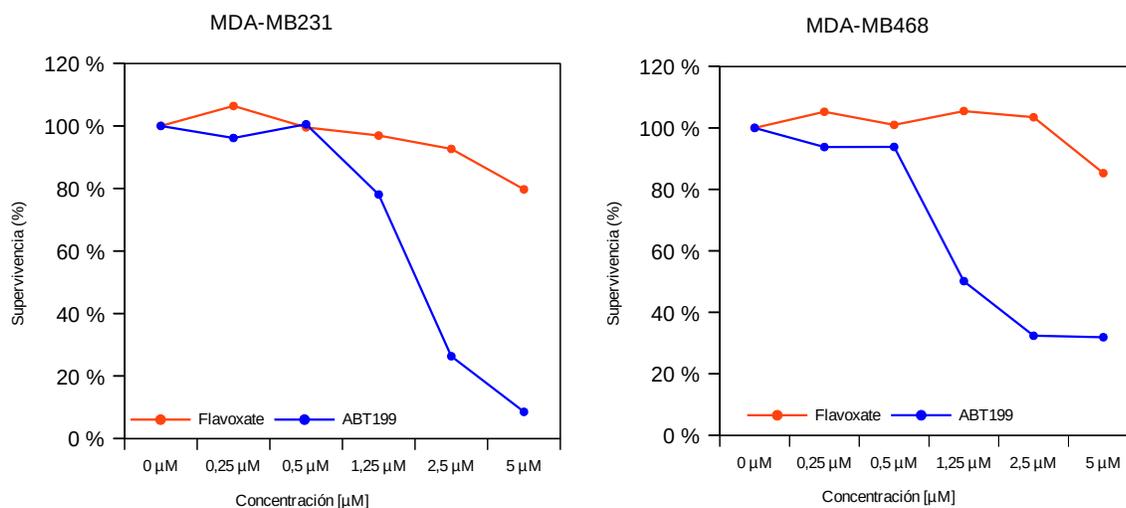


Figura 4.4: Efecto del Flavoxate (Rojo) y el ABT-199 (azul) en la supervivencia de líneas celulares de cáncer de mama a diferentes concentraciones (μM) a las 72h.

La toxicidad de Flavoxate frente a las dos líneas celulares estudiadas es baja.

Este compuesto, sin embargo, merece un estudio más detallado ya que la ausencia de toxicidad frente a una determinada línea celular no descarta que pueda tener un efecto modulador sobre la actividad de Src. Debe recordarse que las mutaciones en la región de unión a lípidos del dominio único de Src, aunque resultaron tóxicas en un estado de evolución de los *oocitos* de *Xenopus*, no eran tóxicas para los *oocitos* al inicio de su desarrollo y permitían el crecimiento de células tumorales transformadas, afectando principalmente su movilidad y capacidad de crecimiento.

Estudios posteriores intentarán determinar si la presencia de flavoxate tiene efectos comparables a las mutaciones en otras líneas celulares y frente a otros ensayos funcionales más selectivos que la toxicidad aguda.

4.2. Ensayos con líneas celulares

Los primeros estudios se llevaron a cabo en colaboración con los laboratorios de la Dra. Mercedes Garayoa, en el Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC en Salamanca y el Dr. Fernando Lecanda, del programa de tumores sólidos y biomarcadores del Centro de Investigación Médica Aplicada de la Universidad de Navarra que tienen establecidas colaboraciones con IDP Pharma.

El grupo del Dr. Lecanda utilizó las siguientes líneas celulares, relacionadas con cáncer de pulmón:

- **A549** es una línea celular del epitelio basal de alvéolos de adenocarcinoma humano utilizada como modelo de cáncer de pulmón.
- **H187** es una línea celular de células pequeñas de cáncer de pulmón

El grupo de la Dra. Garayoa estudió dos modelos de mieloma múltiple:

- **MM1.S** es una línea celular de linfoblastos de tipo B que se utiliza como modelo de mieloma múltiple
- **RPMI-8226** es una línea celular derivada de un paciente de mieloma múltiple.

Uno de los compuestos más prometedores en esta primera ronda de ensayos se estudiaron en una segunda ronda, junto con un compuesto estructuralmente relacionado, en la empresa Leitat, en el Hospital 12 de octubre de Madrid y en el propio grupo de trabajo de la Universidad de Barcelona, por parte de la Dra. Betlem Mezquita.

Leitat realizó experimentos en, formalmente, las dos mismas líneas de mieloma múltiple

- **MM.1S,B Lymphoblast**, ATCC: CRL-2974 SK-OV-3, ECACC: 91091004
- **RPMI-8226**, Human myeloma, ECACC: 87012702

y estudió también dos líneas relacionadas con cáncer de Páncreas y glioblastoma-astrocitoma.

- **Mia-Pa-Ca-2** ECACC: 85062806, es una línea celular de tumor pancreático humano
- **U373-MG, ATCC: HTB-17**, es una línea celular de glioblastoma astrocitoma derivada a partir de un tumor cerebral humano.

Se realizó una tercera serie de experimentos que fueron efectuados por Alba Rodriguez (Laboratorio de Hematología Translacional del Hospital 12 de Octubre bajo la supervisión de los Dres. Joaquin Martínez y María Linares, utilizando células MM1.S y otra línea de mieloma múltiple.

- **JJN-3** es una línea celular de leucemia humana y se utiliza como modelo de mieloma múltiple.

La Dra. Betlem Mezquita (UB y Universidad Internacional de Cataluña) llevó a cabo ensayos en dos líneas celulares de cáncer de mama triple negativo

- **MDA-MB-231** es una de las líneas celulares más utilizadas para el estudio de cáncer de mama ER-, HER2-, PR- del subtipo bajo en Claudina y que presenta características propias de células madre de cáncer.
- **MDA-MB-468** es otra línea triple-negativa del tipo basal

Aunque los protocolos exactos difieren en los distintos laboratorios, en todos los casos se midió la supervivencia de las células después de tres días tras la adición de los productos y se calculó la concentración que causaba el 50% de disminución en el número de células viables, comparado control tratado únicamente con el vehículo (e.g. DMSO) sin compuesto. La supervivencia de cuantifica como:

$$GI_{50} = \frac{100 \times (T - T_0)}{(C - T_0)} \quad (4)$$

Donde T es el número de células viables a los tres días, T₀ es el número inicial de células, C es el número de células en el control a los tres días.

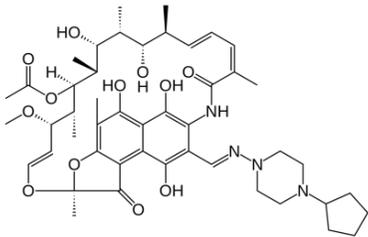
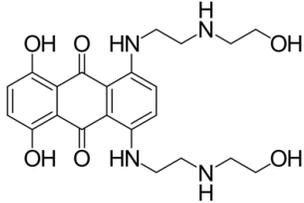
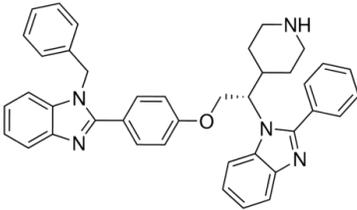
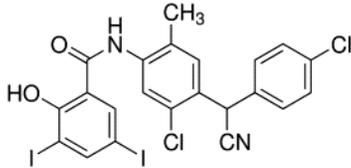
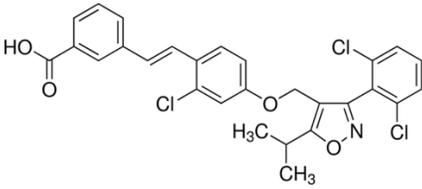
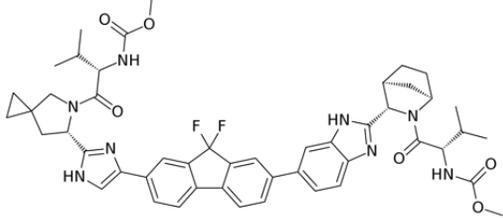
Para extraer los valores de EC₅₀ (la concentración del compuesto que causa un 50% del efecto máximo) se ajustan los valores a una ecuación sigmoideal del tipo

$$E = \frac{E_{max}}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{[A]} \right)^{n_H}} \quad (5)$$

Donde n_H es el coeficiente de Hill, [A] la concentración que causa el efecto E y E_{max} el efecto máximo obtenido.

En la tabla 6 se detallan los valores EC₅₀ obtenidos en las cuatro líneas celulares medidas en la primera ronda de ensayos en Navarra y en Salamanca.

La selección de los compuestos a ensayar se realizó a partir del análisis de los espectros de fluorescencia completos de los compuestos identificados en la segunda ronda de cribado más aquellos que por presentar color no pudieron ser analizados utilizando el protocolo basado en medidas puntuales. En el momento de realizar estos ensayos Flavoxate (L19_A10) todavía no había sido identificado como un candidato y no se incluyó en los ensayos con múltiples líneas celulares.

Nombre/ (Código)/Función	Estructura	A549 GI ₅₀ (μM)	H187 GI ₅₀ (μM)	MM1.S IC ₅₀ (μM)	RPMI IC ₅₀ (μM)
Rifapentine (L06_F1) (antibiotic)		17.82	>20	1.08	8.8
Mitoxanthrone (L06_F9) (Inhibidor de topoisomerasa tipo II)		0.54	<1.25	>10	<0.1
Deltarasin (L17_C2) (Inhibidor KRAS)		3.39	1.93	0.81	2.2
Closantel (L13_C2) (antiparasitario)		17.64	43.44	>10	>10
GW4064 (L10_C9) (Agonista del receptor X de farnesoide)		11.02	23.73	>10	25.0
Ledipasvir (L17_H9) (antiviral)		12.07	55.90	0.77	3.4

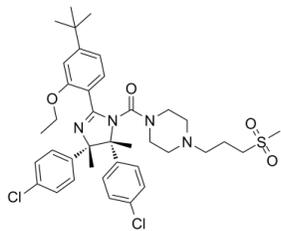
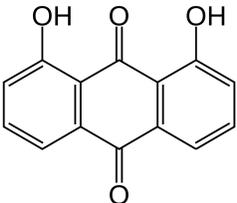
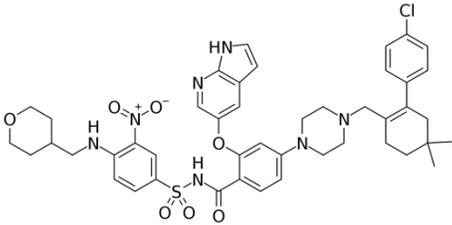
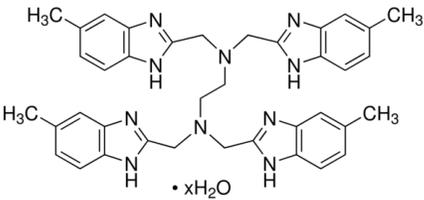
RG-7112 (L16_H9) (inhibidor de la interacción MDM2-p53)		3.68	16.09	>10	9.7
Danthron (L15_D6) (laxante)		11.53	10.90	46.99	11.7
ABT-199 (L18_C6) (inhibidor de Bcl-2)		7.94	6.89	25.20	12.8
NSC348884 (L18_H7) (inhibidor de la nucleofosmina)		4.18	4.32	-	-

Tabla 6: Compuestos ensayados en diferentes líneas celulares (A549, H187, MM1.S, RPMI): Nomenclatura de placa y posición, estructura y resultados de los ensayos.

En las figuras 4.5(a,b) se muestran los resultados obtenidos en líneas celulares relacionadas con el mieloma múltiple en el laboratorio de la Dra. Garayoa.

