

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Evaluación de un nuevo quimiotipo de moduladores de tubulina del dominio de vinca

Evaluation of a new chemotype of tubulin modulators of the vinca domain

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Gonzalo Sáez Calvo

Director
José Fernando Díaz Pereira

Madrid, 2016

EVALUACIÓN DE UN NUEVO QUIMIOTIPO DE MODULADORES DE TUBULINA DEL DOMINIO DE VINCA

EVALUATION OF A NEW CHEMOTYPE OF TUBULIN MODULATORS OF THE VINCA DOMAIN

Memoria presentada por
GONZALO SÁEZ CALVO

para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y
Biomedicina

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Trabajo realizado en el
Centro de Investigaciones Biológicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

bajo la dirección del
Doctor José Fernando Díaz Pereira



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Madrid, 2015

EVALUACIÓN DE UN NUEVO QUIMIOTIPO DE MODULADORES DE TUBULINA DEL DOMINIO DE VINCA

EVALUATION OF A NEW CHEMOTYPE OF TUBULIN MODULATORS OF THE VINCA DOMAIN

Memoria presentada por
GONZALO SÁEZ CALVO

para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y
Biomedicina

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



El autor:

Vº Bº del director:

Gonzalo Sáez Calvo

José Fernando Díaz Pereira



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Madrid, 2015

“Una dificultad deja de serlo en cuanto os
reís de ella y ponéis manos a la obra.”

Lord Robert Baden-Powell



Agradecimientos

Un proverbio hebreo dice que “el que da no debe volver a acordarse; pero el que recibe nunca debe olvidar”. Por este motivo y porque la gratitud silenciosa no tiene sentido, me gustaría reservar un espacio de honor en esta memoria a todas aquellas personas sin cuyo esfuerzo este camino no hubiera llegado a buen puerto.

En primer lugar, me gustaría agradecer al doctor José Fernando Díaz Pereira, Fer, el jefe, todo el apoyo, guía, consejo y paciencia que me ha brindado durante casi cinco años. Gracias a él, he descubierto que soy capaz de alcanzar mis metas, con mi propio esfuerzo, aunque éstas supongan un reto considerable.

A la doctora Isabel Barasoain, por haberme ofrecido sus conocimientos en el campo de la Biología Celular, ya que sin su dirección no habría salido adelante una parte esencial del presente trabajo.

Y al doctor José Manuel Andreu, por estar siempre disponible para brindarme sus consejos y experiencia las veces que hubo necesidad, que no fueron pocas.

Además de grandes científicos, Fer, Isabel y J. M. son incluso mejores personas. Para la realización de una Tesis Doctoral, no sirve solamente con tener una buena tutela, sino que también hace falta un ambiente amable y en este sentido, no he podido sentirme más afortunado. La gente de mi grupo es extraordinaria. Mariano, el “padre” que cuida de todos nosotros y del correcto funcionamiento del laboratorio, que siempre está disponible para escucharte o ayudarte en lo que haga falta, sin una sola queja. Javi, al que le corresponde la responsabilidad intelectual de una buena parte de este trabajo y quien espero que siga invitándome a cenar a su casa; buen vino y mejor compañía. Ruth, de quien he aprendido absolutamente todos los secretos de la tubulina y muchos de los que aún carecía sobre la vida. Tampoco quiero dejar pasar la oportunidad de acordarme de Benet, Eli y Chiara, porque os echo mucho de menos, y

de todos los fichajes recientes: Dani, Paco, Juan, Ailyn, Carmen y Fernando Josa, a quienes deseo que sean tan felices trabajando en el 309 como lo he sido yo.

Igualmente quiero dar las gracias a la gente del laboratorio 308 (y recientemente también del 307), por todas las horas, comidas y tertulias juntos. Vosotros también formáis parte de mi familia CIB. Especialmente, le doy las gracias a Albert, por la cercanía, el humor inteligente y las confianzas compartidas. Con él me llevo un amigo para toda la vida.

Aparte de mi Grupo de Investigación, hay una larga lista de gente en el centro que me ha aportado innumerables e inolvidables experiencias. Todos los “germanes” (actuales y pasados) y sus desayunos-banquetes, los chicos de la “ultra” analítica, la “ultra” analítica, todo el personal de la tercera planta (¡sí, la planta entera!), los expertos microscopistas electrónicos que son, además, expertos en pádel, Migueles, el comando AGP... Todas las fiestas y disfraces con vosotros hacen del centro un lugar especial en el que pasar todas las horas que hacen falta.

Estoy en deuda también con el Grupo del Profesor Jesús Jiménez-Barbero, por su ayuda inestimable con los experimentos de resonancia magnética nuclear.

At this point, I would like to say thank you to the Group of Michel O. Steinmetz, because during the three months I stayed at PSI, you did me feel completely integrated since the first day. I am especially grateful to Ashwani for his kindness and because he always showed great interest in getting a perfect job.

A César, no sólo tengo que agradecerle su apoyo durante el tiempo de la Tesis Doctoral, sino que debo hacerlo por el que me ha ofrecido durante muchos más años: Gracias por tu ayuda siempre que me ha hecho falta, por preocuparte por mí, por tus llamadas de control, por tu amistad sincera...

Gracias a Diego por sus planes increíbles que siempre me han permitido desconectar y descansar. Hemos tenido que venir a Madrid para entablar relación, y desde luego que ha merecido la pena. A mi primo por estar siempre ahí, dispuesto a escuchar con interés todo sobre mis experimentos. A todos mis amigos de Palencia por hacerme creer que no pasa demasiado tiempo desde una visita y la siguiente.

A mis amigos de la carrera, por seguir manteniendo el contacto a pesar del paso del tiempo, y a los del máster (incluidos los anexionados como Jesús, Hermida), por su amistad y por ser la prueba inequívoca de que el buen ambiente no está reñido con el rendimiento académico.

A mis dos compañeros de piso, por los cuatro años de convivencia, ya que aparte de mis padres sois las personas con las que más tiempo he vivido y no podría haber estado más cómodo. Gracias además por soportar, en este tiempo, todas las novedades sobre mi trabajo.

Gracias a mi familia de León, por cuidar de mí, siempre con una gran sonrisa. ¡Ya me diréis si con este agradecimiento se retorna una parte de los costes de manutención de todos estos años!

Gracias a abuela, tíos, primas y cuñado porque sé que puedo contar con vosotros para lo que haga falta; dando igual si estoy en Palencia, Palma, Valladolid, Madrid o Suiza.

Un agradecimiento especial va dirigido a mis padres. Porque toda la vida os habéis esforzado por hacer del mundo un lugar mejor en el que vivir, más sencillo. Porque gracias a vosotros, con vuestro apoyo incondicional, diario, he logrado llegar hasta la meta. Porque habéis sido, sois y seréis el hombro en el que apoyarme los días más difíciles o los más agotadores. Porque habéis asistido con alegría a cada una de

mis improvisadas clases de bioquímica a pesar de no entender más que una parte. Porque os quiero y admiro.

A mi hermana Elisa también tengo que darle las gracias por muchas razones. Primero, porque estas páginas no estarían impresas si ella no hubiera puesto previamente su ojo experto sobre ellas. Pero no sólo eso; gracias por tu ayuda, por tu protección, por tu guía, porque eres el espejo en el que me miro, mi modelo a seguir, mi ejemplo. Yo de mayor quiero ser como tú.

Y finalmente, quiero terminar este texto dándole las gracias a Seomara. Gracias por todo. Gracias por aguantarme, por escucharme, por comprenderme, por aconsejarme, por quererme, por haber estado presente en tantas buenas experiencias. Eres la mejor y diez años no son nada.

Gracias a todos.



Índice

Figuras	13
Tablas	17
Abreviaturas	19
Resumen	23
Summary	27
1. Introduction	31
1. Cancer and its impact on society	31
1.1. History and main events	32
1.2. Biological basis of cancer	33
1.3. Classification	35
1.3.1. Carcinoma	35
1.3.2. Sarcoma	36
1.3.3. Leukemia	36
1.3.4. Lymphoma	36
1.3.5. Germ cell tumor	36
1.3.6. Blastoma	37
1.4. Treatments	37
1.4.1. Surgery	37
1.4.2. Radiotherapy	37
1.4.3. Chemotherapy	38

1.4.4. Hormonotherapy	40
1.4.5. Immunotherapy	41
1.4.6. Bone marrow transplantation	42
1.4.7. Gene therapy	42
2. Microtubules as target for antitumoral therapy	42
2.1. Microtubule structure and dynamic behavior	43
2.2. Tubulin isotypes	47
2.2.1. The β isotypes	47
2.2.2. The α isotypes	49
2.3. Tubulin targeting agents	49
2.3.1. Site of paclitaxel	51
2.3.2. Site of colchicine	52
2.3.3. Vinca domain	54
2.3.4. Site of laulimalide	55
2.3.5. Site of PM060184	56
2.3.6. Site of pironetin	57
3. Approaches for designing new drugs	58
2. Objetivos	61
3. Materiales y métodos	63
1. Productos, tampones y ligandos	63
1.1. Productos	63
1.2. Tampones	64
1.3. Ligandos	64
2. Caracterización de los compuestos	66
2.1. Espectrofotometría en el espectro ultravioleta-visible	66
2.2. Determinación de la solubilidad	67
2.3. Espectrometría de masas	67
3. Ensayos de biología celular	67
3.1. Líneas celulares	67
3.2. Citotoxicidad	68
3.3. Ciclo celular	68
3.4. Inmunofluorescencia indirecta	68
4. Proteínas	69
4.1. Purificación de tubulina	69
4.2. Microtúbulos estabilizados	70
4.3. Determinación de la concentración de sitios de unión en microtúbulos estabilizados	70
4.4. Purificación de RB3	71
5. Ensayos de bioquímicos de interacción tubulina-ligando	71
5.1. Espectrofluorimetría	71
5.2. Ensayos de modulación del ensamblaje mediada por ligando	72
5.3. Unión a microtúbulos estabilizados	72
5.4. Unión a dímeros de tubulina	73
5.5. Ensayos de desplazamiento de flutax-2	73
5.6. Ensayos de competición por el sitio de la laulimalida por HPLC	74
5.7. Ensayos de competición por fluorescencia	74
5.8. Efecto de los ligandos sobre microtúbulos de <i>Aspergillus nidulans</i> ...	74
5.9. Ensayos de ultracentrifugación analítica	74
5.10. Determinación de la estequiometría de unión por HPLC	75
6. Constantes de unión	76

