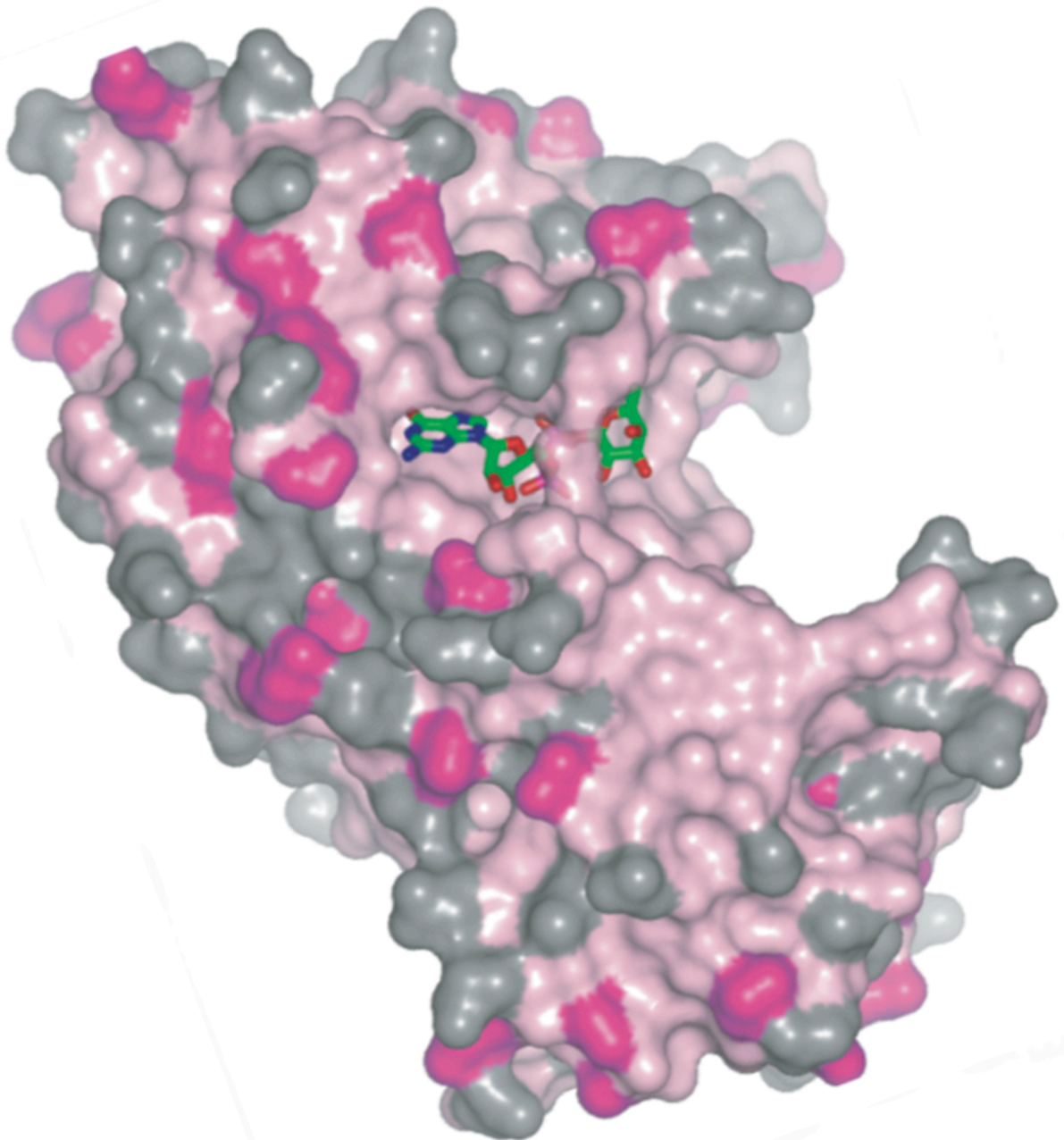


# Búsqueda de inhibidores frente a la proteína O-fucosiltransferasa 1 (PoFUT1)



**Jessika Valero González**

Proyecto dirigido por Dr. Ramón Hurtado-Guerrero  
Master en Biología Molecular - Universidad de Zaragoza



# Índice.

<b>Índice.....</b>	<b>1</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>3</b>
<b>Vía de señalización Notch y su regulación.....</b>	<b>3</b>
<b>O-fucosil transferasa 1 (PoFUT1).....</b>	<b>4</b>
<b>Estructura de <i>CePOFUT1</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>Búsqueda de compuestos inhibidores frente a PoFUT1.....</b>	<b>6</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>9</b>
<b>Estrategia experimental. ....</b>	<b>11</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>13</b>
<b>Expresión y purificación de <i>CePOFUT1</i>. ....</b>	<b>13</b>
<b>Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). ....</b>	<b>14</b>
<b>Cribado Masivo (High throughput screening).....</b>	<b>14</b>
<b>Dicroísmo circular.....</b>	<b>16</b>
<b>Saturation-Transferred-Difference (STD).....</b>	<b>17</b>
<b>Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).....</b>	<b>18</b>
<b>Cristalización de compuestos con la proteína silvestre.....</b>	<b>20</b>
<b>Resultados. ....</b>	<b>22</b>
<b>Cribado masivo de compuestos.....</b>	<b>22</b>
<b>Caracterización biofísica de la unión. ....</b>	<b>25</b>
Dicroísmo circular.....	25
Calorimetría de titulación isotérmica.....	27
STD del compuesto 3 .....	31
Cristalización.....	32
<b>Discusión.....</b>	<b>35</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>38</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>40</b>
<b>Relación de abreviaturas.....</b>	<b>43</b>

*Búsqueda de inhibidores frente a la proteína O-fucosiltransferasa 1 (PoFUT1)*

Jessika Valero González



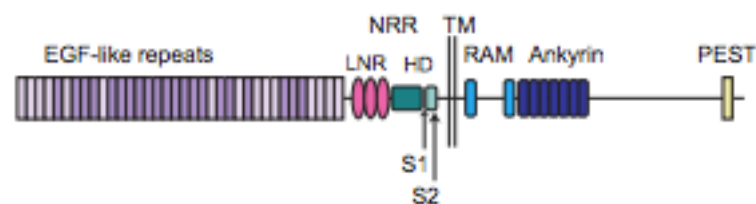


## Introducción.

### Vía de señalización Notch y su regulación.

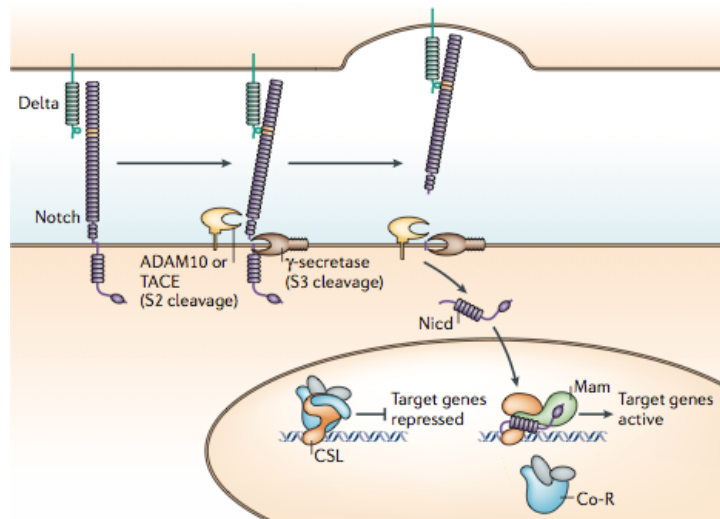
Tan solo un pequeño número de vías de señalización son utilizadas iterativamente con el fin de regular la proliferación o la muerte celular en el desarrollo de organismos. La vía de señalización de Notch es una de ellas. Esta vía está ampliamente conservada en el reino animal.

En esta vía de señalización se pueden diferenciar dos elementos principalmente: el receptor y los ligandos. El receptor Notch es una proteína transmembrana tipo I en el que se diferencian tres dominios (**Figura 1**). Los ligandos que interaccionan con Notch, las proteínas Delta y Serrate (Jagged en mamíferos), también son proteínas transmembrana tipo I con una estructura muy similar a Notch. Por ese motivo, la interacción entre receptor y ligando queda restringida a células vecinas (*Bray, 2006*).



**Figura 1.** Estructura esquemática proteica de Notch. Se diferencian la región extracelular compuesta por entre 29 y 36 motivos EGF, la región regulatoria negativa (NRR) y la zona intracelular. Se distinguen también los dos puntos de ruptura proteolítica S1 y S2 que provocarán la liberación del dominio intracelular. (*Bray, 2006*)

En la **Figura 2** se observa un esquema de la vía de señalización. Puede distinguirse que la transducción de la señal no tiene mensajeros secundarios y que la unión de los ligandos al receptor implica dos rupturas proteolíticas en el mismo que libera el dominio intracelular. Una vez liberado, éste se dirige al núcleo donde coopera con la proteína de unión a DNA CSL y su co-activador Mastermind para promover la transcripción.



**Figura 2.** Vía de señalización Notch. La unión del ligando Delta al receptor Notch de una célula vecina provoca la ruptura y liberación del dominio intracelular (Nid). Éste se dirige al núcleo, donde su interacción con el complejo CSL provoca el inicio de la transcripción. (Bray, 2006)

Esta vía está regulada por diferentes mecanismos, como son procesos de endocitosis y tráfico intracelular, así como por modificaciones post-traduccionales como la ubiquitinación, la fosforilación o la glicosilación (Bray, 2006).