Deltarasin (L17_C2) muestra una fuerte actividad en las dos líneas celulares. Mitoxanthrone (L06_F9) es muy potente en la línea RPMI pero muestra poca actividad en MM1S. En esta línea celular tres compuestos muestran un efecto muy elevado: Deltarasin (L17_C2), Rifapentine (L06_F1) que está aprobado como antibiótico, y ledivaspir (L17_H9) un compuesto antiviral muy utilizado del que no se ha descrito su utilización en oncología.

En la línea RPMI, deltarasin y ledivaspir muestran un perfil de actividad parecido hasta una concentración de 2 μ M.

En la figura 4.6(a,b) se resumen los resultados obtenidos por el grupo de Navarra con líneas celulares de tumores sólidos de cáncer de pulmón (A549 y H187 respectivamente)

Tres de los compuestos (Deltarasin (L17_C2), Mitoxanthrone (L06_F9) y NSC348884 (L18_H7) muestran una elevada toxicidad frente a estas líneas celulares. Los tres compuestos tienen actividad anticancerosa mediante otro mecanismos, por tanto la actividad encontrada no es sorprendente pero no necesariamente relacionada con la unión a c-Src.

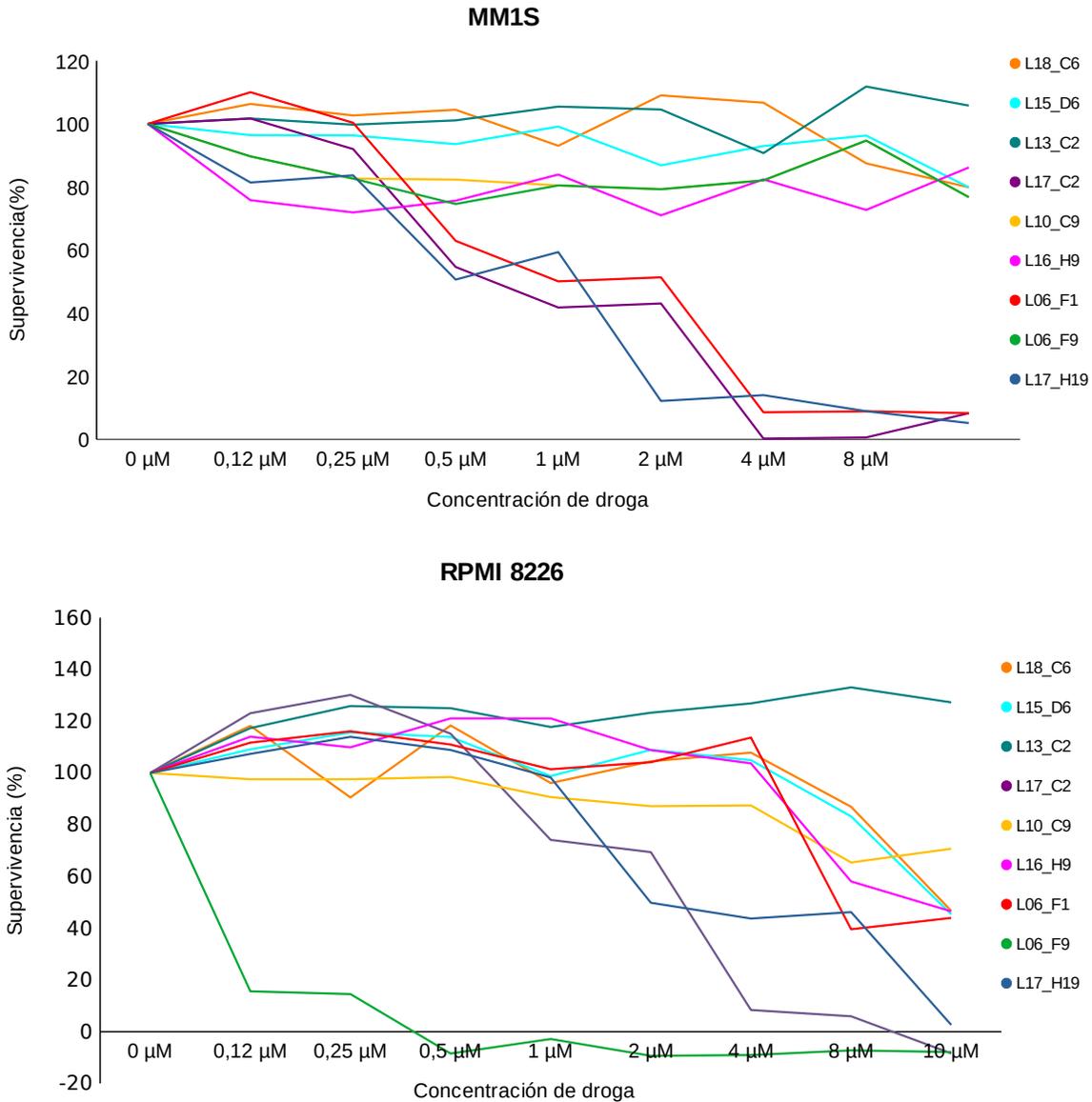


Figura 4.5: Efecto de los compuestos de la tabla 6 en la supervivencia de las líneas celulares MM1.S (a) y RPMI 8226 (b) a las 72h. La leyenda indica el código de nomenclatura del compuesto. Figuras proporcionadas por el laboratorio de Dra. Garayoa

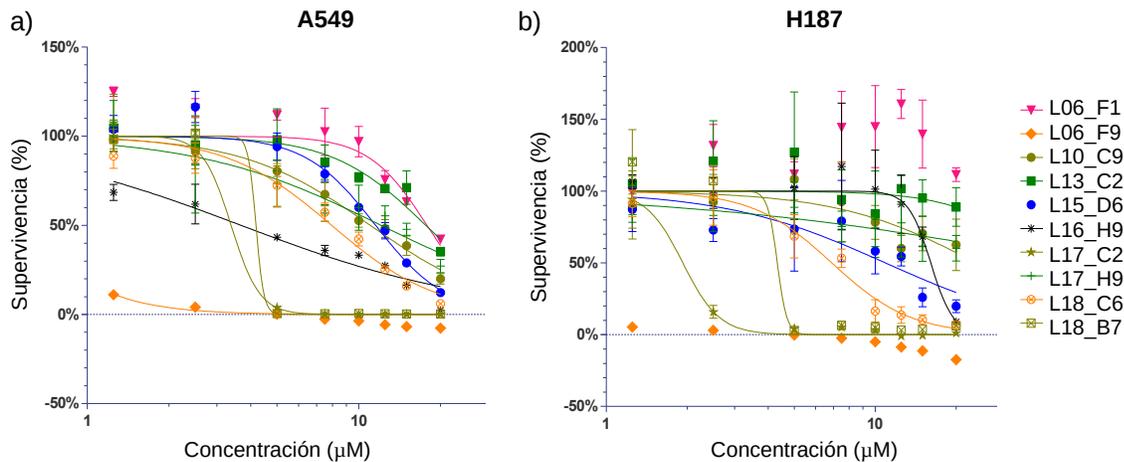


Figura 4.6: Efecto de los compuestos de la tabla 6 en la supervivencia de las líneas celulares A549 (a) y H187 (b) a las 72h. La leyenda indica el código de nomenclatura del compuesto. Figuras proporcionadas por el laboratorio de Dr. Fernando Lecanda

Estos datos identifican ledipasvir (L17_H9) como un posible candidato para modular la acción de Src en mieloma múltiple que merece un estudio adicional.

4.2.1 Ledipasvir y Daclastavir

En la etapa final de la tesis, los esfuerzos se dedicaron a explorar con más detalle los resultados prometedores obtenidos con ledipasvir en los modelos de mieloma múltiple (figura 4.7) juntamente con un el daclastavir (detallado más adelante en esta sección).

Ledipasvir es un compuesto antiviral de acción directa desarrollado por la empresa Gilead Sciences para el tratamiento de la hepatitis C. Habitualmente se emplea en una combinación con sulfobuvir que tiene el nombre comercial de Harvoni.

El mecanismo de actuación es por inhibición de la replicación del virus. Ledipasvir interacciona con una proteína viral NS5A que es intrínsecamente desordenada, aunque se desconocen más detalles de esta interacción.

En las figuras 4.6(a,b) se muestran los espectros de fluorescencia obtenidos en presencia de cantidades crecientes de ledipasvir.

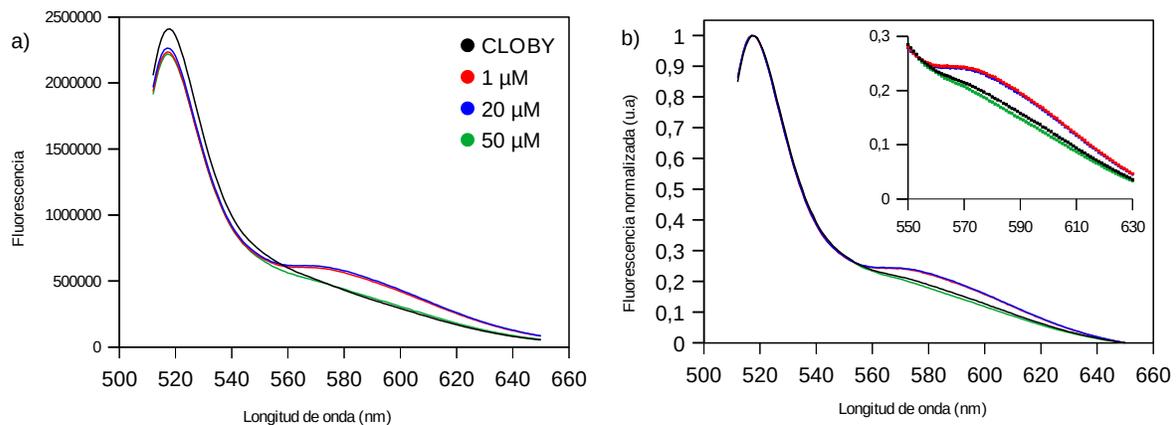


Figura 4.7: (a) Espectro de fluorescencia de CLOBY(negro) a diferentes concentraciones de Ledipasvir (1-50 µM). (b) Lo mismo pero con la fluorescencia normalizada y una expansión de la región FRET (emisión de mRuby3).

El incremento en la fluorescencia de Ruby, acompañado por la disminución de la fluorescencia de Clover indica un aumento de FRET, aunque la interacción precisaría cantidades elevadas de producto cuando la concentración de CLOBY es 1 μM .

Se llevaron a cabo experimentos utilizando Dynamic Light Scattering. En este caso es necesario utilizar concentraciones más elevadas de proteína para poder determinar el radio hidrodinámico.

Trabajando a una concentración de 120 μM de CLOBY, la presencia de cantidades de ledipasvir a 25 μM se observa un aumento muy importante de radio hidrodinámico respecto al valor obtenidos en ausencia del fármaco (figura 4.8). Al añadir cantidades crecientes, se observa una segunda transición con un punto de inflexión a 60 μM (que corresponde a la mitad de la concentración de CLOBY).

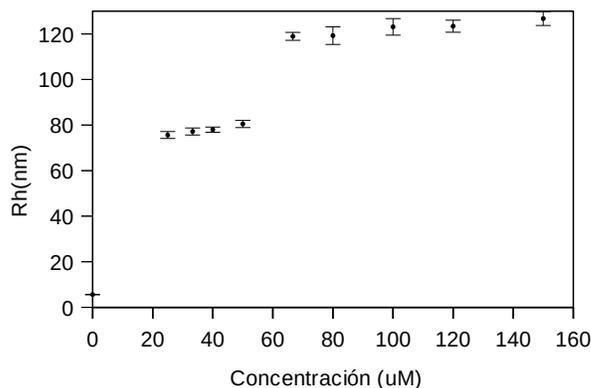


Figura 4.8: Radios hidrodinámicos (nm) de CLOBY en presencia creciente de ledipasvir (μM). La barra de error muestra la desviación estándar obtenida a partir de 3 medidas.