6.1. Determinación por fluorescencia	76
6.2. Determinación por ultracentrifugación analítica	76
7. Ensayos estructurales	79
7.1. Ensayos de resonancia magnética nuclear	79
7.1.1. Espectroscopía de orden difusional (DOSY-RMN)	80
7.1.2. Espectroscopía de diferencias en la transferencia de saturación (STD-RMN)	81
7.2. Ensayos de microscopía electrónica de transmisión	81
7.3. Ensayos de dispersión de rayos X a ángulos bajos	82
7.4. Ensayos de cristalografía	85
7.5. Ensayos de bioinformática	86
4. Resultados	89
1. Propiedades biofísicas	89
1.1. Coeficiente de extinción molar	89
1.2. Solubilidad	90
1.3. Pureza	91
1.4. Identificación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)	92
2. Efecto de los ligandos en líneas celulares	92
2.1. Citotoxicidad	92
2.2. Efecto sobre el ciclo celular	93
2.3. Efecto sobre la red de microtúbulos citoplásmicos, los husos mitóticos y la morfología de los núcleos celulares	94
2.4. Estudio de la reversibilidad de los efectos celulares de los compuestos	97
3. Efecto de los ligandos en el ensamblaje de tubulina	98
3.1. Unión a tubulina	98
3.2. Modulación de la polimerización de tubulina	99
4. Unión a los diferentes estados de agregación	100
4.1. Unión a microtúbulos	100
4.2. Competición con el sitio del paclitaxel y con el de la laulimalida	101
4.3. Unión a dímeros de tubulina	103
4.4. Unión a tetrámeros de tubulina	104
4.5. Competición con los sitios de la colchicina, del compuesto PM060184 y con el dominio de vinca	106
5. Efecto del magnesio en el equilibrio tubulina-ligando	107
6. Modulación de la oligomerización	109
6.1. Oligomerización inducida por el compuesto 1	109
6.2. Perturbación del estado de agregación inducida por el compuesto 1	110
7. Caracterización bioquímica de la unión	111
7.1. Determinación de la estequiometría	111
7.2. Determinación de las constantes de afinidad	113
7.2.1. Estudios de cinética química por fluorescencia	114
7.2.2. Estudios de asociación por velocidad de sedimentación	117
8. Caracterización estructural de la unión	122
8.1. Ensayos de microscopía electrónica de transmisión	122
8.2. Ensayos de dispersión de rayos X a ángulos bajos	124
8.3. Estudio de las diferencias en la transferencia de saturación	126
8.4. Estudios de cristalografía	128
8.5. Estudios de bioinformática	130

5. Discusión	133
1. La diana de los compuestos objeto de estudio es el citoesqueleto	133
2. Los compuestos investigados alteran el estado de agregación de la tubulina	135
3. El dominio de vinca es el sitio de unión de todos los ligandos	136
4. El mecanismo de acción consiste en la modulación de la interfase entre dímeros consecutivos	137
5. Influencia de las modificaciones estructurales en la actividad de los compuestos	138
6. Comparativa entre el efecto de la vinblastina y el de los compuestos objeto de estudio	142
6. Conclusions	145
7. Bibliografía	147
Anexo 1	163
Anexo 2	169



Figuras

Introduction

Figure 1: Bust of Claudius Galen	32
Figure 2: Schematic representation of the pathogenesis of cancer metastasis ...	35
Figure 3: Crystal structure of mouse P-glycoprotein	40
Figure 4: Crystal structure of cow $\alpha\beta$ -tubulin heterodimer	43
Figure 5: Schematic representation of a microtubule	44
Figure 6: Schematic representation of the dynamic instability of microtubules	45
Figure 7: Simultaneous treadmilling and dynamic instability	46
Figure 8: Representation of some compounds that interact with tubulin	50
Figure 9: Crystal structure of $\alpha\beta$ -tubulin dimer, bound to paclitaxel	52
Figure 10: Crystal structure of $\alpha\beta$ -tubulin dimer, bound to colchicine	53
Figure 11: Crystal structure of the vinca domain, occupied by vinblastine	54
Figure 12: Crystal structure of $\alpha\beta$ -tubulin dimer, bound to epothilone A and peloruside A	55
Figure 13: Crystal structure of plus end β -tubulin monomer, bound to PM060184	56
Figure 14: Proposed secondary structures which are relevant for the contact with pironetin	57

Materiales y métodos

Figura 15: Estructuras químicas del flutax-2, del docetaxel y de la podofilotoxina	66
---	----

Figura 16: Pantalla principal del programa informático <i>SwKeeq</i> , ejecutado en Windows	77
Figura 17: Esquema del método de detección de señal en el experimento de SAXS	83
Figura 18: Patrón de dispersión de rayos X del complejo T ₂ RT-compuesto 1 cristalizado	86

Resultados

Figura 19: Espectros de absorbancia en la región ultravioleta-visible de los compuestos objeto de estudio	90
Figura 20: Espectros de absorbancia del ensayo de solubilidad, realizado con el compuesto 6	91
Figura 21: Espectro de masas del compuesto 1	91
Figura 22: Efecto del paclitaxel, de los compuestos objeto de estudio y de la vinblastina sobre el ciclo celular de células A549	94
Figura 23: Efecto de los compuestos de la serie CSCD sobre la red de microtúbulos, los husos mitóticos y la morfología nuclear de células A549	95
Figura 24: Efecto de 20µM de vinblastina, del compuesto 2 y del 3 sobre la red de microtúbulos, los husos mitóticos y la morfología nuclear de células A549 ...	96
Figura 25: Efecto de 20µM del compuesto 1 sobre la tubulina de <i>Aspergillus nidulans</i>	97
Figura 26: Espectros de emisión de fluorescencia de 10µM del compuesto 1 libre y unido a 10µM de tubulina	98
Figura 27: Efecto de los ligandos en el valor de concentración crítica en tampón con glicerol y sin glicerol	100
Figura 28: Ensayo de unión a microtúbulos, realizado con el compuesto 1	101
Figura 29: Desplazamiento de flutax-2, realizado con el compuesto 1	102
Figura 30: Ensayo de competición entre la laulimalida y el compuesto 1	102
Figura 31: Unión del compuesto 1 a dímeros estabilizados	103
Figura 32: Estructura cristalográfica del complejo T ₂ R	105
Figura 33: Ensayo de unión a T ₂ R, realizado con el compuesto 1	105
Figura 34: Ensayo de competición por fluorescencia entre el compuesto 1 ó 4 y la podofilotoxina, la vinblastina y el compuesto PM060184	107
Figura 35: Saturación fraccional del compuesto 1 unido, frente a la concentración de tubulina libre, en presencia de 0.2mM, 1.5mM y 3.0mM de MgCl ₂	108
Figura 36: Espectros 2D de DOSY para 15µM de tubulina, en presencia de 0µM, 4µM, 15µM y 30µM del compuesto 1	109
Figura 37: Distribución de coeficientes de sedimentación y espectros de absorbancia a 320nm de muestras con 15µM de tubulina, incubadas en presencia de concentraciones crecientes del compuesto 1	110
Figura 38: Estequiometrías de unión de los compuestos 1, 2 y 4 en tampón GAB y en tampón PEDTA	112
Figura 39: Esquema del sistema isodésmico tubulina-ligando	114
Figura 40: Cinética de unión de 20µM del compuesto 1 a 2µM de tubulina	115
Figura 41: Constantes cinéticas aparentes del compuesto 1 con el heterodímero de tubulina y con T ₂ R, frente a la concentración de ligando	116
Figura 42: Cinética de disociación de 2µM del compuesto 1, previamente unido a 2µM de tubulina	117
Figura 43: Distribución de coeficientes de sedimentación de muestras con 5µM del compuesto 1, en presencia de concentraciones crecientes de tubulina	118

Figura 44: Coeficientes de sedimentación teóricos frente a los calculados con los compuestos de la serie CSCD	118
Figura 45: Coeficientes de sedimentación de los compuestos objeto de estudio, frente a la concentración de tubulina total	119
Figura 46: Saturación fraccional del compuesto 1 unido, frente a la concentración de tubulina libre. Medidas tomadas partiendo de 2.5µM, 5µM y 10µM de ligando	120
Figura 47: Ajustes de las constantes aparentes calculadas, realizados en función de la concentración de ligando libre	121
Figura 48: Esquema del sistema reversible de unión T ₂ R-ligando	121
Figura 49: Distribución de coeficientes de sedimentación de unas muestras con 10µM de tubulina y 7.5µM de RB3, incubadas en ausencia de ligando o con 12µM del compuesto 1	122
Figura 50: Micrografías electrónicas de muestras con 10µM de tubulina y 25µM del compuesto 1	123
Figura 51: Perfiles de SAXS, experimentales y teóricos, del compuesto 1 y de la vinblastina en tampón GAB 1mM GTP	124
Figura 52: Esquema del método de transferencia de saturación en resonancia magnética nuclear	126
Figura 53: Estructura química del compuesto 1 , con los desplazamientos químicos de los grupos involucrados en el contacto con la tubulina señalados y espectros de STD-RMN, obtenidos con dicho compuesto	127
Figura 54: Diagrama de cintas de la estructura cristalográfica del dominio de vinca, resuelta a partir del complejo T ₂ RT-compuesto 1	129
Figura 55: Superposición de la estructura cristalográfica del complejo T ₂ R libre, con la del complejo T ₂ RT unido al compuesto 1	129
Figura 56: Modelados moleculares de los compuestos de la serie CSCD, realizados sobre la estructura cristalográfica de T ₂ RT	131

Discusión

Figura 57: Diagrama de cintas de la estructura cristalográfica del complejo T ₂ RT-compuesto 1 , en el que se representan las distancias de contacto más pequeñas entre la proteína y el ligando y su correlación con los epítomos identificados por STD-RMN	137
Figura 58: Dependencia de los valores de Cr de los compuestos CSCD, con sus constantes de afinidad aparentes	139
Figura 59: Dependencia de los valores de CI ₅₀ de los compuestos objeto de estudio en las líneas celulares A2780 y A2780AD, con sus constantes de afinidad aparentes	140
Figura 60: Superposición de la estructura cristalográfica del complejo T ₂ R libre, con la del complejo T ₂ R unido a la vinblastina, y con la estructura del complejo T ₂ RT unido al compuesto 1	142

IV

Tablas

Materiales y métodos

Tabla 1: Nombre, código empleado, peso molecular y estructuras químicas de los compuestos de la serie CSCD	65
---	----

Resultados

Tabla 2: Coeficientes de extinción molar de los compuestos estudiados	90
Tabla 3: Tiempos de retención en HPLC, de los compuestos objeto de estudio en una columna de fase reversa C18 con metanol 70% en agua y longitudes de onda en que son monitorizados	92
Tabla 4: Citotoxicidad de los compuestos objeto de estudio, en comparación con la del paclitaxel y la de la vinblastina en células A2780 y A2780AD, e índices de resistencia de la línea A2780AD	93
Tabla 5: Estequiometrías observadas en tampón GAB 1mM GTP	113
Tabla 6: Constante de afinidad del primer paso, en la reacción de unión del compuesto 1 al heterodímero de tubulina y a T ₂ R, y constante cinética de formación de producto del segundo paso	116
Tabla 7: Constantes de afinidad aparentes de los compuestos objeto de estudio, determinadas con el programa informático <i>SwKeq</i>	119
Tabla 8: Diámetro y longitud del paso de vuelta de las hélices formadas en presencia de los compuestos 1 , 2 y vinblastina en tampón GAB 1mM GTP y 6mM MgCl ₂ y en tampón PEDTA 1mM GTP y 7mM MgCl ₂	125
Tabla 9: Aminoácidos del dominio de vinca involucrados en el contacto con los siete compuestos objeto de estudio	132

Discusión

Tabla 10: Variación de las constantes de afinidad aparentes de los compuestos objeto de estudio, en función de las modificaciones en su estructura química

141

V

Abreviaturas

Å	Ångström.
ABC <i>protein</i>	Proteína transportadora con motivo de unión a ATP (del inglés: <i>ATP-binding cassette protein</i>).
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
APPCP	βγ-metilen-adenosín trifosfato.
AUC	Ultracentrifugación analítica (del inglés: <i>Analytical ultracentrifugation</i>).
BSA	Seroalbúmina bovina (del inglés: <i>Bovine serum albumin</i>).
CCD (sensor)	Dispositivo de cargas acopladas (del inglés: <i>Charge-coupled device</i>).
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50.
CMOS (sensor)	Semiconductor complementario de óxido metálico (del inglés: <i>Complementary metal oxide semiconductor</i>).
Cr	Concentración crítica.
D ₆ -DMSO	Dimetilsulfóxido deuterado.
D	Coefficiente de difusión.
DEAE	Dietilaminoetil celulosa.
DMF	N,N-dimetilformamida.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés: <i>Deoxyribonucleic acid</i>).
DOSY	Espectroscopía de orden difusional (del inglés: <i>Diffusion-ordered spectroscopy</i>).
DTT	Ditiotreitol.
EDTA	Ácido etilen-diaminotetraacético.