En los últimos años se han descrito numerosas glicosiltransferasas que modifican los dominios EGF de Notch. Sin embargo, de los estudios genéticos de eliminación de los genes que codifican estas glicosiltransferasas se deduce que tanto PoFUT1 como Fringe son enzimas esenciales para la vía de señalización, y demuestran que Notch tan solo es funcional cuando queda glicosilado por al menos estas dos enzimas (Jafar-Nejad, 2010), (Okajima, 2003).

### O-fucosil transferasa 1 (PoFUT1).

La O-fucosil transferasa 1 (PoFUT1) es una fucosiltransferasa de inversión que pertenece a la familia GT65 compuesta por unos 300 aminoácidos. Este enzima transfiere un residuo de fucosa usando GDP-fucosa como sustrato donante a motivos ricos en cisteínas similares al factor de crecimiento presentes en un gran número de



proteínas. PoFUT1 se encuentra solamente en organismos eucarióticos superiores y está localizada en el retículo endoplasmático debido a la secuencia “RDEF” localizada en el carboxilo terminal, al contrario que la mayoría de las glicosiltransferasas que se encuentran en el aparato de Golgi (*Lira-Navarrete, 2011*), (*Shi, 2003*), (*Wang, 1998*),.

El sustrato aceptor mejor estudiado del enzima PoFUT1 es la proteína Notch. El enzima fucosila serinas y treoninas de EGFs que contienen el motivo  $C^2-X_{(4-5)}-[S/T]-C^3$ , donde  $C^2$  y  $C^3$  son la segunda y tercera cisteínas conservadas. Dentro de los dominios EGF, los EGF 11, 12 y 13 resultan ser los más interesantes biológicamente ya que es el lugar donde los ligandos de Notch se unen (**Figura 1**) (*Artavanis-Tsakonas, 1999*), (*Bray, 2006*), (*Takeuchi, 2010*) (*Wang Y, 2001*).

Además, se ha descrito que PoFUT1 tiene también función chaperona que promueve la unión y el transporte de Notch desde el retículo plasmático a la membrana celular, sin ser esta función un efecto secundario de la glicosilación.

### Estructura de *CePOFUT1*.

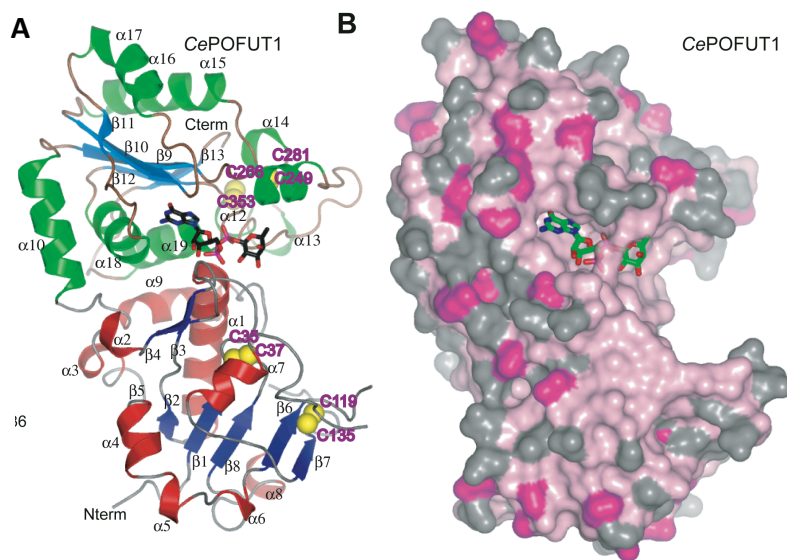
Estudios recientes han propuesto la estructura de la O-fucosil transferasa 1 de *Caenorhabditis elegans* (*CePOFUT1*) en su forma nativa y formando complejo con GDP y GDP-fucosa (*Lira-Navarrete, 2011*). Esta especie fue escogida por su elevado grado de similitud con la proteína humana *HsPOFUT1* y porque además al contrario que otras proteínas homologas de otros organismos, *CePOFUT1* carece de sitios de N-glicosilación lo que implica que su cristalización resulte más favorable.

*CePOFUT1* es una proteína predominantemente monomérica (**Figura 3**), tal y como demuestran los experimentos de cromatografía de filtración en gel y de ultracentrifugación analítica. En la estructura se observan dos dominios, conservados en proteínas análogas superiores. Tanto el dominio N-terminal como C-terminal adoptan una estructura tipo Rossman, que está formada por una lámina beta central rodeada por hélices alfa en ambos lados. Esta estructura constituye un típico ejemplo



de plegamiento tipo GT-B. La proteína presenta cuatro puentes disulfuro conservados, dos en cada dominio (**Figura 3**).

Basándose en las estructuras observadas y en estudios de mutagénesis dirigida sobre varios aminoácidos del centro activo, se propone al residuo Arg240 como clave en la unión y catálisis del sustrato (*Lira-Navarrete, 2011*).



**Figura 3.** Estructura de CePOFUT1. A) Estructura cristalina de la proteína en complejo con GDP-Fucosa. B) Representación de la superficie de CePOFUT1, coloreada según el grado de conservación con la secuencia (de rosa (100% de identidad) a gris (menos del 50%)) (*Lira-Navarrete, 2011*).

### Búsqueda de compuestos inhibidores frente a PoFUT1.

La vía de señalización Notch es esencial para el desarrollo en animales y sus defectos están involucrados en una serie de enfermedades humanas (*Jundt, 2008*), (*Pancewicz, 2010*). Algunas de estas enfermedades tales como el Síndrome de Alagille o la Disostosis Espondilocostal se presentan en la etapa de desarrollo. Otras enfermedades como CADASIL, esclerosis múltiple y algunos tipos de cáncer como la



leucemia linfoblástica aguda (T-ALL) se presentan en la edad adulta. Algunos autores señalan que se han detectado mutaciones en el receptor Notch1 en más del 50% de pacientes con este tipo de cáncer (*Weng, 2004*).

En este proyecto se propone la búsqueda de compuestos inhibidores frente a CePOFUT1 por dos motivos: es una enzima con una identidad del 100% con respecto a la humana a nivel del sitio activo, y además, hemos conseguido expresarla en grandes cantidades cosa que no sucede con la proteína humana. Como se ha comentado anteriormente, la O-fucosilación que realiza el enzima PoFUT1 sobre los motivos EGF de Notch es esencial para su funcionalidad, siendo de especial relevancia en su plegamiento y en las interacciones de Notch con sus ligandos. Por tanto, un compuesto inhibidor de la actividad fucosiltransferasa de PoFUT1 permitiría el control del mecanismo de O-fucosilación sobre el sustrato Notch y por tanto de la vía de señalización Notch.

Hasta la fecha no se han descrito compuestos inhibidores de esta fucosiltransferasa, por lo que este trabajo resulta ser novedoso y con una gran proyección al ser el punto de partida en la búsqueda de fármacos contra muy diversas enfermedades, entre las que se encuentran diferentes tipos de cáncer. Además estos inhibidores podrán ayudar a estudiar el papel de la O-fucosilación en distintas etapas del desarrollo embrionario y en distintas condiciones fisiológicas.



## **Objetivos**



## Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el de proponer compuestos que actúen como inhibidores de la actividad fucosiltransferasa de la proteína CePOFUT1.

Por ello, los objetivos concretos que se plantean son:

- Realizar un cribado masivo de compuestos orgánicos en busca de posibles inhibidores contra la actividad de la proteína PoFUT1 de *Caenorhabditis elegans*.
- Determinar las constantes de unión de los ligandos a CePOFUT1.
- Cristalizar la proteína con los inhibidores que resulten positivos.

**Estrategia experimental**



## Estrategia experimental.

Para alcanzar los objetivos que se han planteado, se propone la siguiente estrategia experimental:

- El cribado de compuestos se realizará sobre la proteína PoFUT1 de *C.elegans*. La proteína CePOFUT1 tiene una gran identidad con su análoga humana. Sin embargo, tanto ésta última como análogas en otros organismos no se han conseguido cristalizar. Por ese motivo se propone la proteína de la especie *C.elegans* como punto de partida en la búsqueda de inhibidores. Este cribado se realizará utilizando la quimioteca comercial Maybridge Hit-Finder (Maybridge).
- Para determinar la unión de los inhibidores a la proteína se utilizarán diferentes técnicas biofísicas, como son la calorimetría por titulación isotérmica (ITC), dicroísmo circular (DC) o resonancia magnética nuclear (NMR).
- La cristalización se realizará utilizando la técnica de cocrystalización con gota sentada. Con la resolución de las estructuras tridimensionales obtenidas a partir de esta técnica, se podrán estudiar las interacciones existentes entre los diferentes compuestos y la proteína. De esta manera podrán proponerse modificaciones en la estructura de los compuestos para mejorar su actividad inhibitoria.