Estos resultados serían compatibles con una apertura completa del Fuzzy Complex debida a la interacción con el fármaco que expondría una mayor superficie al disolvente, dando lugar al aumento de radio hidrodinámico. A concentraciones crecientes de ledipasvir se produciría una dimerización que sería la segunda transición observada.

Esta pendiente el estudio más detallado de este fenómeno, pero confirma la interacción de ledipasvir con CLOBY.

Un análisis de la estructura de Ledipasvir pone de manifiesto que está formado por un núcleo central hidrofóbico extendido al cual están unidas a dos dipéptidos de valina y prolina modificados, protegidos en su extremo N-terminal por un grupo uretano y unidos al núcleo central por su extremo C-terminal.

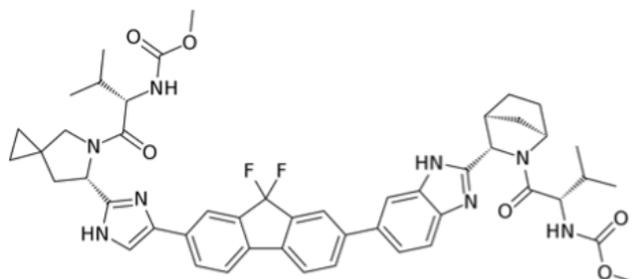


Figura 4.9: Estructura del ledipasvir

Este análisis estructural puede confirmarse comparando con la estructura de otro compuesto antiviral de acción directa desarrollado por la empresa Bristol-Myer Squibb, que también está aprobado para el tratamiento de la hepatitis C, denominado daclastavir (figura 4.11). A diferencia de ledipasvir, daclastavir es un compuesto simétrico y los dos dipéptidos Val-Pro pueden distinguirse más fácilmente ya que el residuo de prolina no está modificado. También puede verse que el anillo de imidazol que actúa como conector puede relacionarse formalmente con una ciclación intramolecular, acompañada de deshidratación y aromatización de un residuo de fenilalanina C-terminal.

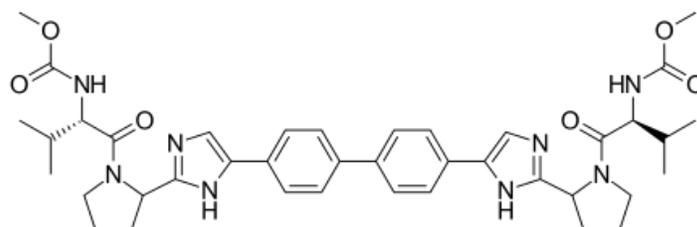


Figura 4.10: Estructura del daclastavir

La evolución (formal) desde el tripéptido protegido Val-Pro-Phe a ledipasvir, pasando por daclastavir, se muestra en la figura 4.11.

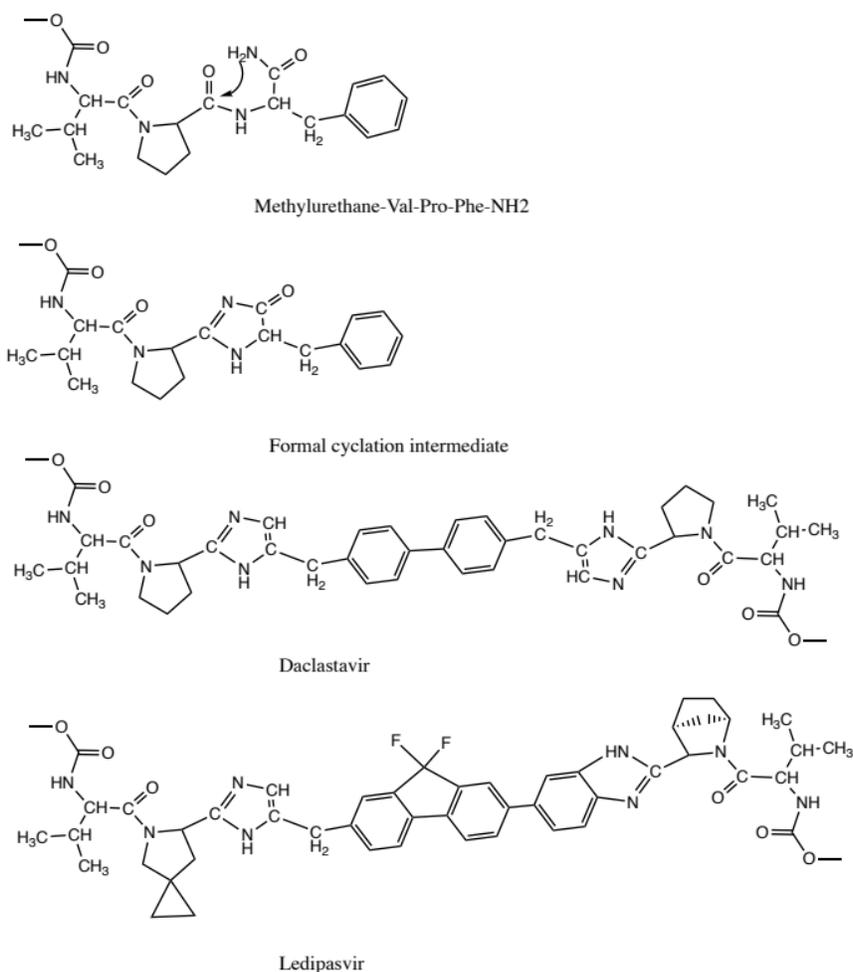


Figura 4.11: Síntesis propuesta para la formación del daclastavir y posterior transformación al ledipasvir

La combinación de prolina con los aminoácidos hidrofóbicos puede favorecer la interacción con regiones extendidas de proteínas desordenadas “decoradas” con residuos aromáticos, como es el caso del dominio Único de Src.

La estrategia a seguir consistió en la repetición de las medidas de toxicidad tanto en MM1S, que es donde se habían observado los mayores efectos como en otras líneas celulares distintas e incluir en el estudio del compuesto daclastavir. De hecho daclastavir estaba presente en la quimioteca inicial pero fue descartado en el primer cribado ya que no daba un cambio que pudiera considerarse significativo en el primer estudio. Estos ensayos mostraron mayor toxicidad que el propio ledipasvir.

Cell line	MM1.S (Salamanca)	MM1.S (Leitat)	MM1.S (Madrid)	JJN3-GFP (Madrid)	RPMI (Salamanca)	RPMI (Leitat)	Mia-Pa-Ca-2 (Leitat)	U373-MG (Leitat)	Betlem1	Betlem 2
ledipasvir	0.77	>100	> 6	>6	3.4	9.65	>100	>100		
daclastavir	-	24.28	<25	<25	-	7.88	18.57	19,65		

Table 7: Resultados de toxicidad en diferentes líneas celulares ensayadas para ledipasvir y daclastavir. Los resultados muestran el IC₅₀ o GI₅₀ en μ M.

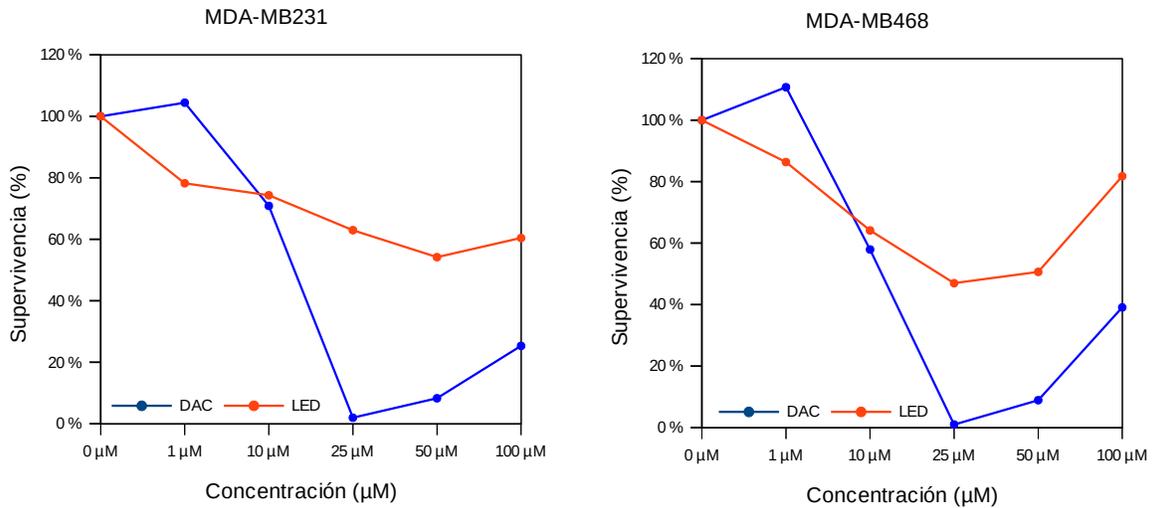


Figura 4.12: Efecto del daclatasvir (Azul) y el ledipasvir (rojo) en la supervivencia de líneas celulares de cáncer de mama a diferentes concentraciones (μM) a las 72h

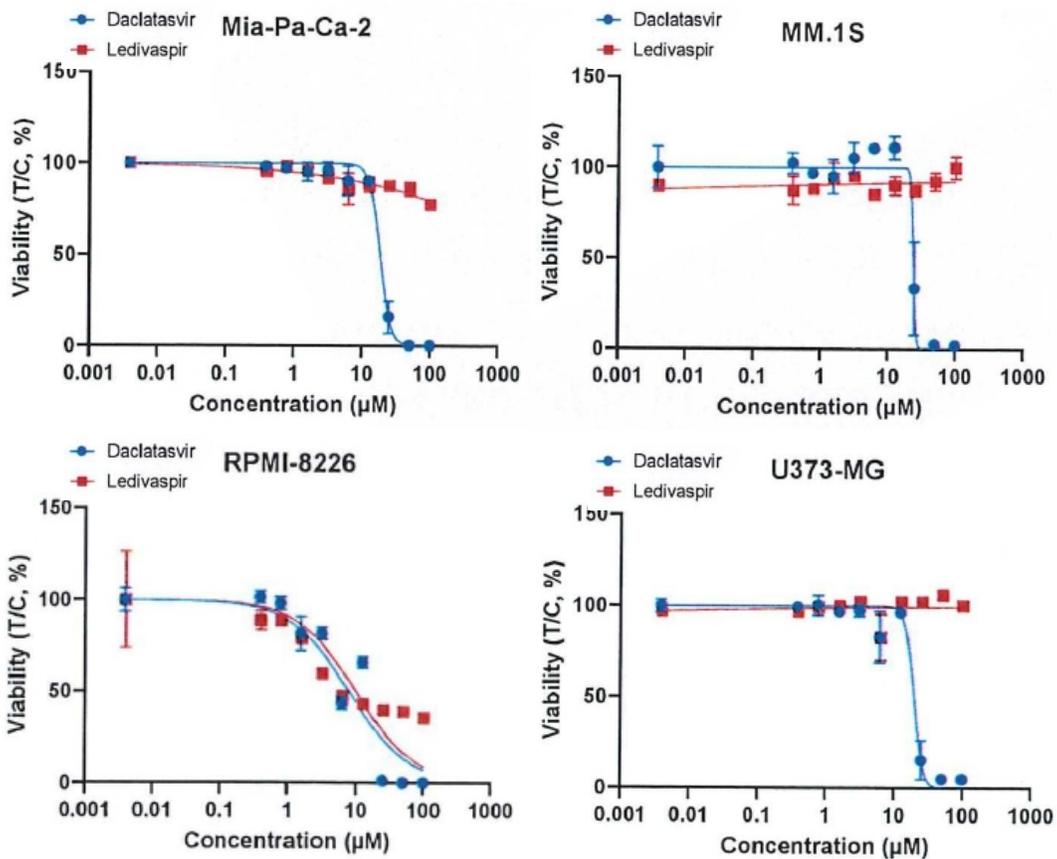


Figura 2.13: Efecto del daclatasvir (azul) y el ledipasvir (rojo) en la supervivencia en las líneas celulares: Mia-Pa-Ca-2, MM.1S, RPMI-8226, U373-MG. Se muestran los resultados transcurrido 72h a diferentes concentraciones de compuesto. Figuras proporcionadas por Leitat.