EGTA	Ácido glicol-éter-diaminotetraacético (del inglés: <i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i>).
FDA	Agencia de alimentos y medicamentos.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (del inglés: <i>Fluorescein isotiocyanate</i>).
Flutax-2	7-0-[2,7-difluoro-4'-(fluoresceín-carbonil)-L-alanil]-paclitaxel.
GAB	Tampón de ensamblaje con glicerol (del inglés: <i>Glycerol assembly buffer</i>).
GDP	Guanosín difosfato (del inglés: <i>Guanosine diphosphate</i>).
gp-P	glicoproteína-P.
GTP	Guanosín trifosfato (del inglés: <i>Guanosine triphosphate</i>).
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-etanosulfónico.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés: <i>High performance liquid chromatography</i>).
HTS	Cribado de alto rendimiento (del inglés: <i>High throughput screening</i>).
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.
K _a	Constante de unión. Constante de afinidad.
K _{ap}	Constante aparente.
kDa	Kilodalton.
krpm	Kilorrevoluciones por minuto.
mAbs	Anticuerpos monoclonales (del inglés: <i>Monoclonal antibodies</i>).
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos 2 (del inglés: <i>Microtubule-associated protein 2</i>).
MDR	Resistencia múltiples a drogas (del inglés: <i>Multidrug resistance</i>).
MES	Ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico.
MET	Microscopio electrónico de transmisión.
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés: <i>Major histocompatibility complex</i>).
MDA	Agentes desestabilizantes de microtúbulos (del inglés: <i>Microtubule destabilizing agents</i>).
MSA	Agentes estabilizantes de microtúbulos (del inglés: <i>Microtubule stabilizing agents</i>).
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.
NaPi	Fosfato sódico.
NBD	Dominio de unión a nucleótido (del inglés: <i>Nucleotide binding domain</i>).
NK cells	Células asesinas naturales (del inglés: <i>Natural killer</i>).
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés: <i>Phosphate buffered saline</i>).
PEG	Polietilenglicol.
PGP	glicoproteína-P (del inglés: <i>P-glycoprotein</i>).
PIPES	Ácido 1,4-piperazin-dietanosulfónico.
R/S	Índice de resistencia.
RMN	Resonancia magnética nuclear.
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés: <i>Ribonucleic acid</i>).
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés: <i>Reactive oxygen species</i>).
rpm	Revoluciones por minuto.

S	Coeficiente de sedimentación (de Svedberg).
SAXS	Dispersión de rayos X a ángulos bajos (del inglés: <i>Small angle X-ray scattering</i>).
SDS	Dodecil sulfato sódico (del inglés: <i>Sodium dodecil sulfate</i>).
STD	Diferencia en la transferencia de saturación (del inglés: <i>Saturation transfer difference</i>).
T ₂ R	Tetrámero de tubulina unido a la proteína RB3.
T ₂ RT	Complejo T ₂ R unido a la proteína TTL.
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano.
TTL	Tubulina-tirosina ligasa.
u. a.	Unidades arbitrarias.
UI	Unidades internacionales.
ε	Coeficiente de extinción molar.
λ	Longitud de onda.

VI

Resumen

En la actualidad, uno de los mayores problemas de salud pública en los países desarrollados es el cáncer y por este motivo, el estudio de nuevos tratamientos contra dicha enfermedad recibe una especial atención. De todas las terapias existentes, la quimioterapia es la opción preferencial en la mayoría de casos debido a sus buenas expectativas de éxito. La quimioterapia consiste en el bloqueo de una función celular específica mediante el suministro de un agente químico, siendo las dos rutas celulares sobre las que se suele actuar la replicación del material genético y la división celular. Dentro del grupo de tratamientos que actúan sobre la división celular, aquellos que emplean fármacos que alteran el funcionamiento del citoesqueleto se encuentran a la vanguardia de la lucha contra el cáncer.

Los microtúbulos, los componentes fundamentales del citoesqueleto, son polímeros dinámicos con aspecto de cilindros huecos compuestos por protofilamentos de tubulina que contactan lateralmente entre sí. Asimismo, dichos protofilamentos son formados mediante la asociación cabeza-cola de heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina.

El equilibrio entre el estado dimérico y el estado polimérico es regulado por una dinámica dependiente de la hidrólisis del nucleótido GTP. Los heterodímeros unidos a GTP son más propensos a polimerizar, mientras que los unidos a GDP desplazan el equilibrio hacia la especie libre.

Existe una gran colección de agentes químicos que regulan esta dinámica, bien favoreciendo el ensamblaje y/o estabilizando los microtúbulos, o bien favoreciendo el desensamblaje y/o desestabilizando los polímeros. En ambos casos, el correcto funcionamiento de estas estructuras se ve alterado y, con ello, todas las funciones de las que son responsables, tales como la segregación cromosómica o la división de las envueltas nucleares y celulares durante el proceso de replicación.

El trabajo presentado en esta memoria, titulado “Evaluación de un nuevo quimiotipo de moduladores de tubulina del dominio de vinca”, muestra la caracterización de la unión y del mecanismo de acción de un compuesto sintético y sus derivados estructurales, desde un punto de vista biológico, bioquímico y estructural. La información obtenida ha sido empleada, además, para conocer la implicación de los diferentes determinantes estructurales en la actividad de cada compuesto.

Por un lado, los ensayos llevados a cabo sobre líneas celulares humanas mostraron que los compuestos objeto de estudio poseen actividad citotóxica y que interaccionan con la red de microtúbulos, deteniendo el ciclo celular en la fase G₂/M. Además, se observó que ninguno de ellos es sustrato de la glicoproteína-P (gp-P), lo que provoca que se mantenga prácticamente el mismo nivel de actividad en células con el fenotipo multirresistente a drogas (MDR), por sobreexpresión de la gp-P.

Por otro lado, el estudio de la actividad sobre la red de microtúbulos de *Aspergillus nidulans* permitió determinar que, tanto la unión del ligando como el efecto producido como consecuencia, son reversibles.

Adicionalmente, mediante experimentos bioquímicos se analizó el efecto *in vitro* de los compuestos sobre la tubulina. Su capacidad de ensamblaje aumentó significativamente como consecuencia de la presencia de los compuestos estudiados, por lo que se concluyó que dichos compuestos se comportan como polimerizadores de tubulina. Posteriormente, mediante ensayos de DOSY-RMN y de ultracentrifugación analítica se determinó que las moléculas estudiadas inducen la formación de oligómeros de diversos tamaños, sin llegar a generar microtúbulos.

Además, se observó que no se produce unión ni a los dímeros de tubulina ni a los microtúbulos preformados, mientras que sí que se observó dicha unión a la especie tetramérica. Todo ello, junto al hecho de que los ligandos compiten por el sitio de unión con los fármacos modelo de la región interdimerica, indica que la región de contacto con la tubulina se encuentra situada en el dominio de vinca.

Debido a que los ligandos interfaciales requieren el autoensamblaje de la tubulina para unirse y ya que dicho autoensamblaje es dependiente de la concentración de magnesio, se determinó entonces la relación entre la unión de los compuestos a su diana y el magnesio existente. El resultado obtenido reveló una clara dependencia entre ambos parámetros, por lo que es posible concluir que unión y autoensamblaje son dos procesos coordinados y mutuamente dependientes en el sistema objeto de estudio.

La estequiometría de unión determinada para todos los compuestos de la serie, en tampón con glicerol, oscila entre 0.6:1 y 1.15:1, lo que es un reflejo del estado de oligomerización promedio inducido, el cual tiende a la especie tetramérica cuanto más se aproxima a la relación 0.5:1 y a polímeros grandes cuanto más se aproxima a 1:1.

También se ha optimizado un método para calcular las constantes de unión de los ligandos a la tubulina mediante ensayos de velocidad de sedimentación de ultracentrifugación analítica, a partir de la asunción de que el sistema analizado cumple la condición isodésmica (condición en la que cada paso de oligomerización tiene la misma constante de afinidad que el paso anterior). El método desarrollado permite determinar las constantes para cualquier ligando, siempre que éste interaccione con proteínas que ensamblan isodésmicamente y sea capaz de alterar la afinidad de autoensamblaje de la proteína al unirse. Los resultados obtenidos, revelaron que los compuestos codificados como **1** (parental) y **2** son los más activos de la serie.

En último lugar, la caracterización estructural fue realizada mediante estudios de difracción de rayos X, de microscopía electrónica, de STD-RMN y de bioinformática. La

estructura de un tetrámero de tubulina cristalizado en presencia del compuesto parental reveló la conformación real de la proteína y del ligando unidos y también permitió determinar el mecanismo de acción. Cuando la unión tiene lugar, la estructura curvada observada en el tetrámero vacío se endereza ligeramente, lo que permite cierto grado de ensamblaje de la tubulina. A partir de los resultados obtenidos por microscopía electrónica, se concluyó que los compuestos objeto de estudio inducen la formación de polímeros helicoidales, mientras que los ensayos de STD-RMN mostraron que dichos ligandos se unen en el dominio de vinca a través del contacto con el triazol, con el trifluorobenceno y con el sustituyente de la posición 3 del azabicyclo. Adicionalmente, los modelados moleculares realizados revelaron que todos los compuestos se unen de una manera muy similar en el mismo sitio, fundamentalmente a través del establecimiento de dos apilamientos de anillos aromáticos con dos residuos de la proteína. Se observó además una relación inversa entre la polaridad del sustituyente de la posición 3 del azabicyclo y la constante de afinidad de los compuestos.