## **Materiales y métodos**



## Materiales y métodos.

### Expresión y purificación de CePOFUT1.

En trabajos anteriores del grupo de investigación se obtuvo el clon pPICZ $\alpha$ A-*cepofut1*, y se transformó en la cepa X33 de *Pichia Pastoris* (Lira-Navarrete, 2011). Esta construcción, facilitada por el grupo, se utilizó para la expresión y purificación de CePOFUT1. Se creció una colonia en 100 ml de medio BMGY (1% (w/v) extracto de levadura, 2% (w/v) peptona, 100 mM de fosfato de potasio a pH 6, 1,34% (w/v) base de levadura nitrogenada (medio YNB) y 1% (v/v) glicerol). Se inocularon 50 ml de ese pre-cultivo en 500 ml de medio BMGY, dejándolo crecer durante la noche a 30°C con agitación. Se indujo la expresión a una temperatura de entre 18 y 22 °C, cambiando el medio de las células al medio BMMY rico en metanol. Para ello se centrifugaron las células a 10.000 g durante quince minutos y se re suspendieron en 500 ml de medio BMMY (1% (w/v) extracto de levadura, 2%(w/v) peptona, 100 mM de fosfato de potasio a pH 6, 1.34% (w/v) base de levadura nitrogenada (medio YNB) y 1% (v/v) metanol). Las siguientes 24 y 48 horas se añadió metanol a un 1% (v/v). De nuevo se centrifugaron las células a 10.000 g durante quince minutos recogiendo esta vez el sobrenadante, donde se encontraba la proteína soluble.

El sobrenadante se filtró sucesivamente a través de filtros de 0.45 y 0.22  $\mu$ m, se concentró hasta un volumen de 50 ml aproximadamente utilizando un concentrador Pellicon XL (10.000 MWCO, membrana PES, Millipore) y se dializó en una solución 25 mM TRIS a pH 8.5. La muestra se purificó por cromatografía de afinidad en una columna de 5 ml HiTrap Blue Sepharose (Amersham Bioscience) previamente equilibrada con diez volúmenes de columna de una solución 25 mM TRIS a pH 8.5. Posteriormente, se lavó la columna con diez volúmenes de la solución TRIS y se eluyó la proteína con un gradiente de solución NaCl entre 0 y 1M recogiendo fracciones de 3 mililitros. Se verificó la expresión con un gel SDS-Page al 10%. Se dializó en una solución 25 mM TRIS, 150 mM NaCl a pH 8.5. Se concentró hasta un volumen de



aproximadamente 1,5 mililitros utilizando centricones de 10.000 MWCO (Millipore) y se inyectó la solución proteica en una columna de exclusión molecular previamente equilibrada con la solución 25 mM TRIS, 150 mM NaCl a pH 8.5. La proteína eluyó transcurridos 120 mililitros aproximadamente, se dializó en una solución 25 mM TRIS a pH 8.5 y se concentraron hasta alcanzar los 70 mg/ml. La cuantificación de la proteína se realizó en un espectrofotómetro realizando la medida de absorbancia a 280 nm. Se alicuotó la proteína obtenida en tubo eppendorf de 1.5 mililitros para su posterior almacenaje a -80°C.

### **Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE).**

Se realizaron geles de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS para el seguimiento de la expresión y purificación de la proteína silvestre CePOFUT1. En todos los casos, se utilizó un porcentaje de acrilamida del 10%. Tras la polimerización del gel separador (2.42 ml de H<sub>2</sub>O, 1.25 ml de Acrilamida al 40%, 1.25 ml de TRIS 1.5 M pH 8.8, 25 µl de SDS 20%, 50 µl de APS 10%, 5 µl de TEMED), se añade sobre él el gel de apilamiento (4.4 ml de H<sub>2</sub>O, 250 µl de Acrilamida al 40%, 312 µl de TRIS 1.5 M pH 6.8, 12.5 µl de SDS 20%, 25 µl de APS 10%, 2.5 µl de TEMED). Las diferentes muestras se desnaturalizan a 100 °C durante 5 minutos en presencia de solución de carga (50 mM en TRIS pH 6.8, 2% en SDS, 10% en glicerol, 1% de β-mercaptoetanol, 12.5 mM en EDTA, 0.02% en azul de bromofenol).

La electroforesis se llevó a cabo en un tanque de electroforesis de Bio-Rad con una intensidad de corriente de 100 eV durante dos horas y media aproximadamente.

### **Cribado Masivo (High throughput screening).**

Para realizar estos experimentos se utilizan quimiotecas comerciales. Las quimiotecas son una colección de compuestos orgánicos que han resultado ser



principios activos farmacológicos y que responden a la regla de cinco de Lipinski (*Lipinski, 1997*).

Esta regla permite evaluar cualitativamente la adecuación de un compuesto químico para su uso farmacológico o actividad biológica. Describe las propiedades moleculares que pueden tener importancia farmacocinética en el cuerpo humano, a saber absorción, distribución, metabolismo y excreción. La regla dice que ningún compuesto activo para consumo oral puede violar más de una de las siguientes consideraciones:

- 1) No debe contener más de cinco donantes de enlaces por puentes de hidrógeno.
- 2) No debe contener más de diez aceptores de enlaces por puentes de hidrógeno.
- 3) Debe poseer un peso molecular inferior a 500 u.m.a.
- 4) Debe poseer un coeficiente de reparto octanol-agua ( $\log P$ ) inferior a  $5^3$ .

Para el cribado masivo se utilizó la quimioteca Maybridge Hit-Finder (Maybridge), la cual se presenta en 125 placas de 96 pocillos, con 80 compuestos por placa lo que hace un total de 10.000 compuestos. Todos los compuestos se encuentran disueltos en 100% de DMSO a una concentración inicial de 4 mM. Los experimentos se realizaron en un fluorímetro FluoDia T70 (Photal Otuska Electronics) (*Cummings, 2006*).

La técnica utilizada es la fluorescencia con rampa de temperatura y se basa en la desnaturalización de la proteína, registrando la señal de fluorescencia que se obtiene por la interacción de un fluoróforo con la proteína al desnaturalizarse. El fluoróforo es un compuesto altamente hidrófobo, por lo que tiene cierta afinidad por zonas hidrófobas que van quedando expuestas conforme la proteína se desnaturaliza al aumentar la temperatura en el experimento. En este experimento se observa la temperatura característica de cada proteína donde la mitad de la población de la misma se encuentra en estado nativo y la otra mitad desnaturalizado (**T<sub>m</sub>**).

Una vez determinada esta temperatura, se estudia la mezcla compuesta por la proteína, el fluoróforo y uno o varios compuestos inhibidores. Si uno de los





compuestos resulta tener afinidad por la proteína observaremos una estabilización en la  $T_m$ , es decir, un desplazamiento hacia la derecha en el eje de ordenadas.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en una solución de 20 mM de HEPES, 200 mM de NaCl a pH 7 y se utilizó el fluoróforo ANS en una concentración de 100  $\mu$ M. Una solución de proteína 20  $\mu$ M en presencia de un 6% de DMSO en un volumen final de 100  $\mu$ l se utilizó como control en cada una de las placas. Estos controles se colocaban en la fila número uno de las placas de 96 pocillos. Posteriormente, soluciones de 20  $\mu$ M de proteína se pipetearon en todos los pocillos con excepción de la fila número doce que quedaba vacía. A continuación, se pipetearon 2  $\mu$ l de compuesto en cada pocillo, poniendo un total de 3 compuestos por pocillo. La concentración final de cada compuesto es de 80  $\mu$ M. Las rampas de temperatura se establecieron entre los 20 y los 70  $^{\circ}$ C.

De cada experimento de fluorescencia derivan 88 curvas de fluorescencia, donde el eje X representa la temperatura en grados centígrados ( $^{\circ}$ C) y el eje Y representa la señal de fluorescencia. Cada placa se analizó con el programa PRISMA ajustando los datos a una función de Boltzman según:

$$y = \left( A + B \left( \frac{B-A}{1 + \frac{\exp(T_m - x)}{C}} \right) \right)$$

**Ecuación 1.** Ajuste sigmoidal de Boltzman. Los parámetros A y B corresponden al valor mínimo y máximo de señal; C al valor de la pendiente.

Además, se utilizó la aplicación de Excel “Excel script for DSF” para analizar todos los datos de una placa al mismo tiempo (<http://thermofluor.org/resources/DSF-Analysis-Manual-v3.0.pdf>).

### Dicroísmo circular.

Esta técnica permite medir la desviación de un plano de la luz elípticamente polarizada al incidir sobre los diferentes centros quirales de la muestra. Se obtienen



gráficas de elipticidad versus longitud de onda o bien, fijando un valor de longitud de onda y variando la temperatura, elipticidad versus temperatura.

Podemos entonces aplicar una rampa de temperatura a la muestra y obtener un valor de temperatura  $T_m$  característico. En presencia de un compuesto inhibidor, se producirá un desplazamiento en la  $T_m$  análogo a la fluorescencia con rampa de temperatura. Todos los experimentos se realizaron en un Applied Phophysics Chrioscan.

Se realizaron experimentos con esta técnica para los ocho compuestos seleccionados con el cribado. La línea base se realizó con un blanco de 20 mM en HEPES y 200 mM en NaCl a pH 7, que se utilizó en el resto de experimentos como solución madre. A continuación, se realizaron los espectros en la región de ultravioleta lejano, correspondientes a la proteína a una concentración 20  $\mu\text{M}$  y a la proteína a esa misma concentración con un 2.5% en DMSO. Los máximos de la señal se obtuvieron a 220 nm y 228 nm respectivamente.

Una vez fijada la longitud de onda en 228 nm, se realizaron las curvas de desnaturalización para los compuestos seleccionados a una concentración de 250  $\mu\text{M}$  y un volumen final de 100  $\mu\text{l}$ . Como control se estableció la curva de desnaturalización correspondiente a la proteína silvestre en presencia de 2.5% de DMSO. Las rampas de temperatura se establecieron entre los 20 y los 70  $^{\circ}\text{C}$ .

Los análisis de las curvas obtenidas se realizaron con el programa ORIGIN versión 7, ajustando los datos a una función sigmoïdal de Boltzman (**Ecuación 1**).