Conclusiones

1. Se ha caracterizado el biosensor CLOBY basado en las proteínas fluorescentes mClover3 y mRuby3 fusionadas, a través de espaciadores, a los extremos N- y C-terminal, respectivamente, del sistema formado por los dominios SH4, Único y SH3 de c-Src. El espaciador entre mClover3 y SH4 contiene un sitio de corte por una proteasa que proporciona un control interno en los experimentos de cribado que resuelve el problema de la reproducibilidad de la maduración espontánea de los cromóforos de las proteínas fluorescentes.
2. CLOBY muestra solamente efecto FRET intramolecular en las condiciones de trabajo seleccionadas. La dependencia de dicho efecto con la distancia entre los fluoróforos permite identificar moléculas que modifiquen la compactación del complejo difuso (“fuzzy complex”) al unirse al Elemento Regulador N-terminal de Src. Los cambios de compactación se traducen en cambios de distancia entre las proteínas fluorescentes y por tanto son detectables por fluorescencia.
3. Se han identificado moléculas moduladoras del Elemento Regulador N-terminal de Src. La interacción de alguna de estas moléculas se ha validado mediante métodos alternativos como la Resonancia Magnética Nuclear o Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS).
4. Una de las moléculas identificadas y otro compuesto estructuralmente relacionado, han mostrado actividad contra líneas celulares de mieloma múltiple. El segundo compuesto ha mostrado toxicidad contra otras líneas celulares derivadas de cánceres de pulmón, páncreas, mama y glioblastomas. Ambos compuestos son fármacos aprobados por la “Food and Drug Administration” de los EEUU como compuestos antivirales aptos para uso humano, sin que se hubiera descrito previamente su actividad anticancerosa.

CAPITULO 5

Materiales y métodos

Antes de pasar a describir los materiales y métodos de esta tesis, me gustaría comentar que debido a que las IDR muestran sensibilidad a la degradación, se intentó mantener las muestras en frío durante la purificación y almacenaje posterior. Otra regla general fue la de medir y usar nuestras proteínas en el periodo máximo de 1 semana después de su purificación, pasado este periodo se volvía a preparar nuevas muestras para evitar al máximo la degradación de la muestra.

Al final de este capítulo esta disponible la lista de soluciones tampón y su composición. Todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua purificada por un sistema Millipore BioCell.

5.1. Clonaje y Expresión de Proteínas

Todos los plásmidos fueron amplificados por transformación por choque térmico en *E.coli* OmniMAX (células competentes (Novagen)), incubación toda la noche a 37°C en presencia del antibiótico correspondiente (todos proporcionados por Sigma), purificación por miniprep mediante un Kit comercial (QIAprep Spin Miniprep Kit (250), QIAGEN) secuenciados (MACROGEN) para confirmar la secuencia de nucleótidos.

La siguiente tabla (tabla 8) contiene las construcciones utilizadas en esta tesis, los plásmidos donde se hallaban y otros detalles.

Construcción	Plásmido	Subtipo de <i>E.coli</i>	Resistencias	Tag de Purificación
Cloby	pET-19b	BL21(DE3)plyss	AMP	HiTrap
USH3	pETM-30	BL21(DE3)plyss	KAN	HiTrap
Cdk5	pGex	BL21(DE3)plyss rosseta	AMP/CAM	GSTrap
p25	pGex	BL21(DE3)plyss rosseta	AMP/CAM	GSTrap
MAPK1/ERK2	pbit1.1-c	BL21(DE3)plyss rosseta	AMP/CAM	HiTrap

Table 8: Construcciones genéticas utilizadas durante la tesis.

5.1.1. Expresión de Proteínas

Se transforman los plásmidos en *E.coli* BL21(DE3)plyss (células competentes (Novagen)) mediante choque térmico durante 1min a 42°C, se enfría en hielo 2 min y se deja incubar durante 60min a 37°C, finalmente se inoculan placas de agarosa preparados con su correspondiente antibiótico (tabla 8).

A partir de una colonia, se inoculan 10 mL de medio Luria Broth (LB, ver lista de tampones) para realizar un pre-cultivo durante la noche a 37°C. En un matraz Erlenmeyer de 3L se añaden los pre-cultivos sobre 1L de medio LB autoclavado, suplementado con el antibiótico correspondiente a 1 mM.

Se deja incubando con agitación a 120rpm en un agitador orbital (Minitron HT infors AG CH-1403) hasta tener una densidad óptica (OD_{600}) = 0,5-0,8 a 600nm (Espectrofotómetro Uvmini-1240, Shimadzu).

Se inducen los cultivos con 1mM de IPTG (isopropilo β -D-1-tiogalactopiranosido, Sigma) y se enfrían los cultivos 20min a 4°C, luego se dejan los cultivos durante toda la noche (14-18horas) a 25°C agitando a 120rpm. Para las muestras de CLOBY dejamos los cultivos 1 noche extra (36horas) a 20°C para dejar madurar a las proteínas fluorescentes.

Finalmente las células se extraen del cultivo por centrifugación a 5000 rpm durante 15min (centrifuga Avanti J-HC (Beckman Coulter), rotor JLA 8.1000). Posteriormente descartamos el sobrenadante y se recogen los “pellets” (sedimento celular) que son re-suspendidos en tampón de lisis (el correspondiente a la construcción) con los inhibidores de proteasa ²PIC (protease inhibitor cocktail, Sigma) y PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, Sigma) a un ratio 1:100 de volumen, las soluciones están preparadas 100x. Las muestras se guardan a -80°C par su posterior purificación.

5.1.1.b Expresión de proteínas para RMN

Se transforman los plásmidos en E.coli BL21(DE3)plyss (células competentes (Novagen)) mediante choque térmico durante 1min a 42°C, se enfría en hielo durante 2 min y se deja incubar durante 60min a 47°C finalmente inoculan placas de agarosa con su correspondiente antibiótico (tabla XX).

Se inocula una colonia en 10 mL de medio Luria Broth (LB, ver lista de tampones) para realizar un pre-cultivo durante la noche a 37°C. El pre-cultivo se añade sobre 1L de medio mínimo M9 (lista de tampones, apéndice) autoclavado. Se usa ¹⁵NH₄Cl (0,5 mg/mL, Cambridge Isotope Laboratories) como fuente de nitrógeno marcada (¹⁵N) y D-glucosa (3 g/mL, Sigma) como fuente de carbono no marcada (¹²C) . Se añade solución Q (5mL/L, Mezcla de metales a bajas concentraciones, ver lista de tampones), también añadimos una solución Kao-Michayluk Vitamin 100x(10 mL/L, K3129 (Sigma)) finalmente se añade MgSO₄ (1M, 2mL/L, Sigma) y los antibióticos correspondientes (se añade un volumen 1:1000 respecto al volumen del medio). Se agita a 120 rpm en un agitador orbital (Minitron HT infors AG CH-1403) y se incuba hasta tener una densidad óptica (OD_{600}) = 0,5-0,8 a 600nm (Espectrofotómetro Uvmini-1240, Shimadzu).

Se inducen los cultivos con 1mM de IPTG (isopropilo β -D-1-tiogalactopiranosido, de Sigma-Aldrich) y se enfrían los cultivos 20min a 4°C, luego se dejan los cultivos durante toda la noche (14-18horas) a 25°C agitando a 120rpm. Para las muestras de CLOBY dejamos los cultivos 1 noche extra (36horas) a 20°C para dejar madurar a las proteínas.

Finalmente las células se extraen del cultivo por centrifugación a 5000g durante 15min (centrífuga Avanti J-HC (Beckman Coulter), rotor JLA 8.1000). Posteriormente descartamos el sobrenadante y se recogen los “pellets” (sedimento celular) que son re-suspendidos en tampón de Lisis (el correspondiente a la construcción) con los inhibidores de proteasa PIC (protease inhibitor cocktail, Sigma) y PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo, Sigma) a un ratio 1:100 de volumen, las soluciones están preparadas 100x. Las muestras se guardan a -80°C para su posterior purificación.

2 Protein cocktail inhibitor: 23 mM AEBSE, 20 μ M Bestatin, 1 mM EDTA, 3 μ M E64, Pepstatin A (concentración final en Buffer Lisis)

5.2. Purificación de proteínas

5.2.1. Extracción de la proteína soluble

El “pellet” resuspendido es descongelado en un baño de agua a 4°C durante 20min. Posteriormente se genera el lisado celular mediante sonicación (homogeneizador de ultrasonidos U200S, IKA Labortechnik) en hielo. Se realizan dos rondas de 1 min 30 s con 10 s de sonicación por 10 s de pausa, y una pausa de 1min entre rondas. Se añade DNaseI (Roche) al lisado celular y se deja actuar durante 15 min a 4°C. El lisado celular se ultra-centrifuga (centrífuga Avanti J-25 XP (Beckman Coulter) con rotor JA-25.50) por 20 min a 25000rpm. Finalmente se recoge el sobrenadante del lisado celular para la purificación por afinidad.

5.2.2. Purificación por Tag de afinidad: His-Tag

La mayoría de construcciones contienen un His-tag (cola de 6 histidinas), excepto Cdk5 y p25. Las purificaciones se llevan a cabo en una columna de Níquel de 5 mL (HiTrap, GE Healthcare). En una bomba peristáltica acondicionamos la columna de Ni con tampón de lisis (con 10 mM imidazol fresco a 10 mL/min). Seguidamente se pasa el lisado celular a baja velocidad (2 ml/min), se limpia la columna con 4 CV (volúmenes de columna) a una velocidad media (5 ml/min) con el tampón de Lisis (con 10 mM de imidazol fresco), finalmente eluimos nuestra proteína purificada con tampón de Lisis pero con 400mM de imidazol. El imidazol compite con la cola de histidinas y permite recuperar la proteína deseada.

5.2.2.b Purificación por GST (Glutation S-Transferase)

La purificación se lleva a cabo en columnas GST de 1 mL (GSTrap, GE Healthcare). Se acondiciona la columna con tampón de unión a 2 mL/min con 10 CV (volúmenes de columna), seguidamente se hace pasar la muestra (Cdk5 o p25) a 1 mL/min. Se limpia la columna con con 5CV a 1 mL/min de tampón de lavado. Finalmente eluimos la proteína con el tampón de elución que contiene glutatión reducido para liberar las proteínas unidas por afinidad al GST.