Finalmente, se compararon los efectos inducidos por los compuestos de la serie CSCD y los inducidos por la vinblastina. La vinblastina es un fármaco antitumoral de uso extendido que, al igual que los compuestos objeto de estudio, se une a la tubulina en el dominio de vinca. La comparación entre los datos obtenidos en este trabajo y aquellos disponibles en la bibliografía sobre la vinblastina, puso de manifiesto considerables diferencias. Mientras que la vinblastina, un fármaco más voluminoso que los ligandos CSCD, induce un efecto cuña que favorece el desensamblaje, los compuestos objeto de estudio acceden al dominio de vinca y enderezan la estructura del tetrámero con el que contactan. Este hecho sugiere que la diferencia en cuanto al volumen específico de los ligandos del dominio de vinca determina el efecto que inducen en la tubulina.

VII

Summary

Nowadays, one of the major public health issues in developed countries is cancer and, for this reason, the study of new treatments against this disease receives today special attention. Among all existing therapies, chemotherapy is preferential choice in most cases because of their high success expectations. Chemotherapy involves the block of a specific cellular function by administering a chemical agent. The two cellular pathways, on which chemotherapy usually acts, are the genetic material replication and the cell division. Within the group of treatments that act on cell division, those using chemotherapy drugs that interact with the cytoskeleton, are at the forefront of the fight against cancer.

Microtubules, the major components of cytoskeleton, are dynamic polymers, which look like hollow cylinders. They are made up of tubulin protofilaments, which establish lateral contacts with other protofilaments. Besides, such protofilaments are formed by the head-tail association of $\alpha\beta$ -tubulin heterodimers.

Balance between dimeric and polymeric state is regulated by a dynamics, which is GTP-hydrolysis dependent. GTP-heterodimers are more likely to polymerize, while GDP-heterodimers drive balance toward free species.

There is a large collection of chemical compounds that are able to regulate this dynamics, either promoting tubulin assembly and/or stabilizing microtubules, or promoting disassembly and/or destabilizing polymers. In both cases, proper function of these structures is altered and thus, the whole functions they are responsible for, such as chromosome segregation or division of nuclear and cell envelopes during the replication process, are also altered.

The work presented in this report, entitled "Evaluation of a new chemotype of tubulin modulators of the vinca domain", shows the characterization of the binding

process and the mechanism of action of a synthetic compound and its structural derivatives, from a biological, biochemical and structural point of view. Obtained information was further used in order to determine the implication of the different structural determinants in the activity of each compound.

On one hand, performed tests on human cell lines demonstrated that the studied compounds have cytotoxic activity and they also demonstrated that the compounds interact with the microtubule network, being able to arrest cell cycle at G₂/M phase. In addition, it was observed that none of the ligands is a substrate for the P-glycoprotein (PGP). This fact causes that these ligands are able to maintain, approximately, the same level of activity in cells that show the multidrug resistance phenotype (MDR), by overexpression of PGP.

On the other hand, the study of the activity on the microtubule network of *Aspergillus nidulans* allowed to determine that both ligand binding and the consequent produced effect are reversible actions.

Additionally, by *in vitro* biochemical experiments, it was analyzed the effect of compounds on tubulin. Its assembly capacity significantly increased as a result of the presence of studied compounds, so it was concluded that these compounds behave as tubulin polymerizers. Afterwards, by DOSY-NMR and analytical ultracentrifugation experiments, it was concluded that studied molecules induce the formation of oligomers of various sizes, without actually reaching microtubule generation.

Furthermore, it was observed that binding occurs, neither to tubulin dimers nor to preformed microtubules. However, ligands are able to bind to tetramers. This, coupled with the fact that ligands compete for the binding site with model drugs, which bind in the interfacial region, indicates that the region of contact with the tubulin molecule is located in the vinca domain.

Since interfacial ligands often require self-assembly of tubulin in order to bind, and since such self-assembly depends on the concentration of magnesium, it was determined the relation between ligand binding to target and magnesium concentration. The result showed a clear dependence between these two parameters, which means that binding and self-assembly are two coordinated processes in the studied system.

Binding stoichiometry for all the studied compounds, measured in glycerol-buffer, fluctuates between 0.6:1 and 1.15:1, indicating the average oligomerization state induced by each ligand. This average oligomerization state tends to the tetrameric state, the more the value approaches to the relation 0.5:1, while it tends to big polymers, the more the value approaches to 1:1.

Moreover, a method for determining equilibrium constants of ligands which bind to tubulin, by experiments of sedimentation velocity of analytical ultracentrifugation, has been optimized. This method is based on the assumption that the analyzed system follows the isodesmic condition. In such systems, each oligomerization step has the same binding constant as the previous step. The developed method allows to determine affinity constants for any ligand, as long as the studied ligand interacts with proteins, which assemble in a isodesmic manner, and changes the affinity of the protein self-assembly when it binds. Obtained results show that compounds coded as **1** (parental) and **2** are the most actives of the series.

Finally, the structural characterization studies involved X-ray diffraction, electron microscopy, STD-NMR and bioinformatics. The tubulin tetramer structure, crystallized in the presence of the parental compound revealed the real conformation of the bound ligand, and it also allowed to determine its mechanism of action. When binding happens,

the tetrameric curved apo-structure slightly straightens, what makes possible some degree of tubulin assembly. From the results obtained by electron microscopy, it is found that all the compounds induce the formation of helical polymers, while from the STD-NMR analysis it was concluded that they contact with the vinca domain through the triazole ring, the trifluorobenzene ring and the substituent of the 3-position of the azabicyclo. Additionally, molecular modelling of the ligands showed that all of them bind to the tubulin in a very similar way, mainly through two aromatic stacks with two tubulin residues. It was also observed an inverse relationship between the polarity of the substituents at 3-position of the azabicyclo and the binding constant of the compounds.

Finally, the effects induced by the studied ligands and the effects induced by vinblastine were compared. Vinblastine is a widely used antitumor drug which, as well as the studied compounds do, it binds to tubulin in the vinca domain. Comparison between data obtained in this work and those available in the literature about vinblastine, revealed several differences. While vinblastine, which is a drug with larger volume than the studied compounds, induces a wedge that promotes tubulin disassembly, these studied compounds access the vinca domain and straighten the tetramer structure they contact with. This fact suggests that the difference in the specific volume of the ligands of the vinca domain determines the induced effect on tubulin.

1

Introduction

1. Cancer and its impact on society

Mankind, in quest of welfare, has devoted great efforts throughout history to fighting against many diseases. Most of them, such as smallpox, polio or tuberculosis were defeated by prevention, since achieving prevention is much easier than looking for a successful treatment. Thus, when society has acquired a deeper understanding of biology, life expectancy has increased and therefore, it has also increased the prevalence of different types of age-related diseases such as cancer, where prevention is much more difficult to achieve (Bode and Dong, 2009).

Cancer, also called “malignant neoplasm”, is a generic term for a large group of diseases that can affect any part of the body, that share some common characteristics such as uncontrolled growth and spread of abnormal cells. Although cancer has been a known illness for many hundreds of years, its underlying mechanisms have not been glimpsed until last century.

Cancer figures among the worldwide leading causes of morbidity (prevalence) and mortality, with approximately 14.1 million of new cases and 8.2 million of cancer-related death each year (Torre *et al.*, 2015). Furthermore, the World Health Organization (WHO, www.who.int) predicts that cancer deaths will increase from 14% of all deaths in 2008 to 18% in 2030. It represents the third leading cause of death in developed countries, after ischemic and stroke diseases, and the fourth one worldwide.

The most common causes of cancer death are:

1. Cancer of lung.
2. Cancer of liver.

3. Cancer of stomach.
4. Cancer colorectal.
5. Cancer of breast.
6. Oesophageal cancer.

So, as one of the major public health issues, cancer research receives one of the largest budget items in first world countries (cancer funds in Spain accounts for 9% of the total investment on research, according to the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness).

1.1. History and main events

First evidences about the emergence of cancer are even older than mammals, since tumor masses have been found in dinosaur fossils that are more than 70 million years (Faguet, 2015). The earliest written records are from two ancient Egyptian manuscripts (the Edwin Smith and the George Ebers papyri) which were written 3000 and 1500 B. C., respectively (Hajdu, 2011). They contain references to solid tumors, cool to the touch and bulging lumps which could be treated using a “fire drill” to cauterize open wounds (Faguet, 2015). However, the first scientifically documented case of a disseminated metastatic cancer appearance corresponds to a human skeleton who lived around 2700 years ago (Schultz *et al.*, 2007).

However, all these previous evidences do not refer to the word “cancer”, since it was later defined by Hippocrates of Cos (460-375 B. C.). He described several kinds of cancers based on the observation of the patients and he referred to their lumps with the Greek word for crab (*karkinos*), since the cut surfaces of the solid tumors reminded of that animal (Sakorafas and Safioleas, 2009). In his medical writings he rationalized that excess or deprivation of blood, mucus, bile and other secretions, especially at old age, could result in cancer.



Figure 1: Bust of Claudius Galen of Pergamum by Commodus, second century A. D. (photo AKG Images/Daqli Orti)

The next great exponent in the understanding of cancer is the physician of the second century A. D., Claudius Galen (figure 1), who laid the basis of medicine for over 1500 years, writing numerous scientific texts with his comments.

Through multiple vivisection of animals and human corpses autopsies, he could understand how several organs work, such as the brain (and its role in the ability to speak), heart (as a blood pump) or kidneys.

His most significant contribution to the study of cancer was a classification of the different lumps he could observe, according to seriousness. He considered *de tumoribus secundum naturam* as benign tumors and normal physiological processes

(e. g., the growth of the uterus in pregnant women), *de tumoribus supra naturam* as abscesses and inflammations and *de tumoribus praeter naturam* as the lumps that are

known as cancer today. Nevertheless, the understanding of Galen about the treatment of cancer were essentially nil (Faguet, 2015).

When the Byzantine Empire fell down, many texts were lost and the understanding about cancer was slowed down. For many centuries only tools to operate tumors were improved, as well as the postoperative techniques.

Further progress in cancer treatment were not achieved until the eighteenth century. During those years the harmful effect of smoking in the development of the disease was determined and it was also discovered the lymph vessels and the ability of tumors for spreading through this system in order to generate new distal cancers (metastasis) (Wolff, 1989).

Throughout the nineteenth century, the discovery of anesthesia by Crawford W. Long took place. This fact, along with the emergence of antibiotic agents motivated the impulse of surgery as the main treatment against cancer (Long, 1849). In the same way, the discovery of X-rays by Wilhelm C. Röntgen, uranium by Henri Becquerel and radium and polonium by the Marie Sklodowska-Curie and Pierre Curie marriage, represented a remarkable improvement in the hopes of successful treatment of the cancer process (Hajdu, 2012). Soon, it was demonstrated that the complete surgical removal of tumors followed by radiation treatments presented great results in the hope of survival of the patients.

At the beginning of the twentieth century, the microbiologist Paul Ehrlich popularized the use of specific chemical compounds in order to treat tumorigenic cells. His studies marked the beginning of the use of chemotherapy in the fight against cancer (DeVita and Chu, 2008). The search of chemotherapeutic agents has taken place in most of the twentieth century thanks to empiricism, as the discovery of the mustard gas as inhibitor of the carcinogenic effect of coal tar (Hajdu and Darvishian, 2013).