### **Saturation-Transferred-Difference (STD).**

Este método se fundamenta en la técnica de la resonancia magnética nuclear (NMR), más concretamente en el Efecto Overhauser Nuclear (NOE). Se basa en un fenómeno de interacción dipolo-dipolo que provoca lo que se denomina una relajación cruzada entre dos espines cercanos en el espacio. Por tanto, se puede establecer relaciones entre átomos situados próximos en el espacio.



El método de Saturation-Transferred-Difference (STD) está basado en el efecto transferred NOE (trNOE). En este método, se satura el ligando que se encuentra unido a la proteína cuando se irradia selectivamente a la misma (*Meyer, 2003*), (*Mayer, 1999*), (*Lepre, 2004*).

Al saturar la proteína, todo aquel ligando que esté unido a su centro activo y posteriormente se intercambie, también se satura debido al efecto trNOE. Mientras se produce el intercambio, la molécula saturada se desplaza a la disolución, donde es detectada. Al sustraer este espectro de uno de referencia en el que no se haya irradiado la proteína, obtendremos un espectro diferencial en el que sólo observaremos las señales correspondientes a los átomos que se unan al centro activo de la proteína.

Para realizar este experimento era necesario un compuesto totalmente soluble en las condiciones de trabajo, y que fuera positivo en el experimento de fluorescencia con rampa de temperatura. Utilizando esos criterios se seleccionó un compuesto. En las condiciones en las que se realizaron las diferentes medidas la proteína se encontraba a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  y el compuesto seleccionado a 1 mM, disueltos en tampón fosfato a pH 8 en agua deuterada. Se realizaron diferentes experimentos a 0.5, 2 y 4 segundos de saturación de la proteína. El instrumento fue un BRUKER de 400MHz con una sonda directa BBO.

Estos experimentos se llevaron a cabo bajo la supervisión del técnico en resonancia magnética nuclear de la Universidad de Zaragoza Iñaki Delso.

### **Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).**

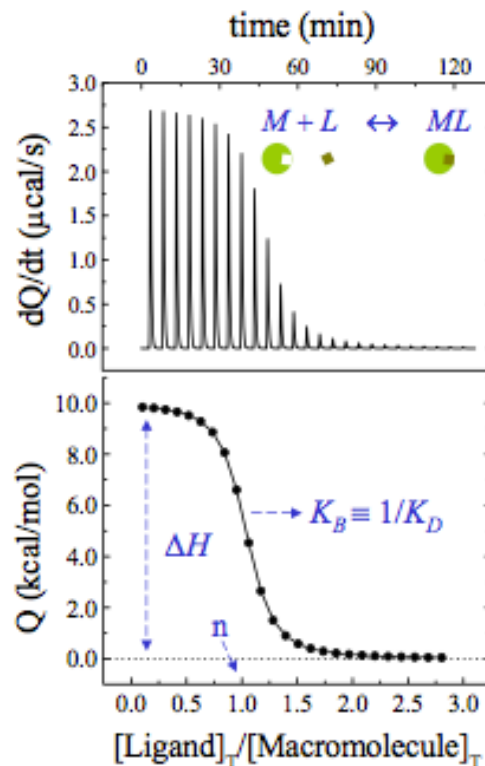
Dentro de la calorimetría podemos distinguir varias técnicas. Sin embargo, es la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) la que más comúnmente se utiliza en los estudios de asociación/disociación de ligandos con macromoléculas.

El procedimiento se basa en una serie de inyecciones del ligando sobre la macromolécula, que provocarán absorción o desprendimiento de calor debido a la



interacción entre ellos. Como el nombre de la técnica indica, se precisa que el procedimiento sea isotérmico, por lo que el mecanismo aportará o retirará energía para mantener la temperatura constante en el aparato.

Se mide la cantidad de energía en  $\mu\text{cal/s}$  necesarias para mantener constante la diferencia de temperatura entre la muestra y la celda de referencia. El perfil de una curva obtenida con un experimento de ITC es el que se observa en la **Figura 4**. Se trata de un perfil tipo sigmoidal en el que se observa un punto de inflexión que coincide con el ratio molar ( $n$ ). Este parámetro representa la estequiometría del complejo formado entre la proteína y el ligando. Además se observan otros parámetros como la constante de asociación ( $K_B$ ) y la variación de entalpía ( $\Delta H$ ), que se pueden obtener directamente de un solo experimento. El procesamiento de los datos consiste en la integración del área de cada uno de los picos (Velazquez-Campoy, 2004).



**Figura 4.** Figura representativa de un experimento de ITC.



Los experimentos fueron llevados a cabo a 25 °C con una concentración de CePOFUT1 de 20 µM, y con concentraciones de los distintos inhibidores entre 500 µM y 1 mM en soluciones 25 mM TRIS pH 8.5 o bien PBS a pH 7. Todas las muestras fueron preparadas al 5% de DMSO.

El instrumento utilizado fue un AUTO ITC Microcal Auto.iTC<sub>200</sub>. El análisis de los datos se realizó con el programa de ajuste ORIGIN-ITC (Microcal) utilizando un modelo de ajuste de un sitio de unión.

### **Cristalización de compuestos con la proteína silvestre.**

Con los resultados obtenidos en los experimentos de ITC, se seleccionaron varios compuestos. Estos compuestos se cocrystalizaron con CePOFUT1. La técnica escogida para la cristalización fue la de gota sentada a temperatura constante de 18°C. Una vez terminadas las placas de cristalización éstas se instalaron en un aparato de toma de imágenes automatizado Rock imager de Formulatrix. Dicho aparato fue programado para la toma de imágenes de todos los pocillos de las placas durante un periodo de 21 días.

Para la obtención de los cristales se realizaron dos tipos de procedimientos:

- CePOFUT1 a 30 mg/ml en una solución de 25 mM TRIS pH 8.5 se incubó con 2 mM de cada uno de los compuestos por separado. La solución de cristalización contenía 100 mM HEPES a pH entre 7 y 8, PEG 3350 entre 12% y el 24% y MgCl<sub>2</sub> constante a 50 mM (*Lira-Navarrete, 2011*).
- CePOFUT1 a 30 µM con 500 µM de los diferentes compuestos en 25 mM de TRIS pH 8.5 en un volumen final de 500 µl se incubó durante dos horas a 4°C con rotación. Posteriormente se concentraron las soluciones hasta que la proteína alcanzó la concentración de 30 mg/ml. Esa fue la solución que se colocó en la placa de cristalización, junto a la solución madre de idénticas características a la del apartado anterior.

## **Resultados**



## Resultados.

### Cribado masivo de compuestos

Se realizó el cribado masivo de compuestos de la quimioteca HitFinder de Maybridge utilizando varios experimentos de fluorescencia con rampa de temperatura (*Ver Materiales y Métodos*). De cada uno de los experimentos derivaron 88 curvas de desnaturalización. Ocho debidas a los controles y 80 debidas a los experimentos con los posibles inhibidores. Con los ocho controles se determinó la  $T_m$  media de la proteína silvestre en esas condiciones, siendo aproximadamente  $T_m=48.5$  °C en todos los experimentos y la desviación estándar correspondiente ( $\sigma$ ) (*Ver Materiales y Métodos*). Se obtuvieron una serie de temperaturas características ( $T_m$ ) para cada curva. Posteriormente, se establecieron las variaciones de  $T_m$  ( $\Delta T_m$ ) para cada pocillo según:

$$\Delta T_m = T_{m_{\text{pozo}}} - T_{m_{\text{control}}}$$

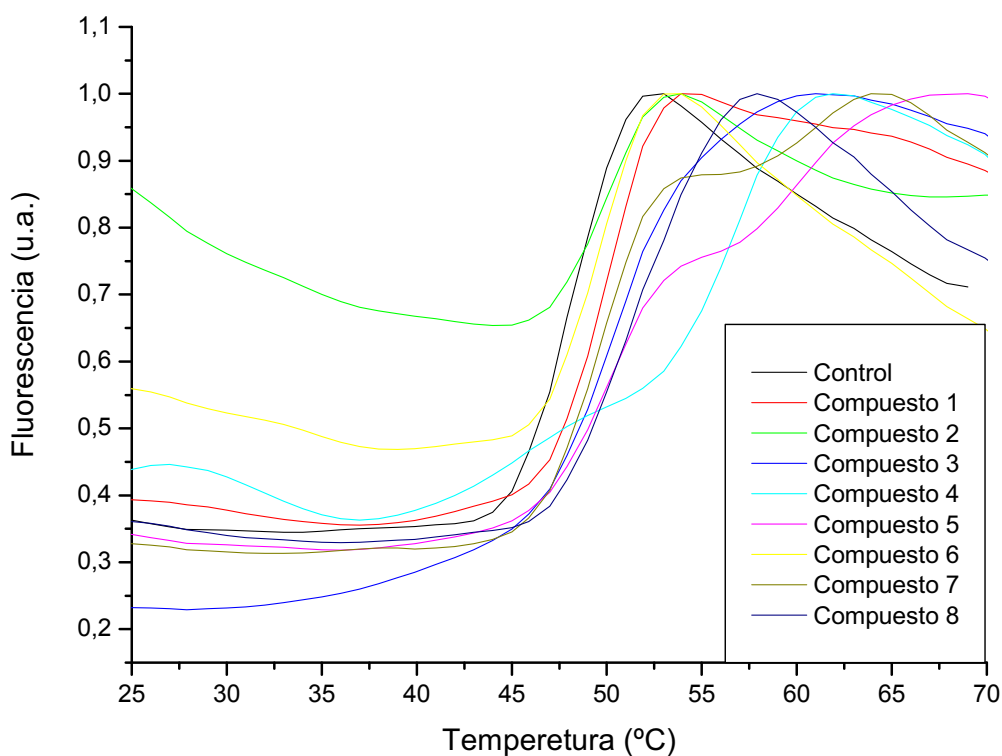
**Ecuación 2.** Cálculo de la variación de  $T_m$  para cada pozo de la placa de 96 pocillos. Se estableció como referencia la  $T_m$  media de los controles de cada placa en cada experimento.