5.2.3. Purificación por “FPLC” (Fast Protein Liquid Chromatography)

Una vez purificada las muestras por HiTrap o GSTrap se vuelven a purificar par limpiar impurezas mediante cromatografía de exclusión molecular (en ingles SEC, Size Exclusion Chromatography) con una columna Superdex 75 26/60 (GE Healthcare) en un sistema ÄKTA™FPLC(amersham farmacia biotech). Usando tampón F (Lista de tampones) como fase móvil, se recogen las fracciones donde la proteína es eluida (respuesta elevada de absorción a 280 nm en el cromatograma) para ser analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico o SDS-PAGE (“sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”).

Se mide la concentración de proteína que contiene la muestra mediante un espectrofotómetro (UVmini-1240, Shimadzu) aplicando la siguiente ecuación:

$$C = \frac{A_{280} - A_{340}}{d \cdot \epsilon} \quad (6)$$

Donde A_{280} y A_{340} son las absorbancias a las respectivas longitudes de onda (en nm), d es el camino de paso de la muestra (1 cm o 1 mm según cubeta), y ϵ es el coeficiente de extinción molar calculado a partir de la secuencia proteica (en el caso de CLOBY también por la absorbancia de mClover3 o mRuby3).

Finalmente se concentra las fracciones más concentradas (o puras para CLOBY) y se concentran por centrifugación usando concentradores de límite 10 Kda (Vivaspin 20, Sartorius (Sigma)).

La pureza de las muestras se comprueba por electroforesis en gel de poliacrilamida y “SDS-PAGE” y, en el caso de CLOBY, midiendo la absorbancia correspondiente a las dos proteínas fluorescentes que, además de proporcionar una medida de la concentración final, nos dan una indicación del grado de maduración de las mismas. Ya que la maduración de mRuby3 es normalmente menor que la de mClover3, las concentraciones indicadas se refieren a las medidas a partir de la absorbancia de mRuby3 (558 nm) que corresponde a la de las proteínas con los dos fluoróforos maduros.

La identidad de la proteína se comprobó mediante espectrometría de masas

5.2.4. Análisis por Masas (LC/MS)

Las muestras se diluyen en una solución acuosa con un 1% de ácido fórmico a 5 μ M. Se inyectan 20 μ L de muestra en una columna BioSuite pPhenyl 1000(Waters, 10 μ m RPC 2.0x75 mm) a un flujo de 100 μ L/min usando un UPLC (“Ultra Performance Liquid Chromatography” de Acquity, Waters) proveído con un sistema binario de control de solventes y un Autosampler automático (Waters). Las muestras son eluidas usando un gradiente desde 2% hasta 5% de B en 5 min y desde un 5% hasta un 80% de B en 60 min (A= 0,1% F.A en agua, B= 0,1% de F.A CH₃CN). La elución de la columna se conecta directamente a un espectrómetro de masas (LCT-Premier XE, Waters). El espectrómetro de masas adquirió las masas completas (400-4000 m/z) trabajando en modo positivo.

Finalmente los datos se obtuvieron con el software MassLynx (V4.1.SCN704, Waters). Se suman los espectros de MS correspondientes a los picos cromatográficos. Las especies cargadas en el espectro resultante se deconvolucionaron a sus masas promedio utilizando el algoritmo integrado MaxEnt1 (máxima entropía) en MassLynx Software vs. 4.1.SCN704 (Waters). El algoritmo calcula las intensidades máximas de masas deconvolucionadas.

Estos análisis fueron realizados por centro de espectrometría de masas y proteómica del IRB de Barcelona situado en el PCB (Parque Científico de Barcelona).

5.2.5. Fosforilación *in vitro* de Thr37 y Ser75 del USH3 de CLOBY con Cdk5:

Se hace una pre-incubación con Cdk5 y p25 (ratio molar 1:1.5) en su tampón de incubación (ver lista de tampones) a 37°C durante 4h. Se añade el complejo reconstituido a CLOBY purificada en el tampón de fosforilación (añadir el DTT fresco) y incubamos durante 16h a 30°C. Una vez acabada la reacción de fosforilación se purifica la muestra mediante “FPLC” para obtener CLOBY fosforilada sin impurezas.

5.3 RMN

5.3.1 Preparación de muestras RMN

La concentración final de las muestras estaba en el rango de 150 μM y un volumen de 300 μL . Se añadió un 10% D_2O a la muestra y se transfirió a un tubo de RMN (Shigemi).

Todos los experimentos de RMN fueron realizados en un espectrómetro Bruker 600 MHz equipado con una criosonda TCI y una consola Avance III (Unidad de RMN, Universidad de Barcelona). Los espectros realizados fueron del tipo $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC (“Heteronuclear Single Quantum Coherence”). Los espectros se realizaron a 278°C para observar las IDR y a 298°C para el dominio SH3 plegado.

5.3.2 Análisis RMN

Todos los espectros fueron analizados y asignados utilizando el programa CCPNMR Analysis V2 (Skinner et al., 2016) utilizando como referencia los espectros de los residuos ya asignados de USH3. Todos los CSP fueron calculados a partir del programa desarrollado en este laboratorio, FarSeer-NMR (Teixeira et al., 2018), exceptuando los del prototipo inicial Rover.

Los cálculos de CSP siguen la formula:

$$CSP = \sqrt{\frac{1}{2}(\Delta\delta_H^2 + 0.2 \cdot \Delta\delta_N^2)} \quad (7)$$

Donde $\Delta\delta_H$ and $\Delta\delta_N$ son los cambios en el desplazamiento químico de ^1H y ^{15}N .

El umbral para considerar una perturbación de desplazamiento estadísticamente significativa se eligió, para cada muestra considerando la media y la desviación estándar de las perturbaciones que forman el decil inferior de las mediadas. Es decir, se ordenan las perturbaciones de los residuos individuales de mayor a menor y se selecciona el 10% con menores perturbaciones. Para este conjunto se determina la media y se establece como umbral dicha media más tres desviaciones estándar.

5.4 Fluorescencia

5.4.1 Cribado por fluorescencia

La fluorescencia en placas se midió con un instrumento FluoDiaT70 (PTI) que utiliza filtros de banda de longitudes de onda. La cantidad medida es proporcional a la integral de esa área. Los filtros utilizados son; El filtro de excitación 486DF20 (Omega Optical) que excita en la banda de 476 – 496 nm. Filtros de emisión serán el 530DF20 (Omega Optical) y el 590DF20 (Omega Optical) midiendo la fluorescencia en las bandas 520-540 nm y 580-600 nm respectivamente.

Las muestras de CLOBY y CLOBY_TEV se preparan a la concentración de 1.1 μM y se reparte en exceso en placas de 96 pocillos. Posteriormente con el robot Crystal Phoenix RE (Art Robbins Instruments) trasparamos 90 μL de CLOBY o CLOBY_TEV a las placas de 96 pocillos de fluorescencia (*Hard-Shell 96-well PCR plates, thin-wall* de BIO-RAD) y 10 μL de cada compuesto (copia C) de la quimioteca utilizando las mismas posiciones que la placa de partida. Se añaden 10 μL de DMSO en la última columna para los controles CLOBY y CLOBY_TEV. Para el segundo cribado la adición tanto de compuesto como de DMSO se hizo manualmente con micropipetas o una pipeta multicanal para el DMSO en los controles.

5.4.2 Medidas espectrales de fluorescencia

Las muestras de CLOBY y CLOBY_TEV se preparan en el rango de concentraciones entre 0,1 μM y 100 μM . La fluorescencia se mide con un fluorímetro PTI (Photon Technology International) y analizadas con el programa FeliX32. La excitación se programa en 506 nm, la emisión se escanea desde los 512 nm hasta los 650 nm.

5.5 Lista de Tampones y Soluciones acuosas

- Tampón de Lisis
 - 20 mM Tris-HCL
 - 300 mM NaCl
 - 0,01% NaN_3
 - 10 mM imidazol (añadir fresco al usarlo)
 - pH 8

- Tampón F
 - 50 mM NaH_2PO_4
 - 150 mM NaCl
 - 200 μM EDTA
 - 0,01% NaN_3
 - pH 7,5

- Medio mínimo M9
 - 48 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 22 mM KH_2PO_4
 - 8,5 mM NaCl

- Solución Q:
 - 1 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 - 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 1 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 - 200 μM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 - 2,5 mM ZnCl_2
 - 1 mM CuSO_4

- 50 mM H_3BO_4
- 0,001 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Luria Broth (LB) para 1L de medio
 - 10g Triptona
 - 5g Extracto de levadura
 - 10g NaCl
- Tampón de RMN
 - 50 mM NaP
 - pH 7,5
- Tampones para Cdk5 y p25:
 - Tampón de Fosforilación
 - 50 mM NaP
 - 5 mM MgCl_2
 - 2 mM ATP
 - 2 mM DTT
 - pH 7
 - Tampón de incubación de Cdk5 con p25
 - PBS
 - 1 mM EDTA
 - 1 mM DTT
 - Tampón de unión
 - PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4
 - pH 7,3

Apéndice

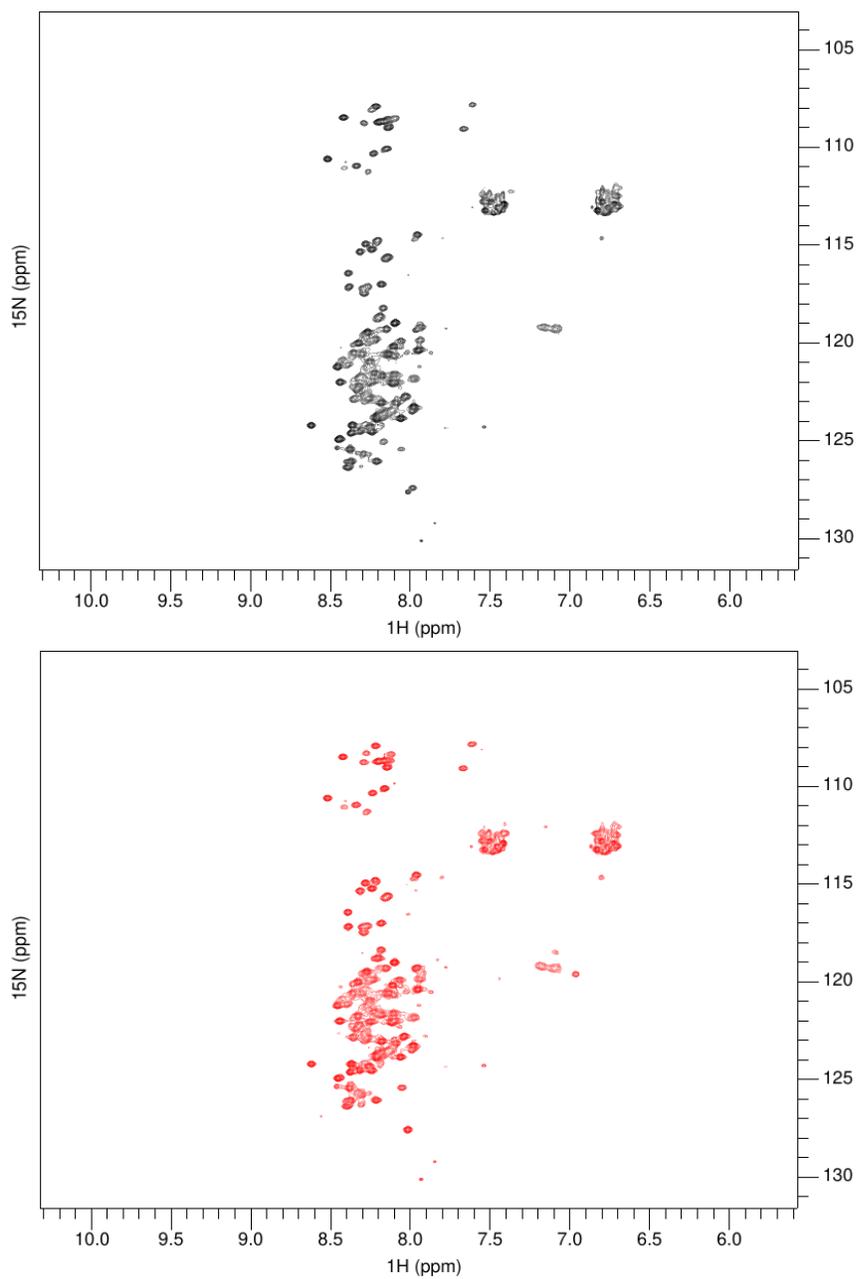


Figure A.1: Espectros ^1H - ^{15}N -HSQC de Rover (negro) y Rover con péptido de poliprolina (rojo), medidos a 278 K. Los espectros fueron medidos en un equipo de 600 MHz a una concentración de proteína de 150 μM .