Finally in the last fifty years, cancer research, prevention, early detection and treatment accelerated very quickly. It was studied the role of genetics and different kind of viruses as factors which induce cancer. However, the greatest advance in this period of time was the appearance of immunotherapy around 1970. This technique uses the immunologic system of the patient to fight the disease, usually through vaccination (Hajdu *et al.*, 2015). It was observed in patients with lymphoma and leukemia, that some antibodies would bind only the tumor cells, activating the immune response, via lymphocytes and cytokines (Schultz *et al.*, 1977).

Experience acquired over thousands of years of cancer research has shown that best results in treatment are accomplished by the combined use of different techniques.

1.2. Biological basis of cancer

Normal cells are capable of dividing to form two new cells when needed by the body and when they become old and get damaged, they are prepared for suicide without releasing any component to the matrix, in a process called apoptosis (Au *et al.*, 1998; El-Kareh *et al.*, 2008). The transformation from a normal cell to a tumor cell is a multi-staged process where many genetic and epigenetic alterations happen, which allows cells to escape homeostatic control. These changes are the result of the interaction between the genetic component and environmental agents, including physical carcinogens (such as ultraviolet radiation), chemical carcinogens (such as components of tobacco) and biological carcinogens (such as some kind of virus infections). In any

case, the vast majority (99.7%) of cancers are non-hereditary, so environmental agents are the only etiological causes in most carcinogenic processes (Roukos, 2009).

The genetic changes that contribute to cancer could affect three main types of genes: proto-oncogenes, tumor suppressor genes and DNA repair genes.

Proto-oncogenes are involved in normal cell growth and division, controlling the implicated pathways and then, when they are altered, the produced oncoprotein provides an excessive or uncontrolled growth-promoting signal (Sever and Brugge, 2015).

Tumor suppressor genes inhibit the growth of tumor cells, so its loss of function stimulates the development and settlement of new cancers (Mazaris and Tsiotras, 2013).

Finally, DNA repair genes are responsible for correcting errors in the replication of genetic material and when the body ages, these repair mechanisms become defective. Thus, it is found that the age is another factor that dramatically influences the development of the disease (Kovalchuk *et al.*, 2014).

Epigenetic alterations refer to the set of chemical processes (such as DNA methylation, histone modification and positioning of nucleosome along DNA) that modify the expression of the genetic material without altering its sequence. Several reports suggest that there are differential levels of methylation between healthy and cancerous cells, so this fact could be used as a treatment. Aberrant DNA methylation was the first epigenetic modification which was associated with cancer. There are three different kinds of methylation: hypermethylation, hypomethylation and loss of printing. Hypermethylation has been associated with the stabilization of transcriptional repression and loss of gene function, and occurs fundamentally in tumor suppressor genes. Besides, it was proved that during tumor progression, the degree of hypomethylation increases as the lesion derives from a benign proliferation of cells to an invasive cancer. Finally, loss of printing is defined as the loss of genetic expression due to aberrant hypomethylation at one of the parental alleles (Yi and Kim, 2015).

In conclusion, when cancer develops the affected cells become older and more damaged and they acquire the ability to grow out of control and to survive when they are supposed to die by apoptosis. Furthermore, these cells receive more extra capabilities as they become cancerous: induction of angiogenesis (proliferation of blood vessels which enter inside the tumor), healthy tissue invasion (metastasis), evasion of immune destruction and insensitivity to anti-growth signals (Hanahan and Weinberg, 2000, 2011).

The process by which cancer cells spread, through the circulatory system, from the primary neoplasm to different locations, distant organs in the body is called "metastasis" and it is the aspect which concerns the most about cancer. This fear is well founded because despite significant improvements in diagnosis and treatment in the last decades, around 98% of all the deaths from cancer are due to metastasis (Langley and Fidler, 2007).

Metastasis is selective just for cells that succeed in invasion, survival in the circulation, arrest in a distant capillary bed and extravasation into and multiplication within the new location (figure 2). Furthermore, it is relevant that metastases can only develop in some specific organs, since the microenvironment of each one presents an unique composition with characteristic homeostatic factors. In other words, the proliferation of a tumor cell in a different organ depends on multiple and complex interactions between metastasizing cells and homeostatic system. These cells could reach the microvasculature of many organs, but they only grow in specific cases (Fidler, 2003). Tumors are classified as benign or malignant depending on whether they can invade locally or metastasize to distant organs.

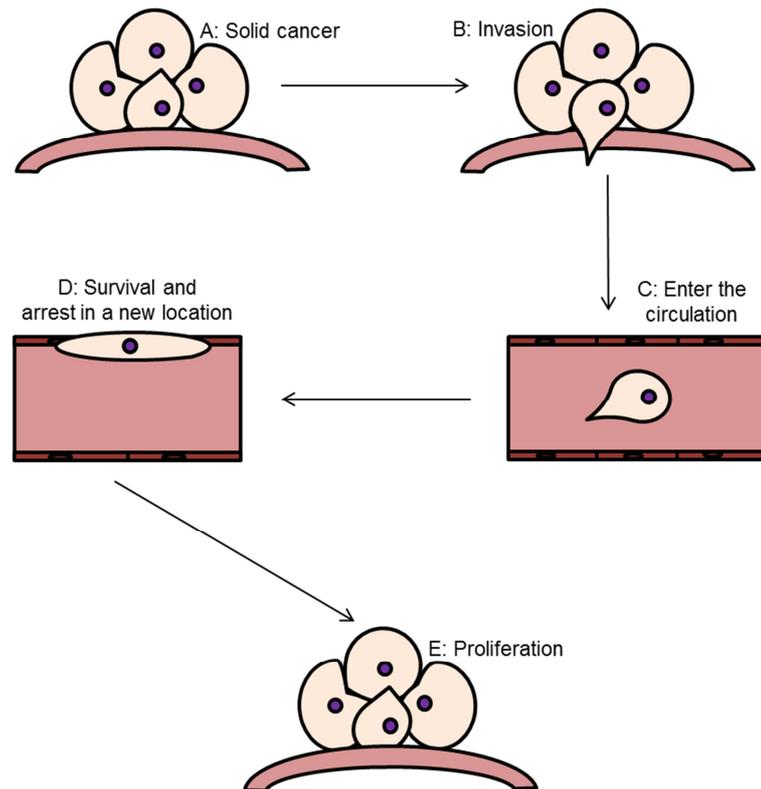


Figure 2: Schematic representation of the pathogenesis of cancer metastasis. A: The process begins with a solid cancer located in a specific spot. B: Invasion requires changes in the cell adherence and motility. C: Some tumor cells enter the circulatory system. D: Surviving cells are arrested and they can cross the vessel. E: Metastatic colonization of a different organ.

1.3. Classification

Due to the fact that some abnormal lumps cannot be considered as carcinogenic, it is possible to point out the following classification, which includes some pre-malignant changes in cells.

1. **Hyperplasia:** Increased number of regular cells in a tissue due to rapid growth. The result is increased organ size such as benign prostatic hyperplasia.
2. **Metaplasia:** Substitution of one cell type in another related location. It may promote a dysplasia in the new position.
3. **Dysplasia:** Abnormal tissue development because of altered cell growth. With no treatment it may evolve to cancer.

Therefore, regarding cancers, they were traditionally classified according to the organ where the primary neoplasm occurs, but it has been proved that this approach does not provide relevant information for the treatment since every organ presents different types of tissue. For this reason nowadays, the international standard for classification is based on the tissue (since all the cells from the same tissue share characteristics) and it is divided into six categories (Fritz *et al.*, 2000).

1.3.1. Carcinoma

This cancer derives from the epithelial cells that envelop either the external parts of the body or the internal organs. This is the most common tissue in the body so it is

concluded that carcinomas are the most frequent type of cancer (responsible of 80% of all the cases). Furthermore, organs with carcinomas are able to secrete substances that could affect nearby organs, generating secondary neoplasms.

There are several types of epithelial cells and they do not share all their characteristics. For this reason, it is possible to find a secondary classification of carcinomas:

1. Adenocarcinoma: Carcinoma originated in the glandular tissue, for example in the ducts of the breast or prostate.
2. Squamous cell or epidermoid: Carcinoma originated in the non-glandular tissue, for example in the esophagus.
3. Basal cell carcinoma: It is the most common cancer of the skin and it grows slowly. This type of carcinoma is originated in the deepest layer of the epidermis, called basal cell layer. It is usually formed in the sun-exposed areas, such as neck or head and it is unlikely to spread to other parts of the body.
4. Melanoma: Malignant tumor formed in the melanocytes with high capacity for spreading.

1.3.2. Sarcoma

Cancers arising from connective tissue such as cartilage, fat, muscle or bone. Depending on the cell that originates it, sarcoma receives different names:

1. Chondrosarcoma: Derived from cartilage.
2. Liposarcoma: Derived from fat.
3. Osteosarcoma: Derived from bone.
4. Angiosarcoma: Derived from blood vessels.

1.3.3. Leukemia

Blood cancer where does not exist tumoration (as in patients with lymphoma). Patients with this type of cancer present an increased level of leukocytes. Depending on the affected cell, leukemias are divided into two groups:

1. Lymphoid leukemia.
2. Myeloid leukemia.

Moreover, depending on the maturation state, they could be:

1. Acute leukemias: Formed by immature cells.
2. Chronic leukemias: Formed by cells in the last step of maturation.

1.3.4. Lymphoma

Cancer of the lymphocytes and the organs that produce them. There are many types of lymphomas depending on multiple variables, such as the type of affected lymphocyte (T cells, B cells or NK cells), the shape or appearance of tumoral cells or the affected organ.

1.3.5. Germ cell tumor

Cancer originated from pluripotent cells, frequently presented in the gonads (testicle or ovary), although it is also possible to find extragonadal germ cells tumors. It is

thought that the gonadal tumors could be a consequence of an abnormal migration of germ cells during embryogenesis, while the extragonadal tumors could arise from congenic defects.

1.3.6. Blastoma

This type of cancer affects mostly to a younger pediatric population and it is usually malignant nature. It is caused from precursor cells or blasts (immature or embryonic tissue).

1.4. Treatments

Today, cancer treatment is based on three main pillars: surgery, radiotherapy and chemotherapy. However, as already detailed above, in recent decades new therapies have been developed, which used in combination with the classical techniques, improve the chances of success. These new therapies include, for example, hormone therapy, immunotherapy or bone marrow transplantation.

1.4.1. Surgery

Surgery is the oldest technique; it was used since Greco-Roman empire times. It involves removing the tumor and the surrounding tissue and it is often employed to remove cancerous tissue, completely or partially, reaching very successful results in undeveloped stages of cancer. Additionally, it can also be used as a diagnostic tool (biopsy) in order to determine the state of development of cancer.

Beside classical tumor elimination by scalpel, other surgeries use alternative methods. Cryosurgery uses extreme cold produced by liquid nitrogen or argon gas to destroy abnormal tissue. Furthermore, hyperthermia employs high temperatures to destroy damaged cells and to make them more sensitive to other complementary treatments. Finally, the use of powerful beam lasers to produce cuts in tissues with high precision (Cortésina *et al.*, 1991; Wolff and Mason, 2012).