Se consideraron positivos aquellos pocillos en los que la variación de  $T_m$  (**Ecuación 2**) era superior a dos grados centígrados a la  $T_m$  media del control más tres veces su desviación estándar:

$$\Delta T_m \geq 2 + T_{m_{\text{control}}} + 3 \cdot \sigma$$

**Ecuación 3.** Cálculo de la variación de  $T_m$  con la que se consideraron los compuestos como positivos. Se estableció como referencia la  $T_m$  media de los controles de cada placa en cada experimento.

Con este criterio se establecieron ocho positivos\*, de los que se obtuvieron las siguientes curvas de desnaturalización:



**Figura 5.** Curvas de desnaturalización térmica de los compuestos positivos según la variación de la señal de fluorescencia. Se observa el desplazamiento de la  $T_m$  de estos con respecto al control (negro).

	$\Delta T_m$ Fluorescencia (°C)
Compuesto 1	2.7±0.06
Compuesto 2	5.7±0.08
Compuesto 3	2.2±0.06
Compuesto 4	7.7±0.09
Compuesto 5	3.6±0.09
Compuesto 6	2.1±0.07
Compuesto 7	2.7±0.09
Compuesto 8	3.2±0.08

**Tabla 1.** Valores de las variaciones de  $T_m$  ( $\Delta T_m$ ) para los compuestos positivos y su desviación estándar ( $\sigma$ ). Estos cálculos se realizaron utilizando las Ecuación 2 y Ecuación 3.





Los datos recogidos en la **Tabla 1** son los correspondientes a los obtenidos a partir de los ajustes matemáticos de las curvas de la **Figura 5**. Visualmente se observa que los distintos desplazamientos de los compuestos respecto a la curva control corresponden a los datos obtenidos de sus respectivos ajustes matemáticos, a excepción del compuesto 2. La variación de temperatura ( $\Delta T_m$ ) obtenida para este compuesto es de 5,7 °C, aunque no se aprecia que la curva de desnaturalización se desplace esa magnitud. El perfil de la curva también se observa diferente, por lo que puede deducirse que el ajuste matemático es erróneo y pueda tratarse de un artefacto. Por otro lado, los datos obtenidos en el ajuste de los compuestos 4, 5 y 7 presentan una desviación estándar ligeramente elevada debido a una forma anómala de la curva de desnaturalización.

De este experimento tan sólo podemos deducir que los compuestos estabilizan de algún modo la estructura proteica. Normalmente esta estabilización se produce mediante la unión del sustrato o compuesto a alguna zona hidrofóbica de la proteína. Además, al tratarse de compuestos altamente hidrofóbicos, queda favorecido el factor entrópico de la unión entre el ligando y la proteína ya que el ligando interaccionará preferentemente en el bolsillo hidrofóbico de cualquier proteína, por lo que este tipo de cribados puede aportar falsos positivos.

Por este motivo, los resultados de este apartado han de corroborarse con otras técnicas biofísicas y mediante ensayos enzimáticos que analicen la capacidad inhibitoria del compuesto sobre la actividad de la proteína.

*\*Las estructuras de los compuestos no van a ser mostradas en este trabajo, ya que se está estudiando la posibilidad de establecer una patente una vez terminados los estudios pertinentes.*

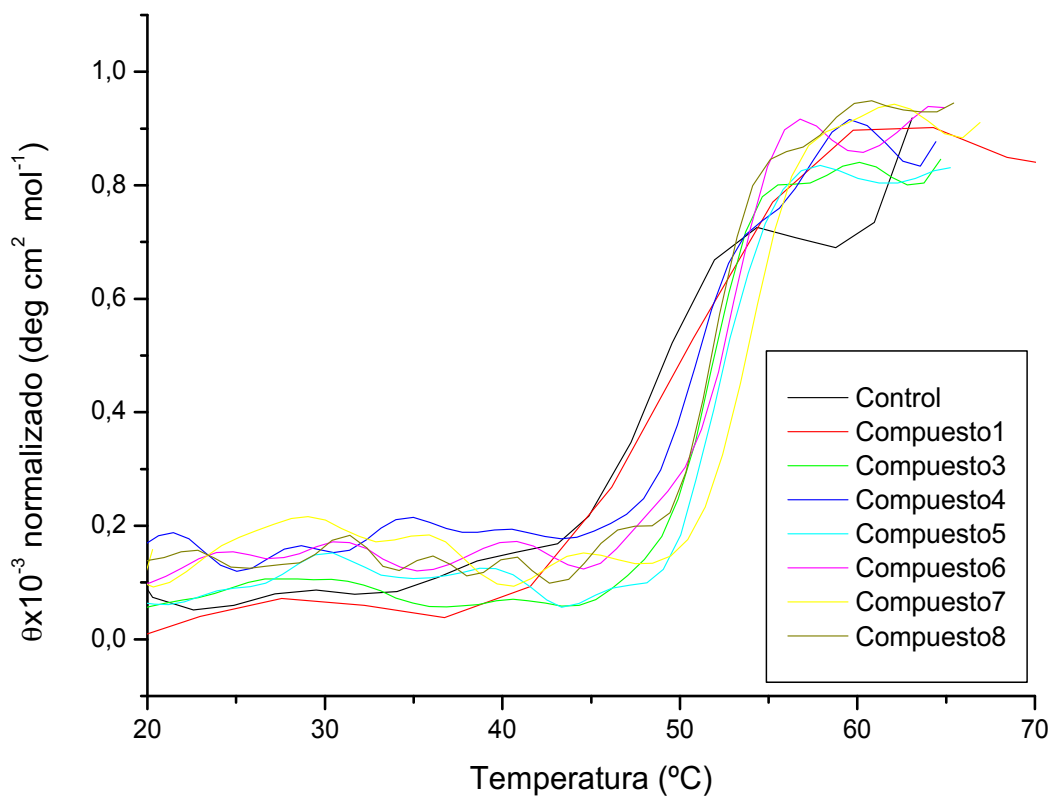


### Caracterización biofísica de la unión.

Una vez que se establecieron los ocho compuestos como posibles inhibidores, se propuso caracterizar en más detalle la unión de estos compuestos a la proteína a través de varias técnicas.

#### *Dicroísmo circular*

Se empleó la técnica de dicroísmo circular para verificar la interacción entre los compuestos y la proteína silvestre. Se realizaron curvas de desnaturalización térmica análogamente al método empleado en fluorescencia. Se obtuvieron curvas de desnaturalización que mostraban la misma tendencia que las obtenidas por fluorescencia en la mayoría de los casos.



**Figura 6.** Curvas de desnaturalización térmica de los compuestos positivos según la variación de la señal de dicroísmo circular. Se observa el desplazamiento de la Tm de estos con respecto al control (negro).



	$\Delta T_m$ Fluorescencia (°C)	$\Delta T_m$ Dicroísmo circular (°C)
Compuesto 1	2.7±0.06	-0.3±0.6
Compuesto 2	5.7±0.08	na*
Compuesto 3	2.2±0.06	1.5±0.23
Compuesto 4	7.7±0.06	1.2±0.45
Compuesto 5	3.6±0.07	2.2±0.26
Compuesto 6	2.1±0.07	0.3±0.29
Compuesto 7	2.7±0.06	3.9±0.24
Compuesto 8	3.2±0.08	1.9±0.08

**Tabla 2.** Relación de las variaciones de temperatura ( $\Delta T_m$ ) calculadas según la señal de fluorescencia y de dicroísmo circular y su correspondiente desviación estándar ( $\sigma$ ). En ambos casos estos cálculos se realizaron utilizando Ecuación 2 y Ecuación 3.

\*na: Los datos obtenidos no se pudieron ajustar al modelo.

Con esta serie de experimentos se procuró confirmar la veracidad de los datos obtenidos con fluorescencia con rampa de temperatura. Aunque el fenómeno que se va a observar es el mismo, el desplazamiento de la temperatura  $T_m$  con respecto a un control, las propiedades físicas que lo provocan son diferentes. De esta manera, se pudieron examinar la existencia de artefactos.

Como puede observarse en el apartado “**Materiales y métodos**” las concentraciones de compuesto utilizadas en las técnicas de fluorescencia y dicroísmo circular son diferentes. El motivo es que la concentración de compuesto utilizada en ambos casos implica un porcentaje de DMSO en la muestra final. La cantidad de DMSO que la muestra admite varía según la técnica utilizada y, en este caso, los espectros



obtenidos con 5% DMSO en dicróismo circular no eran aceptables. Por ese motivo se decidió realizar los experimentos a una concentración de 250  $\mu$ M de compuesto, lo que implica un 2,5% DMSO final. De esta manera los datos entre ambas técnicas podrán compararse cualitativamente, aunque no cuantitativamente.

La **Figura 6** corresponde a las curvas de desnaturalización obtenidas para cada compuesto, cuyo posterior ajuste matemático resulta en los datos recogidos en la **Tabla 2**. En esta tabla se observa como la tendencia en el desplazamiento es la misma en los **compuestos 3,4,5,6,7 y 8** para ambas técnicas. No ocurre lo mismo con los **compuestos 1 y 2**, donde el primero no presenta desplazamiento alguno en dicróismo circular y los datos obtenidos por el segundo no correspondieron a una curva de desnaturalización térmica. También se observa una diferencia muy grande entre el desplazamiento producido por el compuesto 4 en fluorescencia y el producido en dicróismo circular.