Bibliografia

- Ai, H. W., Henderson, J. N., Remington, S. J., & Campbell, R. E. (2006). Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of Clavularia cyan fluorescent protein: Structural characterization and applications in fluorescence imaging. *Biochemical Journal*, *400*(3), 531–540. <https://doi.org/10.1042/BJ20060874>
- Amata, I., Maffei, M., Igea, A., Gay, M., Vilaseca, M., Nebreda, A. R., & Pons, M. (2013a). Multi-phosphorylation of the intrinsically disordered unique domain of c-src studied by in-cell and real-time NMR spectroscopy. *ChemBioChem*, *14*(14), 1820–1827. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300139>
- Amata, I., Maffei, M., Igea, A., Gay, M., Vilaseca, M., Nebreda, A. R., & Pons, M. (2013b). Multi-phosphorylation of the intrinsically disordered unique domain of c-src studied by in-cell and real-time NMR spectroscopy. *ChemBioChem*, *14*(14), 1820–1827. <https://doi.org/10.1002/cbic.201300139>
- Amata, I., Maffei, M., & Pons, M. (2014). Phosphorylation of unique domains of Src family kinases. *Frontiers in Genetics*, *5*(JUN), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00181>
- Arbesú, M., Maffei, M., Cordeiro, T. N., Teixeira, J. M. C., Pérez, Y., Bernadó, P., Roche, S., & Pons, M. (2017a). The Unique Domain Forms a Fuzzy Intramolecular Complex in Src Family Kinases. *Structure*, *25*(4), 630-640.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.02.011>
- Arbesú, M., Maffei, M., Cordeiro, T. N., Teixeira, J. M. C., Pérez, Y., Bernadó, P., Roche, S., & Pons, M. (2017b). The Unique Domain Forms a Fuzzy Intramolecular Complex in Src Family Kinases. *Structure*, *25*(4), 630-640.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.02.011>
- Awaji, T., Hirasawa, A., Shirakawa, H., Tsujimoto, G., & Miyazaki, S. (2001). Novel green fluorescent protein-based ratiometric indicators for monitoring pH in defined intracellular microdomains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *289*(2), 457–462. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6004>
- Bajar, B. T., Wang, E. S., Lam, A. J., Kim, B. B., Jacobs, C. L., Howe, E. S., Davidson, M. W., Lin, M. Z., & Chu, J. (2016). Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting. *Scientific Reports*, *6*(October 2015), 20889. <https://doi.org/10.1038/srep20889>
- Ban, D., Iconaru, L. I., Ramanathan, A., Zuo, J., & Kriwacki, R. W. (2017). A small molecule causes a population shift in the conformational landscape of an intrinsically disordered protein. *Journal of the American Chemical Society*, *139*(39), 13692–13700. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b01380>

- Banuelos, C. A., Tavakoli, I., Tien, A. H., Caley, D. P., Mawji, N. R., Li, Z., Wang, J., Yang, Y. C., Imamura, Y., Yan, L., Wen, J. G., Andersen, R. J., & Sadar, M. D. (2016). Sintokamide A is a novel antagonist of androgen receptor that uniquely binds activation function-1 in its amino-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry*, 291(42), 22231–22243. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.734475>
- Bernardini, A., Brockmeier, U., Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Harde, E., Acker-Palmer, A., Papkovsky, D., Acker, H., & Fandrey, J. (2015). Type I cell ROS kinetics under hypoxia in the intact mouse carotid body ex vivo: A FRET-based study. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 308(1), C61–C67. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00370.2013>
- Bister, K. (2015). Discovery of oncogenes: The advent of molecular cancer research. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 112, Issue 50, pp. 15259–15260). National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.1521145112>
- Bjorge, J. D., Jakymiw, A., & Fujita, D. J. (2000). Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. In *Oncogene* (Vol. 19, Issue 49, pp. 5620–5635). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203923>
- Blume-Jensen, P., & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. In *Nature* (Vol. 411, Issue 6835, pp. 355–365). Nature. <https://doi.org/10.1038/35077225>
- Boike, L., Cioffi, A. G., Majewski, F. C., Co, J., Henning, N. J., Jones, M. D., Liu, G., McKenna, J. M., Tallarico, J. A., Schirle, M., & Nomura, D. K. (2021). Discovery of a Functional Covalent Ligand Targeting an Intrinsically Disordered Cysteine within MYC. *Cell Chemical Biology*, 28(1), 4–13.e17. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.09.001>
- Brugge, J. S., Steinbaugh, P. J., & Erikson, R. L. (1978). Characterization of the avian sarcoma virus protein p60src. *Virology*, 91(1), 130–140. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90361-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90361-6)
- Buser, C. A., Sigal, C. T., Resh, M. D., & McLaughlin, S. (1994). Membrane Binding of Myristylated Peptides Corresponding to the NH2 Terminus of Src. *Biochemistry*, 33(44), 13093–13101. <https://doi.org/10.1021/bi00248a019>
- Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J., & Matter, A. (2002). Glivec (ST1571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 1, Issue 7, pp. 493–502). Nat Rev Drug Discov. <https://doi.org/10.1038/nrd839>
- Cartwright, C. A., Meisler, A. I., & Eckhart, W. (1990). Activation of the pp60c-src protein kinase is an early event in colonic carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(2), 558–562. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.2.558>
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802–805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>

- Choi, S. H., Mahankali, M., Lee, S. J., Hull, M., Petrassi, H. M., Chatterjee, A. K., Schultz, P. G., Jones, K. A., & Shen, W. (2017). Targeted Disruption of Myc-Max Oncoprotein Complex by a Small Molecule. *ACS Chemical Biology*, *12*(11), 2715–2719. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00799>
- Conway, D. E., Breckenridge, M. T., Hinde, E., Gratton, E., Chen, C. S., & Schwartz, M. A. (2013). Fluid shear stress on endothelial cells modulates mechanical tension across VE-cadherin and PECAM-1. *Current Biology*, *23*(11), 1024–1030. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.049>
- Cowan-Jacob, S. W., Fendrich, G., Manley, P. W., Jahnke, W., Fabbro, D., Liebetanz, J., & Meyer, T. (2005). The crystal structure of a c-Src complex in an active conformation suggests possible steps in c-Src activation. *Structure*, *13*(6), 861–871. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.03.012>
- Cowan-Jacob, S. W., Jahnke, W., & Knapp, S. (2014). Novel approaches for targeting kinases: Allosteric inhibition, allosteric activation and pseudokinases. In *Future Medicinal Chemistry* (Vol. 6, Issue 5, pp. 541–561). Future Science. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.216>
- Dar, A. C., & Shokat, K. M. (2011). The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling. *Annual Review of Biochemistry*, *80*, 769–795. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-090308-173656>
- De Mol, E., Fenwick, R. B., Phang, C. T. W., Buzón, V., Szulc, E., De La Fuente, A., Escobedo, A., García, J., Bertocini, C. W., Estébanez-Perpiñá, E., McEwan, I. J., Riera, A., & Salvatella, X. (2016). EPI-001, A Compound Active against Castration-Resistant Prostate Cancer, Targets Transactivation Unit 5 of the Androgen Receptor. *ACS Chemical Biology*, *11*(9), 2499–2505. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00182>
- Dunker, A. K., Lawson, J. D., Brown, C. J., Williams, R. M., Romero, P., Oh, J. S., Oldfield, C. J., Campen, A. M., Ratliff, C. M., Hipps, K. W., Ausio, J., Nissen, M. S., Reeves, R., Kang, C. H., Kissinger, C. R., Bailey, R. W., Griswold, M. D., Chiu, W., Garner, E. C., & Obradovic, Z. (2001). Intrinsically disordered protein. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, *19*(1), 26–59. [https://doi.org/10.1016/S1093-3263\(00\)00138-8](https://doi.org/10.1016/S1093-3263(00)00138-8)
- Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. In *Methods in Enzymology* (Vol. 541, pp. 85–94). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0>
- Erard, M., Fredj, A., Pasquier, H., Beltolngar, D. B., Bousmah, Y., Derrien, V., Vincent, P., & Merola, F. (2013). Minimum set of mutations needed to optimize cyan fluorescent proteins for live cell imaging. *Molecular BioSystems*, *9*(2), 258–267. <https://doi.org/10.1039/c2mb25303h>
- Erkizan, H. V., Kong, Y., Merchant, M., Schlottmann, S., Barber-Rotenberg, J. S., Yuan, L., Abaan, O. D., Chou, T. H., Dakshanamurthy, S., Brown, M. L., Ren, A., & Toretsky, J. A. (2009). A small

- molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. *Nature Medicine*, 15(7), 750–756. <https://doi.org/10.1038/nm.1983>
- Fallacara, A. L., Tintori, C., Radi, M., Schenone, S., & Botta, M. (2014). Insight into the allosteric inhibition of Abl kinase. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(5), 1325–1338. <https://doi.org/10.1021/ci500060k>
- Finn, R. D., Coghill, P., Eberhardt, R. Y., Eddy, S. R., Mistry, J., Mitchell, A. L., Potter, S. C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G. A., Tate, J., & Bateman, A. (2016). The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D279–D285. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1344>
- Foda, Z. H., Shan, Y., Kim, E. T., Shaw, D. E., & Seeliger, M. A. (2015). A dynamically coupled allosteric network underlies binding cooperativity in Src kinase. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms6939>
- Forster, T. (1946). Energiewanderung und Fluoreszenz. *Die Naturwissenschaften*, 33(6), 166–175. <https://doi.org/10.1007/BF00585226>
- Gavet, O., & Pines, J. (2010). Progressive Activation of CyclinB1-Cdk1 Coordinates Entry to Mitosis. *Developmental Cell*, 18(4), 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.013>
- George Gabriel Stokes. (1852). On the change of refrangibility of light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 142, 463–562. <https://doi.org/10.1098/rstl.1852.0022>
- Gingrich, J. R., Pelkey, K. A., Fam, S. R., Huang, Y., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., & Salter, M. W. (2004). Unique domain anchoring of Src to synaptic NMDA receptors via the mitochondrial protein NADH dehydrogenase subunit 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), 6237–6242. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401413101>
- Goedhart, J., Von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimosin, M., Joosen, L., Hink, M. A., Van Weeren, L., Gadella, T. W. J., & Royant, A. (2012). Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nature Communications*, 3. <https://doi.org/10.1038/ncomms1738>
- Gordon, D. E., Jang, G. M., Bouhaddou, M., Xu, J., Obernier, K., White, K. M., O'Meara, M. J., Rezelj, V. V., Guo, J. Z., Swaney, D. L., Tummino, T. A., Hüttenhain, R., Kaake, R. M., Richards, A. L., Tutuncuoglu, B., Foussard, H., Batra, J., Haas, K., Modak, M., ... Krogan, N. J. (2020). A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing. *Nature*, 583(7816), 459–468. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2286-9>
- Grashoff, C., Hoffman, B. D., Brenner, M. D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M. T., McLean, M. A., Sligar, S. G., Chen, C. S., Ha, T., & Schwartz, M. A. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature*, 466(7303), 263–266. <https://doi.org/10.1038/nature09198>