1.4.2. Radiotherapy

Cancer treatment by using radiation comes from the studies of Röntgen and the Curie marriage. Ionizing radiation (e. g., X-ray, ultraviolet light or, more recently, protons) is a high-energy radiation that is capable of destroying chemical bonds and therefore, cells. In this way, it is possible to focus the radiation to a tumor in order to destroy it or in order to prevent malignant cell growth.

It is usually applied from an external device (linear accelerator) to prevent further radioactivity. Nevertheless, there is also a modality of internal radiation therapy (brachytherapy), where the radioactive material is included inside the affected tissue or inside the tumor itself, by permanent or temporary implants. While the implant remains active, precautions to prevent the spread of radioactivity must be taken (Furdui, 2014; Sutlief, 2015). One disadvantage is that both of them may affect healthy cells.

Side effects of radiation are accumulated as a larger number of treatments are received. They are uncommon, variable in each case and they manifest mainly as

fatigue and skin rashes of the affected region. At the end of the therapy, side effects disappear within a short period of time.

1.4.3. Chemotherapy

Out of the three conventional cancer treatments, chemotherapy is the most widespread therapy since it is the only one that carries out its function systemically and could be useful against metastasis (Lai *et al.*, 2012). It combats neoplastic formations by administering drugs (antineoplastic) and act by blocking the rapid cell replication that characterizes malignant tumors. Furthermore, depending on the state of development of cancer, chemotherapeutic therapy can be used at palliative level.

The pathway to prevent the proliferation of a tumor is different in each chemotherapeutic drug and they may act either on the replication of the genetic material or on the machinery of cell division by interfering with the responsible proteins. On this basis, it is possible to establish a classification of anticancer agents based on their cellular target.

In the first group the alkylating agents are considered, which exhibit high affinity for DNA. These agents add its highly reactive radicals to DNA, forming intrachain or interchain bridges and preventing proper function. They avoid the replication and transcription of DNA to RNA by the disruption of the replication fork in phase S (Koç *et al.*, 2004; Al-Minawi *et al.*, 2009) and induce cell death hereinafter. Cyclophosphamide, hydrazine or methotrexate belong to this group. Platinum derivatives are also included into this category (e. g., cisplatin), which form covalent bonds with purines (adenine and guanine), forming DNA adducts (Kelland, 2007). Compounds that inhibit topoisomerases (e. g., doxorubicin or *Topotecan*[®]), cytotoxic antibiotics that intercalate the genetic chains (e. g., dactinomycin) (Sobell, 1985) and nucleotide precursors (e. g., 5-fluorouracil, citrabine or gemcitabine) (Luqmani, 2005; Bagnyukova *et al.*, 2010) are the other members. All these compounds induce the activation of diverse repair mechanisms, but as a result of long exposures, these mechanisms will be permanently damaged by the presence of the ligands, therefore inducing apoptosis (Bagnyukova *et al.*, 2010).

The second group includes those components whose targets are the proteins that coordinate chromosome dynamics. The consequent result is that DNA segregation cannot happen in order to produce two daughter cells, so at this point, cells are induced to apoptosis as occurs with the agents that target DNA. This group contains compounds directed against mitotic kinesin, involved in the organization of the spindle pole and in the alignment of chromosomes, mitotic agents directed against kinases, involved in organizing the centrosome during prophase (Miki *et al.*, 2005; Hirokawa *et al.*, 2009; Venghateri *et al.*, 2015), and especially, modulators of cytoskeleton dynamics, the most used compounds in chemotherapy (Chen *et al.*, 2010; Dumontet and Jordan, 2010). Cytoskeleton modulators interfere with the formation and function of these structures and they cause cell cycle arrest in metaphase. They are involved in chromosome segregation, the maintenance of cell shape, vesicular transport, motility and organelle distribution (Hadfield *et al.*, 2003).

As a result of the high biochemical similarity between malignant and healthy cells, it is extremely complex to develop anticancer drugs with complete specificity. Nowadays, chemotherapeutic treatments affect cell replication and show some specific toxicity for tumoral cells, since one of the major difference between cancerous and healthy cells is the division rate (diseased ones are more actively growing and dividing). Nevertheless,

although cancer cells are sensitive to drugs which target the replication process, there are also some types of healthy cells which present the same accelerated growth (such as cells in the blood, gut or hair) and therefore, they are specially affected by the treatment. For these reasons, it is usual the appearance of side effects resulting from treatment toxicity for healthy tissues (Markman, 2003; Dumontet and Jordan, 2010). Most common side effects include alopecia, fatigue, nausea, immunosuppression and diarrhea or constipation. However there are many other potential side effects and the emergence of one or the other depends on multiple variables such as the drug mechanism of action, the dose or the patient-specific characteristics.

On some occasions, tumors can be refractory to chemotherapy and this may be due to two possible reasons: because the affected cells are inherently resistant to the drug for genetic factors, or because these resistances appear as a result of exposure to drugs. These resistance mechanisms against cytotoxic drugs are probably evolved in normal cells as a defense system against environmental carcinogens, although they represent a serious problem for the total elimination of the tumor mass (Luqmani, 2005). Various hypotheses have been proposed for the explanation of the phenomenon of drug resistance and include defects in the apoptotic pathway p53-mediated, mutations on the target protein or enhanced expression of proteins which counter the toxic effect.

The p53 protein regulates the cell cycle and induces apoptosis in case of severe damage. Some drugs which increase DNA damage, are able to induce a mutation in the p53 gene that will allow cells with that damage to keep replicating.

In other cases, overexposure to carcinogens drives to target mutations that overcome the toxic effect. An example of this mechanism is the induced mutation of topoisomerases by etoposide that changes the protein nuclear localization and therefore avoid toxicity.

Finally, most usual resistance mechanism involves the activation of translation processes that produce proteins, which revert the toxic effect. For example: the increased production of the glutathione tripeptide, which forms conjugates with the toxics that are excreted afterwards. Additional examples are the activation of the protein families that induce the interleukin-6 production (directly related to resistances) (Conze *et al.*, 2001), enhanced generation of DNA repair proteins (Zona *et al.*, 2014) or, probably the most significant form of resistance, raised levels of ATP-binding cassette (ABC) proteins expression that keeps intracellular drug concentration below a cell-killing threshold.

The major representative of the ABC proteins family is the P-glycoprotein (PGP) (Juliano and Ling, 1976; Gottesman *et al.*, 1996; Nobili *et al.*, 2012; Binkhathlan and Lavasanifar, 2013). PGP was first identified in 1976, expressed in drug resistant Chinese hamster ovary cells. It is the 170kDa and 1280 amino acids protein (figure 3) product of the human gene *MDR1* (or *ABCB1*). PGP presents two symmetrical parts with 43% sequence homology between them. Each half contains six transmembrane domains, bound to two globular areas toward the cytoplasm (nucleotide binding domains, NBDs). Substrates access inside the protein from the inner face, through the large opening to the cytoplasm. On the other hand, access from the outer face is blocked. As the compound binds the protein, it is induced the binding of two molecules of ATP that triggers a conformational shift of the protein. As a result of this shift, the outer cavity opens and the compound is expelled to the extracellular space. Then, hydrolysis of ATP by NBDs returns the system to the original position. Prolonged treatments with chemotherapeutic drugs eventually induce overexpression of PGP, so toxic drugs are easier expelled.

PGP-overexpressing cells acquire multi-drug resistance phenotype (MDR) because of the drug promiscuity of this protein. Thus, patients with this MDR phenotype show a diminished effectiveness of therapy and is therefore associated with poor prognosis and reduced rates of survival in stomach, breast, ovary or pancreas cancer and leukemia (Leighton and Goldstein, 1995).

Most of the PGP substrates are hydrophobic and it has been proved that lipophilicity and number of hydrogen bonds are the major determinants for the drug-protein interaction (Seelig and Landwojtowicz, 2000).

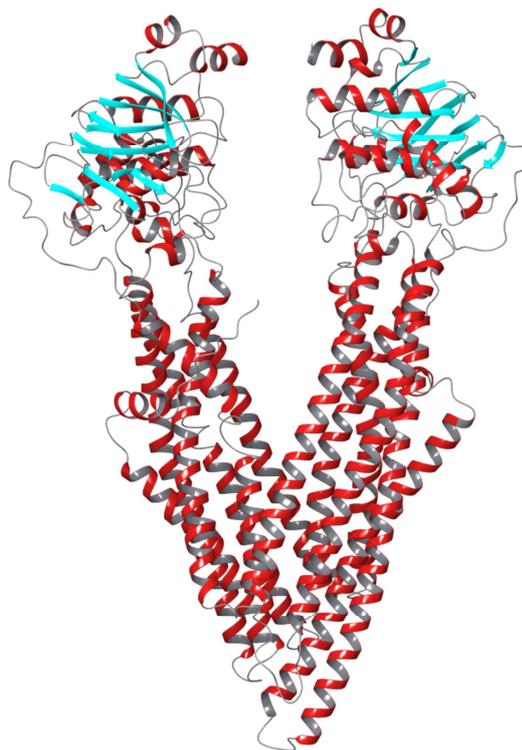


Figure 3: 3.8Å-resolution crystal structure of mouse PGP. Ribbon diagram that shows cytosolic globular NBDs at the top of the figure and the 12 transmembrane domains at the bottom. The α -helices are represented in red, the β -sheets in light blue and the loops in grey. Structure extracted from Protein Data Bank (3G60) (Aller *et al.*, 2009).

The most used approach to overcome resistances is the combined use of different therapies or different agents, although there are also different strategies such as the identification of PGP antagonists (Luqmani, 2005), the recognition of compounds that restores p53 function (Selivanova and Wiman, 2007), the use of monoclonal antibodies (Escors, 2014) or the design of new high-affinity drugs, allowing administration of minimal toxicity (Matesanz *et al.*, 2008).

1.4.4. Hormonotherapy

This technique is the preferred first-line therapy in cases of cancer, where hormonal regulation is closely related to the development of the disease, such as breast or prostate cancer. It involves the use of drugs that interfere (e. g., *Tamoxifen*[®]) (Adamowicz *et al.*, 2009) or block (e. g., aromatase inhibitors) (Rosenberg *et al.*, 2015)

the hormone production. Tamoxifen acts as an antiestrogen because it is a competitive inhibitor against the estrogen receptor, whereas aromatase inhibitors work by blocking the estrogen production by the aromatase enzyme. Another possibility consists on the castration, in order to diminish the blood hormone level (Sanguineti *et al.*, 2002). Major advantages of these treatments are the remarkable survival rate and the reduction of side effects due to toxicity (Jordan, 2002). However, hormonal therapy is often used as a complementary therapy after surgery and chemotherapy.

1.4.5. Immunotherapy

Primary response against carcinogenic mutation is the activation of the immune system to destroy the damaged cell. For this reason, an improved level of expression of the immune system is directly related to a better response against cancer.