#### ***Calorimetría de titulación isotérmica.***

Una vez establecido que existía una interacción entre estos ocho compuestos y la proteína silvestre CePOFUT1, se propuso cuantificar esa interacción con la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Esta técnica permite calcular en un solo experimento diversos parámetros termodinámicos, entre ellos la constante de asociación entre el ligando y la proteína. Además, se pueden establecer otros parámetros como la variación de entalpía o entropía, parámetros que nos permiten analizar el comportamiento y la tipología de la unión entre el compuesto y la proteína.

De los ocho compuestos con los que se iniciaron los ensayos de calorimetría, tan sólo los **compuestos 3, 6, 7 y 8** resultaron interesantes al tener una constante de disociación del complejo del orden micromolar (**Tabla 3**). El resto de los compuestos presentaron constantes de disociación mayores. Además, el **compuesto 3** resultó ser el único compuesto totalmente soluble en las condiciones de trabajo.

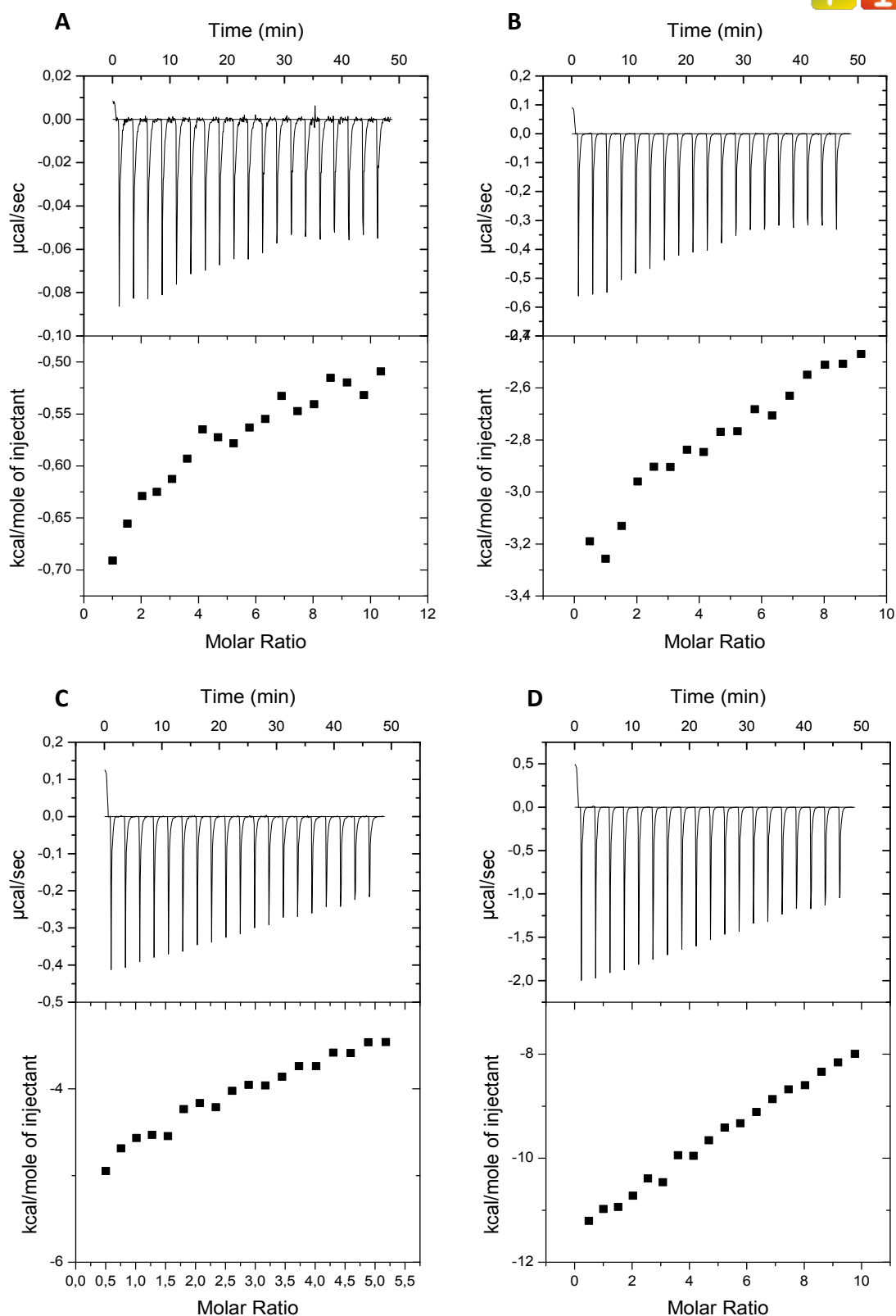


	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )
Compuesto 3	82.2
Compuesto 6	93.4
Compuesto 7	109.9
Compuesto 8	758.6

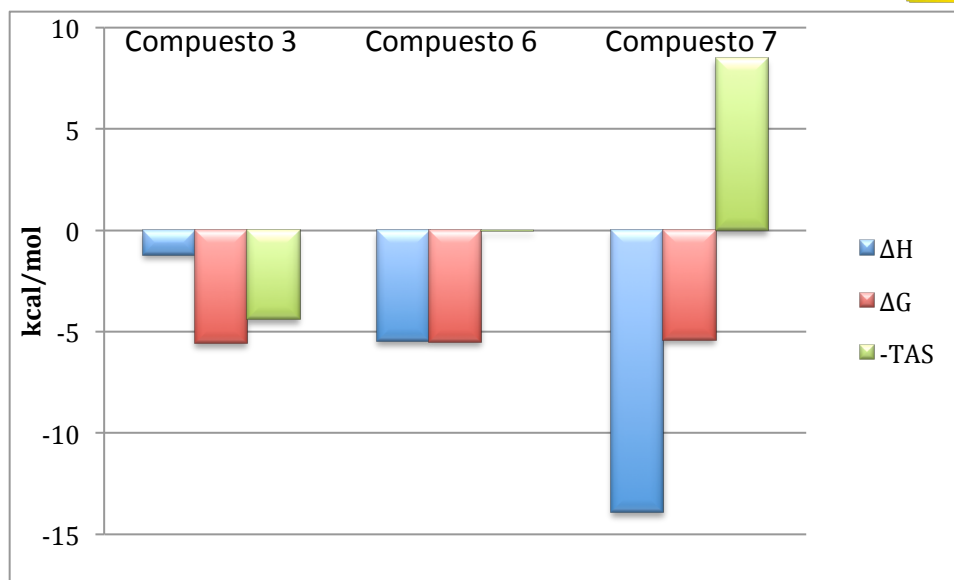
**Tabla 3.** Valores de las constantes de disociación obtenidas a partir de los experimentos de calorimetría de titulación isotérmica.

Según los datos recogidos en la **Tabla 3**, se verificó que existía interacción entre los **compuestos 3, 6, 7 y 8** y la proteína. Además se dedujo que el **compuesto 3** es el compuesto que presenta una unión más fuerte con la proteína ya que tiene la constante de disociación menor. Sin embargo, ninguno de los compuestos presentan una unión fuerte sino más bien débil. Este hecho es habitual en los cribados masivos de compuestos, ya que es tan solo un punto de partida en la búsqueda de fármacos selectivos contra la proteína diana.

La **Figura 7** corresponde a los datos obtenidos en los diferentes experimentos de ITC para los **compuestos 3, 6, 7 y 8**. En ninguno de los casos se observó que las titulaciones alcanzaran saturación de la proteína por parte del ligando. Este hecho concuerda con las constantes de disociación observadas (**Tabla 3**). Tal y como se explicó en el apartado “**Materiales y métodos, Figura 4**”, un perfil típico de unión entre proteína y ligando posee un punto de inflexión correspondiente al ratio molar (n) que, en este caso, se intuye que debe ser igual a uno. Sin embargo, en la **Figura 7** se observa un valor de n alejado de uno. Esto se debe a que, al ser la unión débil entre la proteína y los compuestos, el perfil de las curvas carece de punto de inflexión, por lo que esta magnitud no responde a la realidad.



**Figura 7.** Gráficas correspondientes a los experimentos de ITC. Se observan los picos debidos a las inyecciones de ligando sobre la proteína, así como los valores de las áreas de dichos picos que permiten el cálculo de las constantes termodinámicas. Todos los experimentos se realizaron con 20 µM en CePOFUT1 A) El compuesto 3 a 1 mM en 25 mM TRIS pH 8.5. B) El compuesto 6 a 1 mM en PBS a pH 7. C) El compuesto 7 a 0.5 mM en PBS a pH 7. D) El compuesto 8 a 1 mM en PBS a pH 7.



**Figura 8.** Parámetros termodinámicos encontrados para los compuestos 3, 6 y 7. El valor de variación de entalpía ( $\Delta H$ ) se derivó de los experimentos de ITC, mientras que la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) y la variación de entropía ( $\Delta S$ ) se calcularon según:  $K_{eq} = e^{-\Delta H/RT}$ ;  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ .

De los datos correspondientes a la variación de entalpía ( $\Delta H$ ) obtenidos en los experimentos de ITC para los **compuestos 3, 6 y 7** se calcularon los parámetros termodinámicos de variación de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) y variación de entropía ( $\Delta S$ ). Los resultados se observan en la **figura 8**. Los datos de  $\Delta H$  obtenidos para el **compuesto 8** no hicieron posible el cálculo de los parámetros termodinámicos, ya que resultaron anómalamente elevados.

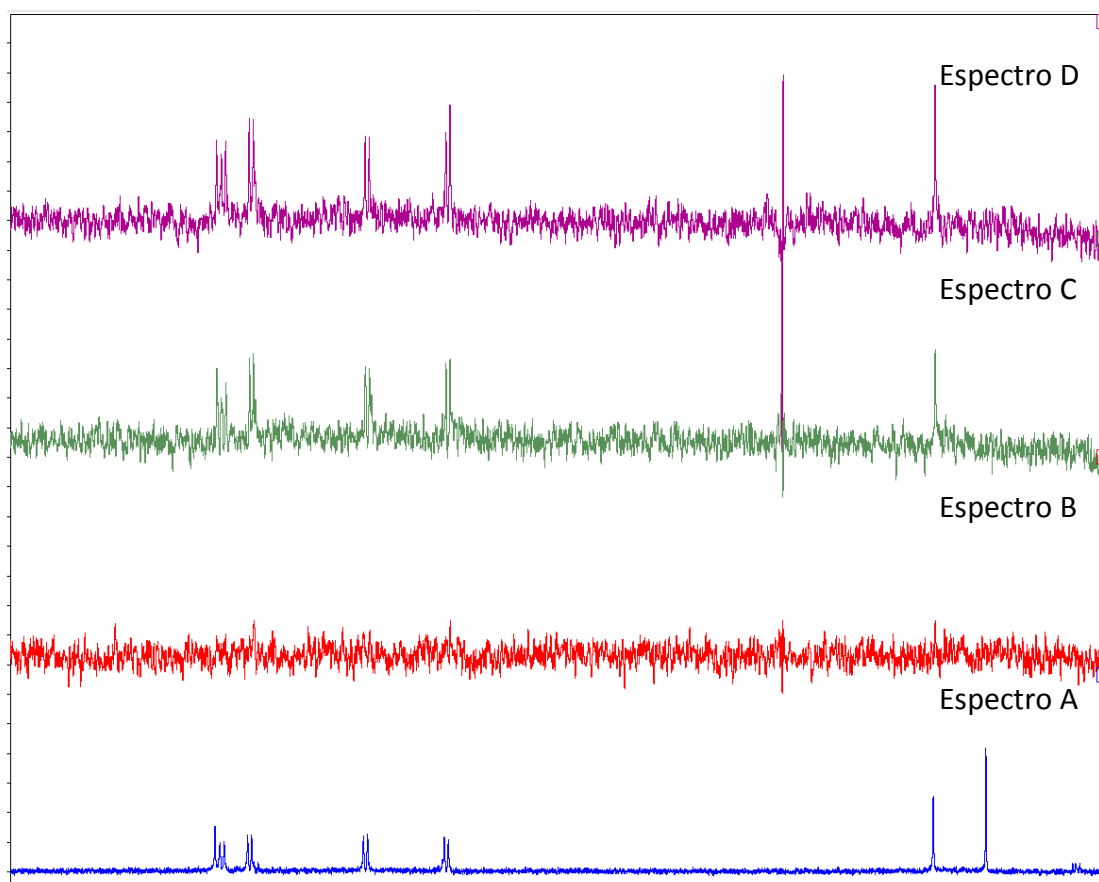
En los tres casos observamos reacciones exergónicas ( $\Delta G < 0$ ) y por tanto favorables espontáneamente. Sin embargo, los motivos varían para los diferentes compuestos. En el caso del **compuesto 3**, tanto el factor entálpico como el entrópico de la unión favorecen la reacción teniendo éste último más peso. Por tanto, se deduce que existen interacciones específicas entre el ligando y la proteína, pero el carácter hidrofóbico del ligando dirige la interacción entre ambos. En el **compuesto 6** sucede algo semejante, siendo en esta ocasión el factor entálpico el más importante en la unión. Es decir, este ligando forma enlaces específicos con alguna zona de la proteína. La situación del **compuesto 7** es diferente ya que se observa un factor entrópico desfavorable, pero que se ve compensado por el fuerte factor entálpico de la reacción.



### **STD del compuesto 3**

Se escogió el **compuesto 3** para realizar este tipo de experimentos al ser el único totalmente soluble en las condiciones de trabajo y así, poder optimizar la técnica. Hasta el momento, no se han comprobado los **compuesto 6, 7 y 8** pero se está estudiando el uso de solución TRIS deuterado para minimizar los problemas de solubilidad de los mismos.

Se realizaron los experimentos según el apartado “**Materiales y Métodos**” y se obtuvieron los espectros siguientes:



**Figura 9.** Espectros STD sobre CePOFUT1 con compuesto 3. El primero de los espectros (A) corresponde al compuesto en disolución. Los espectros (B), (C) y (D) son los espectros diferenciales correspondientes a los experimentos STD obtenidos con tiempos de saturación progresivos de 0.5, 2 y 4 s respectivamente.



Estudios previos demuestran que la técnica STD puede emplearse para el estudio de las interacciones proteína ligando, así como para el cálculo de constantes de disociación (*Meyer, 2003*).

En la **Figura 9** se observan los espectros STD obtenidos a diferentes tiempos de saturación de la proteína. Se observa que, al aumentar el tiempo de saturación, las señales correspondientes al **compuesto 3** se hacen más intensas lo que indica unión entre el ligando y la proteína. De no existir dicha unión, las señales del **compuesto 3** no serían visibles a ningún tiempo de saturación. No obstante, se deduce que esta unión es débil ya que son necesarios 2 segundos de saturación para comenzar a ver las señales del ligando (*Meyer, 2003*).

Estos datos concuerdan con la constante de disociación obtenida mediante ITC para el **compuesto 3**, donde se establece una  $K_D = 82.2 \mu\text{M}$  (**Tabla 3**), valor que implica una unión moderada entre el enzima y el compuesto.

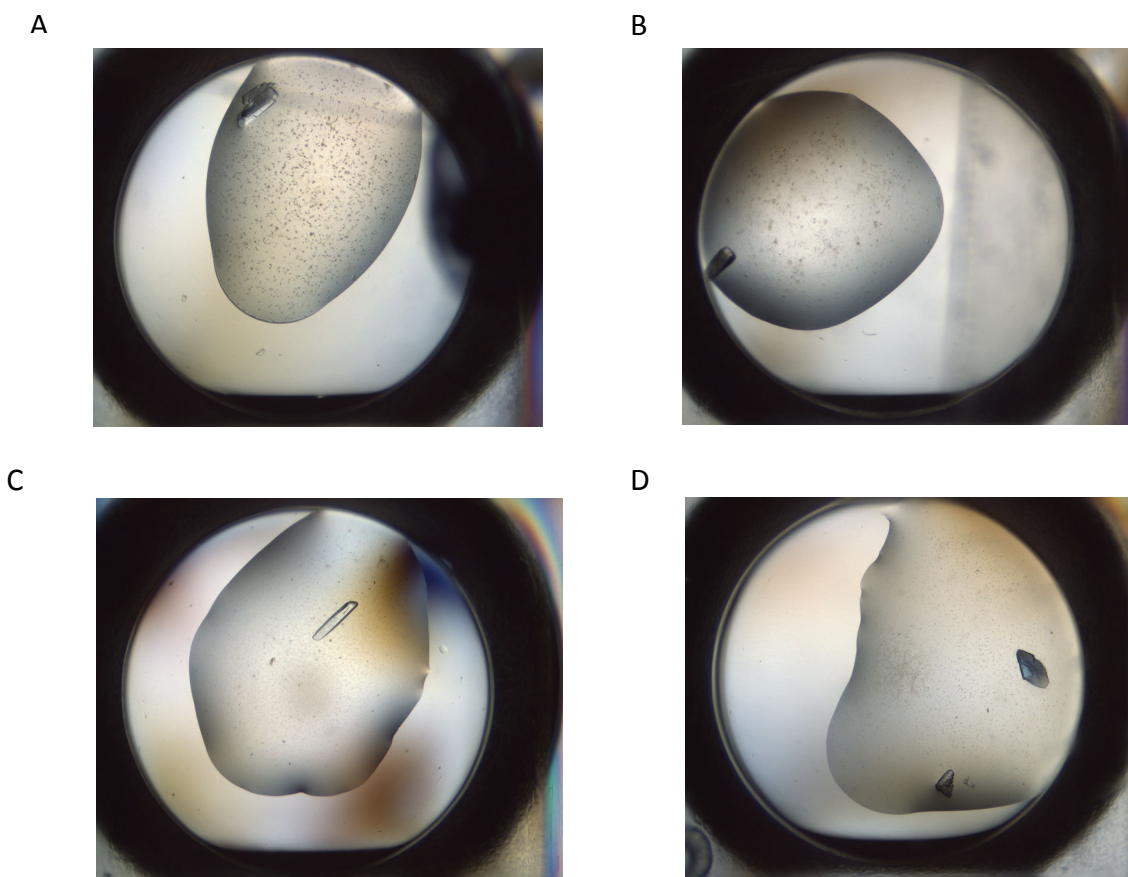
### ***Cristalización***

Con los resultados obtenidos con los experimentos de ITC se escogieron los **compuestos 3, 6, 7 y 8** para cristalizarlos con la proteína silvestre. La técnica escogida fue la de cocrisolización en la condición en la que la proteína silvestre cristalizó en trabajos anteriores (*Lira-Navarrete, 2011*). Presuponiendo que la condición en la que podían cristalizar los compuestos con la proteína podían variar con respecto a la condición inicial, se probaron condiciones cercanas a la misma. Se variaron tanto la concentración de precipitante PEG 3350 como el pH.