- Green, D. R. (2016). A BH3 Mimetic for Killing Cancer Cells. In *Cell* (Vol. 165, Issue 7, p. 1560). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.080>
- Griesbeck, O., Baird, G. S., Campbell, R. E., Zacharias, D. A., & Tsien, R. Y. (2001). Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29188–29194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102815200>
- Hao, L., Tiganis, T., Tonks, N. K., & Charbonneau, H. (1997). The noncatalytic C-terminal segment of the T cell protein tyrosine phosphatase regulates activity via an intramolecular mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 272(46), 29322–29329. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.46.29322>
- Harrison, S. C. (2003). Variation on an Src-like theme. In *Cell* (Vol. 112, Issue 6, pp. 737–740). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00196-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00196-X)
- Helmchen, F., & Denk, W. (2005). Deep tissue two-photon microscopy. In *Nature Methods* (Vol. 2, Issue 12, pp. 932–940). <https://doi.org/10.1038/nmeth818>
- Henley, M. J., & Koehler, A. N. (2021). Advances in targeting ‘undruggable’ transcription factors with small molecules. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00199-0>
- Hochreiter, B., Garcia, A. P., & Schmid, J. A. (2015). Fluorescent Proteins as Genetically Encoded FRET Biosensors in Life Sciences. *Sensors (Switzerland)*, 15(10), 26281–26314. <https://doi.org/10.3390/s151026281>
- Holler, J., Skoog, D. A., & Crouch, S. (2007). Principles of instrumental analysis. *Cengage Learning*, 6.
- Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., & Liang, X. J. (2020). Therapeutic siRNA: state of the art. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 5, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>
- Huebner, R. J., & Todaro, G. J. (1969). Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 64(3), 1087–1094. <https://doi.org/10.1073/pnas.64.3.1087>
- Hunter, T., & Sefton, B. M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(3 I), 1311–1315. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.3.1311>
- Huse, M., & Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. In *Cell* (Vol. 109, Issue 3, pp. 275–282). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00741-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00741-9)
- Hwang, D. J., He, Y., Ponnusamy, S., Mohler, M. L., Thiyagarajan, T., McEwan, I. J., Narayanan, R., & Miller, D. D. (2019). New Generation of Selective Androgen Receptor Degraders: Our Initial Design, Synthesis, and Biological Evaluation of New Compounds with Enzalutamide-Resistant

- Prostate Cancer Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 62(2), 491–511. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00973>
- Imamura, H., Huynh Nhat, K. P., Togawa, H., Saito, K., Iino, R., Kato-Yamada, Y., Nagai, T., & Noji, H. (2009). Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(37), 15651–15656. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904764106>
- Irby, R. B., & Yeatman, T. J. (2000). Role of Src expression and activation in human cancer. In *Oncogene* (Vol. 19, Issue 49, pp. 5636–5642). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203912>
- Irby, Rosalyn B., Mao, W., Coppola, D., Kang, J., Loubeau, J. M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D. J., Jove, R., & Yeatman, T. J. (1999). Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nature Genetics*, 21(2), 187–190. <https://doi.org/10.1038/5971>
- Ishizawar, R., & Parsons, S. J. (2004). C-Src and cooperating partners in human cancer. In *Cancer Cell* (Vol. 6, Issue 3, pp. 209–214). Cancer Cell. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.001>
- Johnson, L. N. (2009). The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society Transactions*, 37(4), 627–641. <https://doi.org/10.1042/BST0370627>
- Koscielny, G., An, P., Carvalho-Silva, D., Cham, J. A., Fumis, L., Gasparian, R., Hasan, S., Karamanis, N., Maguire, M., Papa, E., Pierleoni, A., Pignatelli, M., Platt, T., Rowland, F., Wankar, P., Bento, A. P., Burdett, T., Fabregat, A., Forbes, S., ... Dunham, I. (2017). Open Targets: A platform for therapeutic target identification and Validation. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D985–D994. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1055>
- Kotera, I., Iwasaki, T., Imamura, H., Noji, H., & Nagai, T. (2010). Reversible dimerization of aequorea victoria fluorescent proteins increases the dynamic range of FRET-based indicators. *ACS Chemical Biology*, 5(2), 215–222. <https://doi.org/10.1021/cb900263z>
- Koushik, S. V., Chen, H., Thaler, C., Puhl, H. L., & Vogel, S. S. (2006). Cerulean, venus, and venusY67C FRET reference standards. *Biophysical Journal*, 91(12). <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.096206>
- Kumar, A., Jaggi, A. S., & Singh, N. (2014). Pharmacological investigations on possible role of Src kinases in neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice. *International Journal of Neuroscience*, 124(10), 777–786. <https://doi.org/10.3109/00207454.2013.879869>
- Lam, A. J., St-Pierre, F., Gong, Y., Marshall, J. D., Cranfill, P. J., Baird, M. A., McKeown, M. R., Wiedenmann, J., Davidson, M. W., Schnitzer, M. J., Tsien, R. Y., & Lin, M. Z. (2012a). Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nature Methods*, 9(10), 1005–1012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2171>

- Lam, A. J., St-Pierre, F., Gong, Y., Marshall, J. D., Cranfill, P. J., Baird, M. A., McKeown, M. R., Wiedenmann, J., Davidson, M. W., Schnitzer, M. J., Tsien, R. Y., & Lin, M. Z. (2012b). Improving FRET dynamic range with bright green and red fluorescent proteins. *Nature Methods*, 9(10), 1005–1012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2171>
- Li, M., Chen, X., Ye, Q. Z., Vogt, A., & Yin, X. M. (2012). A high-throughput FRET-based assay for determination of Atg4 activity. *Autophagy*, 8(3), 401–412. <https://doi.org/10.4161/auto.18777>
- Lito, P., Solomon, M., Li, L. S., Hansen, R., & Rosen, N. (2016). Cancer therapeutics: Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. *Science*, 351(6273), 604–608. <https://doi.org/10.1126/science.aad6204>
- Lovell, J. F., Chen, J., Jarvi, M. T., Cao, W. G., Allen, A. D., Liu, Y., Tidwell, T. T., Wilson, B. C., & Zheng, G. (2009). FRET quenching of photosensitizer singlet oxygen generation. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(10), 3203–3211. <https://doi.org/10.1021/jp810324v>
- Mabonga, L., & Kappo, A. P. (2019). Protein-protein interaction modulators: advances, successes and remaining challenges. In *Biophysical Reviews* (Vol. 11, Issue 4, pp. 559–581). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00570-x>
- Maffei, M. (2015). *Structural and functional characterization of the intrinsically disordered Unique domain of c-Src* [Universidad de Barcelona]. <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/61812>
- Maffei, M., Arbesú, M., Le Roux, A. L., Amata, I., Roche, S., & Pons, M. (2015). The SH3 domain acts as a scaffold for the N-terminal intrinsically disordered regions of c-Src. *Structure*, 23(5), 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.03.009>
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. In *Science* (Vol. 298, Issue 5600, pp. 1912–1934). Science. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>
- Manning, Gerard, Plowman, G. D., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 27, Issue 10, pp. 514–520). Trends Biochem Sci. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02179-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02179-5)
- Markwardt, M. L., Kremers, G. J., Kraft, C. A., Ray, K., Cranfill, P. J. C., Wilson, K. A., Day, R. N., Wachter, R. M., Davidson, M. W., & Rizzo, M. A. (2011). An improved cerulean fluorescent protein with enhanced brightness and reduced reversible photoswitching. *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017896>
- Masharina, A., Reymond, L., Maurel, D., Umezawa, K., & Johnsson, K. (2012). A fluorescent sensor for GABA and synthetic GABAB receptor ligands. *Journal of the American Chemical Society*, 134(46), 19026–19034. <https://doi.org/10.1021/ja306320s>

- Matsuda, M., Mayer, B. J., Fukui, Y., & Hanafusa, H. (1990). Binding of transforming protein, P47gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science*, 248(4962), 1537–1539. <https://doi.org/10.1126/science.1694307>
- Mayer, B. J., Hamaguchi, M., & Hanafusa, H. (1988). A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature*, 332(6161), 272–275. <https://doi.org/10.1038/332272a0>
- Meimetis, L. G., Williams, D. E., Mawji, N. R., Banuelos, C. A., Lal, A. A., Park, J. J., Tien, A. H., Fernandez, J. G., De Voogd, N. J., Sadar, M. D., & Andersen, R. J. (2012). Niphatenones, glycerol ethers from the sponge *Niphates digitalis* block androgen receptor transcriptional activity in prostate cancer cells: Structure elucidation, synthesis, and biological activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(1), 503–514. <https://doi.org/10.1021/jm2014056>
- Miura, H., Matsuda, M., & Aoki, K. (2013). Development of a FRET biosensor with high specificity for Akt. *Cell Structure and Function*, 39(1), 9–10. <https://doi.org/10.1247/csf.13018>
- Miyawaki, A. (2011). Development of probes for cellular functions using fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 357–373. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072909-094736>
- Moore, M. M., Oteng-Pabi, S. K., Pandelieva, A. T., Mayo, S. L., & Chica, R. A. (2012a). Recovery of red fluorescent protein chromophore maturation deficiency through rational design. *PLoS One*, 7(12), e52463. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052463>
- Moore, M. M., Oteng-Pabi, S. K., Pandelieva, A. T., Mayo, S. L., & Chica, R. A. (2012b). Recovery of Red Fluorescent Protein Chromophore Maturation Deficiency through Rational Design. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052463>
- Nobis, M., McGhee, E. J., Morton, J. P., Schwarz, J. P., Karim, S. A., Quinn, J., Edward, M., Campbell, A. D., McGarry, L. C., Evans, T. R. J., Brunton, V. G., Frame, M. C., Carragher, N. O., Wang, Y., Sansom, O. J., Timpson, P., & Anderson, K. I. (2013). Intravital FLIM-FRET imaging reveals dasatinib-induced spatial control of Src in pancreatic cancer. *Cancer Research*, 73(15), 4674–4686. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4545>
- Obst, J. K., Wang, J., Jian, K., Williams, D. E., Tien, A. H., Mawji, N., Tam, T., Yang, Y. C., Andersen, R. J., Chi, K. N., Montgomery, B., & Sadar, M. D. (2019). Revealing Metabolic Liabilities of Ralaniten to Enhance Novel Androgen Receptor Targeted Therapies. *ACS Pharmacology and Translational Science*, 2(6), 453–467. <https://doi.org/10.1021/acspsci.9b00065>
- Olenych, S. G., Claxton, N. S., Ottenberg, G. K., & Davidson, M. W. (2007). The Fluorescent Protein Color Palette. *Current Protocols in Cell Biology*, 36(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb2105s36>
- Ouyang, M., Lu, S., Li, X. Y., Xu, J., Seong, J., Giepmans, B. N. G., Shyy, J. Y. J., Weiss, S. J., & Wang, Y. (2008). Visualization of polarized membrane type 1 matrix metalloproteinase activity in