Nevertheless, cancer cells are known to have the ability to evade the immune system control through diverse mechanisms, such as reduced expression of tumoral antigens, downregulation of major histocompatibility complex (MHC) for reduced antigen presentation, secretion of interleukins (see section 1.4.3 of this chapter) or induction of immunosuppressive cells such as regulatory T cells (Tang *et al.*, 2014). Immunotherapy as a cancer treatment refers to a set of techniques that seeks the permanent destruction of malignant cells by using the immune system in order to interfere, with high specificity, in some metabolic processes, affected as a result of the disease. Examples of components of the immune system (or components that enhance the immune system) that have been used as cancer therapy include cytokines, immune cells, nonspecific inflammatory inducers, and monoclonal antibodies. (Dillman, 2011):

Cytokines are immunomodulatory agents that induce activation of specific membrane receptors. They also induce activation of mechanisms of cell proliferation and differentiation, and modulate the secretion of immunoglobulins. The two most widely cytokines used in the treatment of cancer are interferons and interleukins. Both of them are produced by leukocytes and have direct cytostatic effect on tumor cells. Interferon- α 2a (*Intron A*[®]) and interleukin-2 (*Proleukin*[®]) became the first biological therapies approved as anticancer treatment.

Irradiated tumor cells, that were engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, were used, first in the history of immunotherapy, as anticancer vaccines for melanoma. This factor was tried to activate T cells, inactivated by the tumoral immunosuppressive mechanism, with promising results (Dranoff, 2004). Today there are more types of treatments based on the use of immune system cells such as dendritic cells, NK cells or T cells.

Bacillus Calmette-Guerin (*Tice*[®]), an attenuated strain of *Mycobacterium bovis* formerly administered as anti-tuberculosis vaccine and Levamisole (*Ergamasole*[®]), an oral anthelmintic are two compounds with nonspecific immunostimulatory properties, which are also used in cancer therapy. *Tice*[®] has been used in melanomas (Vosika, 1983) and *Ergamasole*[®] in colorectal cancer (Stevenson *et al.*, 1991).

Finally, the most common immune therapy against cancer involves the use of monoclonal antibodies. Based on the hybridoma technique developed in 1975 (Köhler and Milstein, 1975) it was designed a variety of antibodies directed against cancer cells. In general, it could be considered that their mechanism of action is based on three different approaches: using monoclonal antibodies (*mAbs*) that enhance the effect of immune cells by binding to them, using *mAbs* that interfere, by binding to some specific

cancerous receptors, the communication of tumoral cell, preventing its progression, or using *mAbs* conjugated with radioisotopes or toxins, that recognize specific receptors on the malignant cell and destroy it (Joensuu *et al.*, 2006; Wilkins and Mayer, 2006). The major advantage of using *mAbs* against other treatments is that it shows an improved specificity for their targets.

1.4.6. Bone marrow transplantation

Hematopoietic cell transplantation (or bone marrow transplantation) is a process by which, the bone marrow of a patient is destroyed and replaced with new hematopoietic precursors from the same individual or from a different one. This is a process which is usually performed in leukemia patients, whose prognosis varies depending on the stage of the disease and the histocompatibility of used stem cells. However, several studies reported favorable results after thirty years since the transplant, pointing out just a few cases of hypothyroidism, diabetes or gastrointestinal impairments (Baker *et al.*, 2010).

1.4.7. Gene therapy

The introduction of genetic material into cells to treat or prevent cancer is an experimental technique called “gene therapy”. It is a developing therapy which considers four possible strategies: suppression of oncogenes or addition of tumor-suppressor genes, enhancement of immunological response, transfer of suicide genes or protection of bone marrow using drug resistance genes. In order to incorporate foreign genetic material inside a cell, a vector is required, usually being a modified virus that is harmless. Once this vector is designed, it is added *in vitro* to a patient cell and then returned to the host (Takahashi *et al.*, 2006).

2. Microtubules as target for antitumoral therapy

Chemotherapy against cytoskeleton has shown the best results, due to the wide variety of roles that cytoskeleton plays in maintaining proper cell function, such as mitosis, intracellular trafficking, and motility (Mukhtar *et al.*, 2014).

Actin microfilaments, intermediate filaments and microtubules form the cytoskeleton (Parker *et al.*, 2014).

Microfilaments are strong and flexible structures of 7 nanometers diameter, which are usually located close to the plasmatic membrane. They are produced by ATP-driven α -actin and β -actin polymerization and they are directly implicated in muscle contraction and also in cell migration, so they are dramatically involved in metastasis propagation (Gunning *et al.*, 2015). They also handle the final constriction of cell membrane during the replication, forming the contractile ring (Mierzwa and Gerlich, 2014).

Intermediate filaments are composed of one or more members of a large family of cytoskeletal proteins encoded by over 70 genes in humans. These proteins form strong structures of 10-12 nanometers diameter and are ubiquitously located in the cytoplasm (Lowery *et al.*, 2015). Each monomer is composed by a globular head, an amino terminal region and an α -helix central domain. The α -helix domain allows the monomer to bind (head-head) to a different one, then producing a dimer. Subsequently, each dimer could

bind to another dimer in an antiparallel way, producing a tetramer. Finally, each tetramer serves as a base to generate a protofilament by its head-tail association to the following tetramer. When 8 protofilaments contact laterally among them, the fundamental unit of intermediate filaments is formed. These structures are the most stable cytoskeleton component and play a key role in cell function by maintaining cell shape and are particularly prominent in cells that are subject to mechanical stress. It has also been shown that they are part of the complexes that stick together neighboring cells.

The intermediate filaments family is composed by six different proteins: keratins, basically located in epithelial cells; vimentins in fibroblasts; desmins in smooth, skeletal and cardiac muscle; peripherins in neurons of the peripheral nervous system; glial fibrillary acidic proteins in astrocytes and glial cells and neurofilament proteins also located in the nervous system.

Microtubules are long, relatively stiff and highly dynamic hollow tubes of 24 nanometers diameter, composed by 13 parallel protofilaments of protein (Darnell *et al.*, 1990). In a typical eukaryotic cell, microtubules reversibly grow out from small structures near the nucleus (centrosomes) toward the cell periphery. They act as trails guiding intracellular transport, through movement of many vesicles and organelles, and are also involved in the composition of cilia and flagella (Alberts *et al.*, 1998). Furthermore, when the cell enters mitosis, microtubules disassemble and then reassemble into structures called mitotic spindles. These spindles provide the machinery that segregate chromosomes into equal halves just before a cell divides into two daughters.

2.1. Microtubule structure and dynamic behavior

Microtubules are formed by subunits of tubulin (figure 4). Every functional subunit is a dimer of 110kDa, composed of two highly similar globular monomers (Alberts *et al.*, 2008), called α -tubulin and β -tubulin (around 55kDa each one).

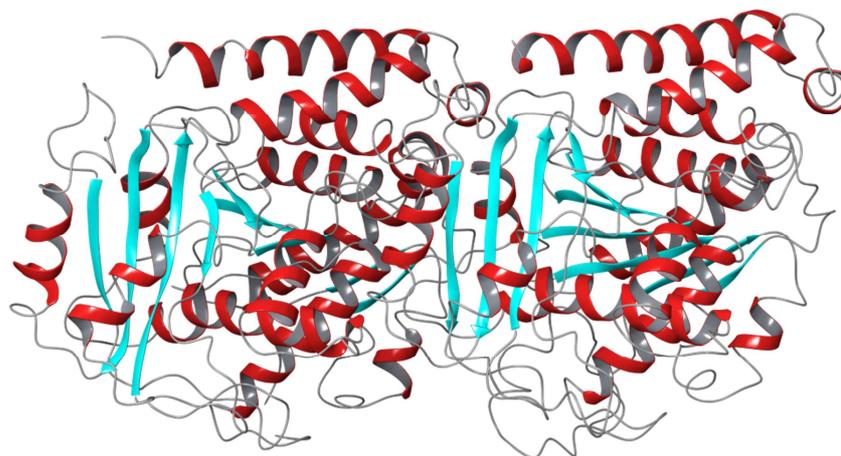


Figure 4: 3.5Å-resolution crystal structure of cow $\alpha\beta$ -tubulin heterodimer. The ribbon diagram shows α -tubulin on the left and β -tubulin on the right. The α -helices are represented in red, the β -sheets in light blue and the loops in grey. Structure extracted from Protein Data Bank (1JFF) (Lowe *et al.*, 2001).

The α -tubulin monomer contains 451 amino acids, the β -tubulin 445 (shared 39% of their sequences) and both of them are tightly bound to each other in the

$\alpha\beta$ -heterodimers through non-covalent bonds (Lowe *et al.*, 2001). There is a guanine binding site in each monomer (Stanton *et al.*, 2011). Nevertheless, the bond between both monomers results in trapping of the GTP molecule located in the interfacial region and it cannot be exchanged by a GDP, so this non-exposed site is known as “non-exchangeable site” or “N-site”. In contrast, the nucleotide bound to the β -tubulin could be either GTP or GDP, so its binding site is called “exchangeable site”, or “E-site”. As it will be further shown, described GTPase activity in the E-site (Roychowdhury *et al.*, 1999) play an essential role in the microtubule dynamics.

Along the microtubule longitudinal axis the closest region to the nucleotide binding site (“top”) of the β -subunit contacts with the opposite side (“bottom”) of the α -subunit of the adjacent heterodimer. At the same time, neighboring protofilaments form lateral contacts between same type monomers (α - α or β - β) or between different type of monomers (α - β or β - α). Nevertheless, lateral contacts between different type of monomers are rarely observed.

Moreover, it is characteristic that contiguous protofilaments are shifted 0.9 nanometers (Wade and Hyman, 1997), thereby forming helical distribution (figure 5).

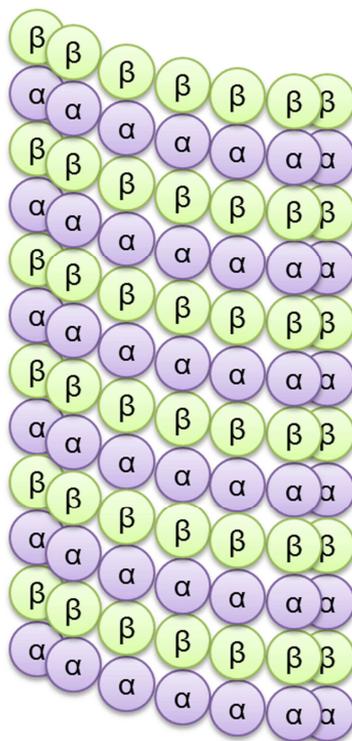


Figure 5: Schematic representation of a microtubule. It is shown in purple and green α -monomers and β -monomers, respectively. Protofilaments form slightly shifted lateral contacts with the adjacent units.

Each protofilament presents structural polarity. An α -tubulin subunit always forms the minus end and a β -tubulin, the plus ends. Both extremes take their names from the dynamic activity that they show, being the plus end much more active since its affinity constant for new soluble dimers is higher (Parker *et al.*, 2014). Thus, microtubule mainly grows toward its plus end, where the polymerization prevails over depolymerization.