Se obtuvieron varios cristales con los cuatro compuestos antes nombrados en diferentes condiciones, utilizando las dos técnicas explicadas en el apartado "**Materiales y métodos**". Sin embargo, se observó que en varias de las condiciones en las que aparecieron cristales, éstos se desintegraron al paso de unos días. Este hecho puede deberse a la cantidad de DMSO que contenía la gota proveniente de la disolución original de los compuestos.



No obstante, varios cristales perduraron íntegros en el tiempo.



**Figura 10.** Cristales de CePOFUT1 con los complejos 3, 6, 7 y 8. Las condiciones utilizadas fueron:

**A:** Compuesto 3 a 2 mM en solución HEPES pH 7,5, PEG 3350 18%,  $MgCl_2$  50 mM. Técnica A descrita en "Materiales y métodos".

**B:** Compuesto 6 a 2 mM en solución HEPES pH 8, PEG 3350 16%,  $MgCl_2$  50 mM. Técnica A descrita en "Materiales y métodos".

**C:** Compuesto 7 a 2 mM en solución HEPES pH 8, PEG 3350 22%,  $MgCl_2$  50 mM. Técnica A descrita en "Materiales y métodos".

**D:** Compuesto 8 a 2 mM en solución HEPES pH 8, PEG 3350 16%,  $MgCl_2$  50 mM. Técnica B descrita en "Materiales y métodos".

En este momento se está procurando obtener datos de difracción para obtener las estructuras tridimensionales correspondientes.

**Discusión**



## Discusión

La actividad del enzima O-fucosiltransferasa 1 (PoFUT1 ) es esencial para el correcto funcionamiento de la vía de señalización Notch. Realiza una de las modificaciones post-traduccionales que sufre la proteína Notch, además de estar involucrada en su correcto plegamiento (*Bray, 2006*). Recientes estudios demuestran que defectos en esta vía están relacionados con la aparición de diferentes enfermedades, entre ellas varios tipos de cáncer como la leucemia linfoblástica aguda (T-ALL) (*Jundt, 2008*) (*Pancewicz, 2010*).

Por tanto, la elección de la proteína PoFUT1 como diana terapéutica resulta muy acertada y novedosa, al no haberse descrito hasta el momento ningún compuesto que actúe como inhibidor de esta glicosiltransferasa.

En este trabajo se han propuesto cuatro compuestos como posibles inhibidores de la actividad O-fucosiltransferasa del enzima PoFUT1 de *C.elegans*. Se ha demostrado la existencia de interacción entre dichos compuestos y la proteína mediante diferentes técnicas biofísicas como la fluorescencia, el dicróismo circular y la resonancia magnética nuclear. Además, se ha cuantificado esta unión con la técnica calorimétrica de ITC y se han obtenido cristales mediante la cocrystalización de los cuatro compuestos con la proteína.

De estos cuatro compuestos cabe destacar el **compuesto 3**. Se trata de un compuesto muy soluble, lo cual ha facilitado los estudios realizados y supone una ventaja a largo plazo con respecto a otros compuestos. Además, resulta tener la constante de disociación más baja, por lo que su unión al enzima es mayor que en los otros tres casos.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, se plantea la continuidad de la investigación en varios puntos, que se describen a continuación.

En primer lugar, la resolución de las estructuras cristalinas obtenidas en este trabajo aportará información estructural que nos permitirá estudiar las interacciones específicas que los compuestos forman con el sitio activo de la proteína, en caso de



que sea ese el lugar donde se unen. Una vez realizado este estudio, se propondrán modificaciones estructurales de los compuestos que maximicen estas interacciones y minimicen otras interacciones no específicas provocadas, por ejemplo, por los efectos de solvatación del compuesto y de este modo aumentar su afinidad.

Por otro lado, una vez optimizadas las estructuras de estos compuestos, se verificará su acción sobre la proteína PoFUT1 de *Homo sapiens* ya que la inhibición de esta enzima es el objetivo final de nuestros estudios. Además, nuestro grupo, en colaboración con el grupo de Síntesis Asimétrica de la Universidad de Zaragoza, se encuentra elaborando un ensayo enzimático capaz de cuantificar la acción inhibitoria de compuestos sobre enzimas que utilicen nucleótidos azucarados como sustratos. Para ello, se está trabajando en la síntesis de un fluoróforo que interacciona específicamente con el nucleótido formado en la reacción enzimática llevada a cabo por glicosiltransferasas (*Ojida, 2006*).

En resumen, tanto los resultados obtenidos como las perspectivas de trabajo presentan una línea de investigación muy interesante en la búsqueda de nuevos fármacos contra la diana terapéutica PoFUT1, además de que estos compuestos aportarán información sobre el papel de la O-fucosilación en distintas etapas del desarrollo embrionario y en distintas condiciones fisiológicas.

## **Conclusiones**



## Conclusiones

En este trabajo se ha realizado un cribado masivo de compuestos orgánicos en busca de posibles inhibidores contra la actividad de la proteína CePOFUT1.

Se ha cuantificado la unión de estos compuestos a la proteína utilizando diferentes técnicas biofísicas y se ha cristalizado el enzima con estos compuestos.

En conclusión, en el presente trabajo se han propuesto cuatro compuestos inhibidores de la actividad del enzima PoFUT1 de la especie *C.elegans*, que serán el punto de partida en la búsqueda de fármacos contra esta diana terapéutica.

## **Referencias**





## Referencias

Artavanis-Tsakonas, S; Rand, M.D; Lacke, R.J (1999). Notch Signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* , 284, 770-776.

Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature* , 7.

Copland, R. A. (2005). *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery*. Canada: Wiley-interscience.

Cummings, M.D; Farnum, M.A.; Nelen M.I. (2006). Universal screenind methods and applications of ThermoFluorR. *J Biomol Screen* , 11.

Gashaw, I; Ellinghaus, P; Summer, A; Asadullah, K (2011). What makes a good drug target? *Drug discovery today* , 16 (23/24).

<http://thermofluor.org/resources/DSF-Analysis-Manual-v3.0.pdf>. (s.f.).

Jafar-Nejad, H; Leoanrdi, J; Fernandez-Valdivia, R. (2010). Role of glycans and glycosytransferases in the regulation of Notch signaling. *Glycobiology* , 20 (8), 931-949.

Jundt, F; Schwarzer, R; Dörken, B. (2008). Notch signaling in leukemias and lymphomas. *Curr Mol Med* , 8, 51-59.

Lepre, C. (2004). Theory and applications of NMR-Based Screening in Pharmaceutical Research. *Chem. Rev.* , 3641-3675.

Lipinski, C.A; Lombardo F; Dominy B.W; Feeney P.J (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* (23), 3-25.



Lira-Navarrete, E; Valero-Gonzalez, J; Villanueva, R; Martinez-Julvez, M; Tejero, T; Merino, P; Panjikar, S; Hurtado-Guerrero, R. (2011). Structural insights into the mechanism of protein O-fucosylation. *PlosOne* , 6 (9).

Mayer, M; Meyer, B. (1999). Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed* , 38 (12), 1784-1788.

Meyer, B; Peters, T. (2003). NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angew. Chem. Int. Ed* , 42 (8), 864-890.

Ojida, A. (2006). Bis(Dpa-Zn) Appended Xanthone:EXcitation Ratiometric Chemosensor for Phosphate Anions. *Angew. Chem. Int. Ed.* , 45, 5518-5521.

Okajima, T; Xu, A; Irvine, K.D. (2003). Modulation of Notch-Ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and Fringe. *JBC* , 278 (43), 42340-42345.

Pancewicz, J; Taylor, J.D; Datta, A; Baydoun, H.H; Waldmann, T.A; Hermine, O; Nicot, C. (2010). Notch signaling contributes to proliferation and tumor formation of human T-cell leukemia virus type I-associated adult T-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* , 107, 16619-16624.

Shi, S; Stanley, P. (2003). Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *PNAS* , 100 (9), 5234-5239.

Takeuchi, H; Haltiwanger, R.S. (2010). Role of glycosylation of Notch in development. *Semin Cell Dev Biol* .

Velazquez-Campoy, A (2004). Protein-Protein interactions: Methods and protocols. *Methods in Molecular Biology* , 261, 35-53.

Wang, Y; Shao, L; Shi, S; Harris, R.J; Spellman, M.W; Stanley, P; Haltiwanger, R.S. (2001). Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *J. Biol Chem* , 40338-40345.

*Búsqueda de inhibidores frente a la proteína O-fucosiltransferasa 1 (PoFUT1)*

Jessika Valero González



Wang, Y; Spellman, M.W. (1998). Purification and characterization of a GDP-fucose: polypeptide fucosyltransferase from Chinese hamster ovary cells. *J. Biol Chem* , 273, 8112-8118.

Weng, A. P. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* , 306, 269-271.



## **Relación de abreviaturas**

ANS: ácido 8-anilino-1-naftalén sulfónico

APS: Persulfato amónico

DMSO: Dimetil sulfóxido

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GDP: Guanosina difosfato

GDP-Fucosa: Guanosina difosfato fucosa

HEPES: Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperacinetanol sulfónico

PBS: Phosphate Buffered Saline

PEG 3350: Polietilen glicol 3350

SDS: Dodecilsulfato de sodio

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina

TRIS: Tris(hidroximetil)aminometano,