- live cells by fluorescence resonance energy transfer imaging. *Journal of Biological Chemistry*, 283(25), 17740–17748. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709872200>
- Paster, W., Paar, C., Eckerstorfer, P., Jakober, A., Drbal, K., Schütz, G. J., Sonnleitner, A., & Stockinger, H. (2009). Genetically Encoded Förster Resonance Energy Transfer Sensors for the Conformation of the Src Family Kinase Lck. *The Journal of Immunology*, 182(4), 2160–2167. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802639>
- Patwardhan, P., & Resh, M. D. (2010). Myristoylation and Membrane Binding Regulate c-Src Stability and Kinase Activity. *Molecular and Cellular Biology*, 30(17), 4094–4107. <https://doi.org/10.1128/mcb.00246-10>
- Pawson, T. (2004). Specificity in Signal Transduction: From Phosphotyrosine-SH2 Domain Interactions to Complex Cellular Systems. In *Cell* (Vol. 116, Issue 2, pp. 191–203). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01077-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01077-8)
- Pérez, Y., Gairí, M., Pons, M., & Bernadó, P. (2009). Structural Characterization of the Natively Unfolded N-Terminal Domain of Human c-Src Kinase: Insights into the Role of Phosphorylation of the Unique Domain. *Journal of Molecular Biology*, 391(1), 136–148. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.06.018>
- Perez, Y., Maffei, M., Amata, I., Arbesú, M., & Pons, M. (2013). Lipid Binding by Disordered Proteins. *Protocol Exchange*. <https://doi.org/10.1038/protex.2013.094>
- Pérez, Y., Maffei, M., Igea, A., Amata, I., Gairí, M., Nebreda, A. R., Bernadó, P., & Pons, M. (2013a). Lipid binding by the Unique and SH3 domains of c-Src suggests a new regulatory mechanism. *Scientific Reports*, 3, 1295. <https://doi.org/10.1038/srep01295>
- Pérez, Y., Maffei, M., Igea, A., Amata, I., Gairí, M., Nebreda, A. R., Bernadó, P., & Pons, M. (2013b). Lipid binding by the Unique and SH3 domains of c-Src suggests a new regulatory mechanism. *Scientific Reports*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep01295>
- PerkinElmer. (2000). An Introduction to fluorescence spectroscopy. *Microchemical Journal*, 65(3), 353. [https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(00\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(00)00048-5)
- Piston, D. W., & Kremers, G. J. (2007). Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 32, Issue 9, pp. 407–414). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.08.003>
- Ponnusamy, S., Coss, C. C., Thiyagarajan, T., Watts, K., Hwang, D. J., He, Y., Selth, L. A., McEwan, I. J., Duke, C. B., Pagadala, J., Singh, G., Wake, R. W., Ledbetter, C., Tilley, W. D., Moldoveanu, T., Dalton, J. T., Miller, D. D., & Narayanan, R. (2017). Novel selective agents for the degradation of androgen receptor variants to treat castration-resistant prostate cancer. *Cancer Research*, 77(22), 6282–6298. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0976>

- Remington, S. J. (2006). *Fluorescent proteins : maturation , photochemistry and photophysics*. 714–721. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.10.001>
- Resh, M. D. (1993). Interaction of tyrosine kinase oncoproteins with cellular membranes. In *BBA - Reviews on Cancer* (Vol. 1155, Issue 3, pp. 307–322). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0304-419X\(93\)90012-2](https://doi.org/10.1016/0304-419X(93)90012-2)
- Resh, M. D. (1999). Fatty acylation of proteins: New insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1451, Issue 1, pp. 1–16). Biochim Biophys Acta. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(99\)00075-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(99)00075-0)
- Resh, M. D. (2006). Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. In *Nature Chemical Biology* (Vol. 2, Issue 11, pp. 584–590). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nchembio834>
- Rickles, R. J., Botfield, M. C., Zhou, X. M., Henry, P. A., Brugge, J. S., & Zoller, M. J. (1995). Phage display selection of ligand residues important for Src homology 3 domain binding specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), 10909–10913. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.10909>
- Robbins, D. J., Zhen, E., Cheng, M., Xu, S., Vanderbilt, C. A., Ebert, D., Garcia, C., Dang, A., & Cobb, M. H. (1993). Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1, 2, and 3. *Journal of the American Society of Nephrology*, 4(5), 1104–1110.
- Rous, P. (1910). A transmissible avian neoplasm. (sarcoma of the common fowl.). *Journal of Experimental Medicine*, 12(5), 696–705. <https://doi.org/10.1084/jem.12.5.696>
- Rous, P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *Journal of Experimental Medicine*, 13(4), 397–411. <https://doi.org/10.1084/jem.13.4.397>
- Sadowski, I., Stone, J. C., & Pawson, T. (1986). A noncatalytic domain conserved among cytoplasmic protein-tyrosine kinases modifies the kinase function and transforming activity of Fujinami sarcoma virus P130gag-fps. *Molecular and Cellular Biology*, 6(12), 4396–4408. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.12.4396-4408.1986>
- Santofimia-Castaño, P., Rizzuti, B., Xia, Y., Abian, O., Peng, L., Velázquez-Campoy, A., Neira, J. L., & Iovanna, J. (2019). Targeting intrinsically disordered proteins involved in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03347-3>
- Santos, H. G. D., & Siltberg-Liberles, J. (2016). Paralog-Specific Patterns of Structural disorder and phosphorylation in the vertebrate SH3-SH2-Tyrosine kinase protein family. *Genome Biology and Evolution*, 8(9), 2806–2825. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw194>

- Savchuk, O. A., Silvestre, O. F., Adão, R. M. R., & Nieder, J. B. (2019). GFP fluorescence peak fraction analysis based nanothermometer for the assessment of exothermal mitochondria activity in live cells. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44023-7>
- Schmid, J. A., & Neumeier, H. (2005). Evolutions in science triggered by green fluorescent protein (GFP). In *ChemBioChem* (Vol. 6, Issue 7, pp. 1149–1156). <https://doi.org/10.1002/cbic.200500029>
- Seong, J., Tajik, A., Sun, J., Guan, J. L., Humphries, M. J., Craig, S. E., Shekaran, A., García, A. J., Lu, S., Lin, M. Z., Wang, N., & Wang, Y. (2013). Distinct biophysical mechanisms of focal adhesion kinase mechanoactivation by different extracellular matrix proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(48), 19372–19377. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307405110>
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., & Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2(12), 905–909. <https://doi.org/10.1038/nmeth819>
- Shenoy, S., Chackalaparampil, I., Bagrodia, S., Lin, P. H., & Shalloway, D. (1992). Role of p34cdc2-mediated phosphorylations in two-step activation of pp60c-src during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(15), 7237–7241. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.15.7237>
- Shimomura, O. (2009). Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 48(31), 5590–5602. <https://doi.org/10.1002/anie.200902240>
- Shrestha, D., Jenei, A., Nagy, P., Vereb, G., & Szöllősi, J. (2015). Understanding FRET as a research tool for cellular studies. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 4, pp. 6718–6756). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms16046718>
- Sigal, C. T., Zhou, W., Buser, C. A., McLaughlin, S., & Resh, M. D. (1994). Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25), 12253–12257. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.12253>
- Silverman, L., & Resh, M. D. (1992). Lysine residues form an integral component of a novel NH₂-terminal membrane targeting motif for myristylated pp60(v-src). *Journal of Cell Biology*, 119(2), 415–426. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.2.415>
- Sipieter, F., Ladik, M., Vandenabeele, P., & Riquet, F. (2014). Shining light on cell death processes - a novel biosensor for necroptosis, a newly described cell death program. In *Biotechnology Journal* (Vol. 9, Issue 2, pp. 224–240). <https://doi.org/10.1002/biot.201300200>
- Stehelin, D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., & Vogt, P. K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*, 260(5547), 170–173. <https://doi.org/10.1038/260170a0>

- Stehelin, Dominique, Guntaka, R. V., Varmus, H. E., & Bishop, J. M. (1976). Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *Journal of Molecular Biology*, 101(3), 349–365. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90152-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90152-2)
- Stover, D. R., Liebetanz, J., & Lydon, N. B. (1994). Cdc2-mediated modulation of pp60c-src activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(43), 26885–26889.
- Sudol, M. (1998). From Src Homology domains to other signaling modules: Proposal of the “protein recognition code.” In *Oncogene* (Vol. 17, Issue 11 REV. ISS. 1, pp. 1469–1474). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202182>
- Tanaka, A., & Fujita, D. J. (1986). Expression of a molecularly cloned human c-src oncogene by using a replication-competent retroviral vector. *Molecular and Cellular Biology*, 6(11), 3900–3909. <https://doi.org/10.1128/mcb.6.11.3900-3909.1986>
- Teixeira, J. M. C., Skinner, S. P., Arbesú, M., Breeze, A. L., & Pons, M. (2018). Farseer-NMR: automatic treatment, analysis and plotting of large, multi-variable NMR data. *Journal of Biomolecular NMR*, 71(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10858-018-0182-5>
- Thomas, S. M., & Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by SRC family kinases. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 13, pp. 513–609). Annu Rev Cell Dev Biol. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.513>
- Tsien, R. Y. (1998a). The green fluorescent protein. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 67, pp. 509–544). <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
- Tsien, R. Y. (1998b). *The green fluorescent protein*.
- Tsutsui, H., Karasawa, S., Okamura, Y., & Miyawaki, A. (2008). Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. *Nature Methods*, 5(8), 683–685. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1235>
- Van Beek, J. D., Hesst, S., Vollrath, F., & Meier, B. H. (2002). The molecular structure of spider dragline silk: Folding and orientation of the protein backbone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10266–10271. <https://doi.org/10.1073/pnas.152162299>
- Vinkenborg, J. L., Evers, T. H., Reulen, S. W. A., Meijer, E. W., & Merkx, M. (2007). Enhanced sensitivity of FRET-based protease sensors by redesign of the GFP dimerization interface. *ChemBioChem*, 8(10), 1119–1121. <https://doi.org/10.1002/cbic.200700109>
- Wang, L. H., Duesberg, P. H., Kawai, S., & Hanafusa, H. (1976). Location of envelope specific and sarcoma specific oligonucleotides on RNA of Schmidt-Ruppin Rous sarcoma virus. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America, 73(2), 447–451. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.2.447>

- Wang, L., Jackson, W. C., Steinbach, P. A., & Tsien, R. Y. (2004). Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(48), 16745–16749. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407752101>
- Wu, P., Nielsen, T. E., & Clausen, M. H. (2016). Small-molecule kinase inhibitors: An analysis of FDA-approved drugs. In *Drug Discovery Today* (Vol. 21, Issue 1, pp. 5–10). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.07.008>
- Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M. J., & Harrison, S. C. (1999). Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Molecular Cell*, 3(5), 629–638. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80356-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80356-1)
- Xu, W., Harrison, S. C., & Eck, M. J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature*, 385(6617), 595–602. <https://doi.org/10.1038/385595a0>
- Xu, X., Gerard, A. L. V., Huang, B. C. B., Anderson, D. C., Payan, D. G., & Luo, Y. (1998). Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer. *Nucleic Acids Research*, 26(8), 2034–2035. <https://doi.org/10.1093/nar/26.8.2034>
- Yu, H., Rosen, M. K., Shin, T. B., Seidel-Dugan, C., Brugge, J. S., & Schreiber, S. L. (1992). Solution structure of the SH3 domain of Src and identification of its ligand-binding site. *Science*, 258(5088), 1665–1668. <https://doi.org/10.1126/science.1280858>
- Zhang, X. H. F., Wang, Q., Gerald, W., Hudis, C. A., Norton, L., Smid, M., Foekens, J. A., & Massagué, J. (2009). Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent Survival Signals. *Cancer Cell*, 16(1), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.05.017>