If both ends are exposed, polymerization proceeds until the soluble tubulin concentration is above the polymerization critical concentration in the plus end and

below the depolymerization critical concentration in the minus end (see section 3.2 of the Results chapter). In this range of concentrations, a net assembly in the plus end and a net disassembly in the minus end happen with the same rate. As conclusion, microtubule length keeps constant and there is a net flux of dimers from the minus end to the plus one. This property is called **treadmilling**, requires a constant energy supply and allows the microtubules to slide from one place on the cell to a different one.

However, inside cells, the microtubule plus-end-growth behavior is emphasized because microtubules minus ends are anchored. Microtubules arise from specialized organizing centers (centrosomes), which regulate the number and location of polymers in cells. Minus end is embedded in the centrosomes, which contain hundreds of ring-like structures composed by a different type of tubulin, γ -tubulin. This center serves as starting point, as nucleation site, for the assembly of new tubulin subunits toward the cell periphery (Alberts *et al.*, 1998). Microtubule polymerization from a preexisting nucleating site is faster than polymerization *de novo*, since the limiting kinetic step on microtubule formation is nucleation.

As just noted, microtubules regularly grow toward cell periphery but at some point, unexpectedly, they suddenly undergo a transition that causes a fast shrinkage from the plus end. This behavior is known as **dynamic instability** and it is triggered by stochastic reasons.

Polymerization depends on the addition of $\alpha\beta$ -heterodimers (that contain one tightly bound GTP molecule in the E-site) onto microtubule ends (Brouhard and Rice, 2014). Shortly after this GTP-tubulin dimer binds to the plus end the nucleotide molecule is hydrolyzed to GDP, and then the nucleotide is trapped between the two adjacent dimers. This trapped GDP molecule is unable to exchange for a GTP until the microtubule is disassembled.

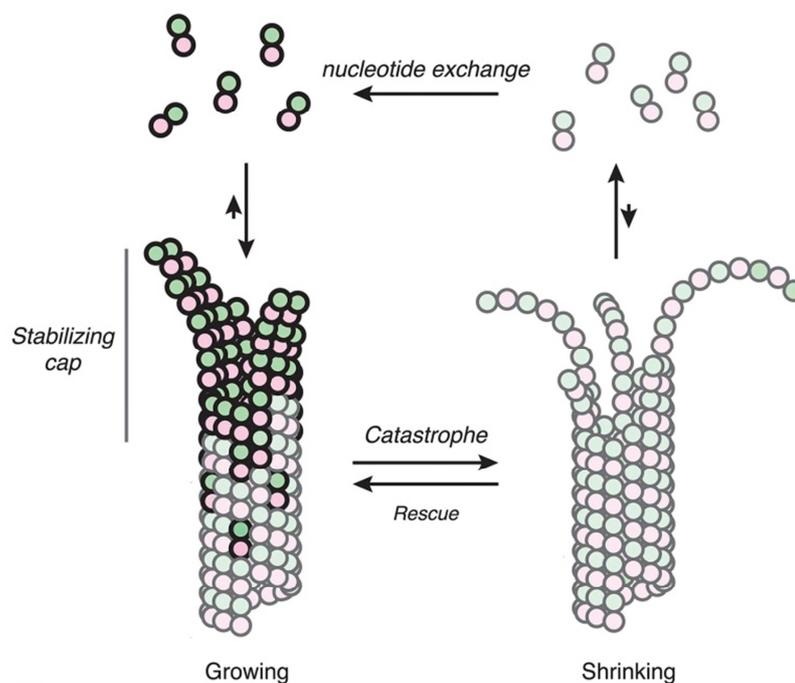


Figure 6: Schematic representation of the dynamic instability of microtubules. Shadow subunits represent GTP-tubulin heterodimers and solid subunits represent GDP-tubulin heterodimers. Image extracted from Brouhard and Rice, 2014.

The free heterodimer has a curved conformation, irrespective of the type of nucleotide which is bound. When a dimer binds to a growing protofilament, the side contacts which are established with neighboring protofilaments cause straightening of the dimeric structure and then polymer stabilization. The recruitment of GTP-tubulin to the ends of growing microtubules is favored versus the recruitment of GDP-tubulin, because dimers bound to GTP are straightened more easily (Nawrotek *et al.*, 2011).

Nucleotide hydrolysis takes place through a coordinated contact between the magnesium, the subunit which contacts with the positive end and the γ -phosphate of the GTP molecule. GDP-tubulin is more likely to acquire the curved conformation, so the hydrolysis and the subsequent release of the γ -phosphate is associated with an increased conformational strain, which would be released by bending during depolymerization (Alushin *et al.*, 2014).

When the addition of GTP-dimers is faster than hydrolysis, the size of the microtubule becomes longer. In this situation, many of the residues around the plus end are bound to a GTP molecule and they form a GTP stabilizing cap that prevents depolymerization. In the opposite side, when the addition of GTP-dimers is slower than the hydrolysis, the residues placed on the plus end are bound to GDP, so they are prone to depolymerize. Since most of the residues on the microtubule have a GDP molecule bound, once depolymerization starts, it usually tends to continue at catastrophic rate, although the affected microtubule may be rescued before complete disintegration (figure 6). When catastrophe happens, microtubule shrinks quickly and the soluble tubulin concentration increases. Because of the affinity difference, soluble tubulin exchanges the GDP molecule for a GTP and then, it may become a part of a new microtubule again.

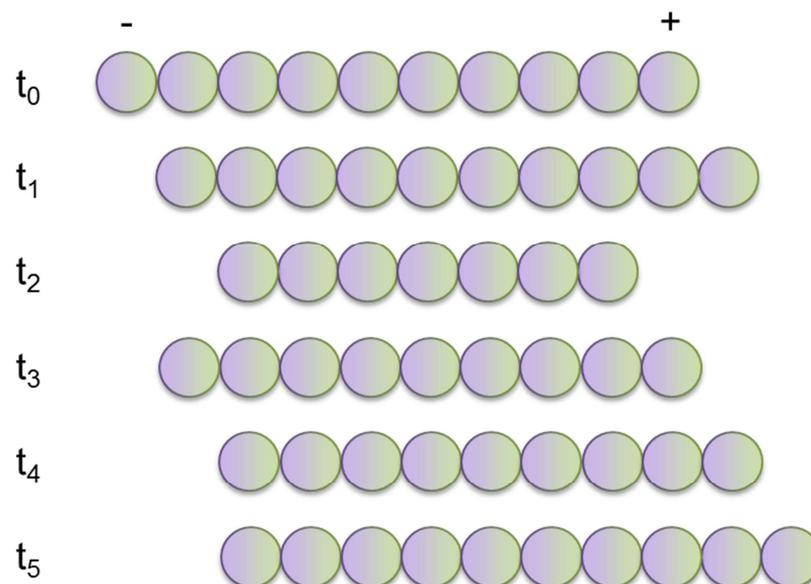


Figure 7: Simultaneous treadmilling and dynamic instability produce a net flow from minus end to plus end. Some $\alpha\beta$ -heterodimers of tubulin (purple and green spheres) are shown at different and arbitrary units of time. It is observed growth and shortening at plus and minus end, with net growth at the plus end and net shortening at the minus end.

Both detailed behaviors constitute the microtubule dynamics and are tightly regulated by different cellular mechanisms: cells can alter the tubulin expression level, or the post-translational modifications such as phosphorylation (Jordan and Wilson, 2004).

Molecules that regulate the dynamics of microtubules may interact with soluble tubulin but, they are primary likely to target microtubules (Wilson *et al.*, 1999).

As a result of the combined manifestation of treadmilling and dynamic instability, displacement of the structures towards the positive end happens (figure 7).

2.2. Tubulin isotypes

All of the previously described features belong to a generic $\alpha\beta$ -heterodimer. However, the existence of an entire family of α -tubulin and β -tubulin isotypes (six kinds of α -tubulin and six more kinds of β -tubulin in vertebrates) was proposed long time ago. In 1967, it was first observed that different microtubules presented different stabilities and functions (Behnke and Forer, 1967). This allowed to devise the “*multitubulin hypothesis*”, which proposes the existence of specific functions for each tubulin isotype (McKean *et al.*, 2001), despite most of the functions are shared among different isotypes. The structure of tubulin has been highly conserved throughout evolution (mainly in eukaryotic cells) and isotypes share high degree of amino acid homology. They just vary around last 25 residues of the carboxy-terminal tails, a highly negatively charged site where most of the post-translational modifications happens (Janke, 2014). As negative charges repel, this region is projected outward the microtubule, so it serves as a signaling sequence for proteins that may contact, such as MAP2, tau or calponin (Uzdensky *et al.*, 2012).

Furthermore, it has been detected that specific coding genes for each isotype are located in different chromosomes and have tissue-specific patterns (Kavallaris, 2010).

2.2.1. The β isotypes

High conservation of the sequences of the six known β -tubulin isotypes in vertebrates hints that differences must matter. In recent years, there have been significant efforts in determining if each isotype has an specific cell function, and the existence of cell lines expressing more than one class at the same time, support this hypothesis (Ludueña, 2013).

The β I isotype is highly conserved and appears to be the most widespread one in mammals and also in birds (Havercroft and Cleveland, 1984). The relative amounts in different tissues of β I are very variable: For example, in cow brains it represents 3-4% of the total β -tubulin (Banerjee *et al.*, 1988), but in the thymus it appears to be the most abundant one (Havercroft and Cleveland, 1984). It is speculated that the role of this isotype is the microtubule stability increase (Narishige *et al.*, 1999), although it is also suggested that β I isotype is implicated in the regulation of the signaling pathways, since its interaction with actin is worse (Lezama *et al.*, 2001).

The brain is the main source of tubulin used in experimentation *in vitro* and abundance of β II-tubulin isotype in this tissue is 58% (Banerjee *et al.*, 1988). It is not as widespread as β I isotype and is found in neurons, glia, skeletal and smooth muscle, in connective tissue, adrenal gland and testes (Arai *et al.*, 2002). Little is known about the functions of this isotype although, due to its high concentration in the perinuclear region and periphery, this tubulin class may be in charge of anchoring microtubules to the centrosome and of organizing the nuclear membrane and spindles during mitosis (Ludueña and Banerjee, 2008).

This β -tubulin class is the only one that has been found both inside and outside the nucleus (Walss *et al.*, 1999). It is proposed that during cell interphase, β II-tubulin controls the interaction of chromatin with the nuclear membrane and when the cell enters mitosis, it leaves the nucleus and helps to form the mitotic spindle together with different isotypes which are never introduced in the nucleus, such as β I-tubulin.

Further, this β II-isotype also appears in the nuclei of tumor cells and also in the neighboring ones, although they do not express this class when they are healthy. This suggests that the malignant transformation induces the cell to express β II-tubulin, which hints that this isotype is a favorable factor in cell survival or in drug resistance (Yeh and Ludueña, 2004).

The β III isotype is the best studied one, since it presents some distinguishing characteristics. Beside of being also highly conserved, as most of the other isotypes, it has an extremely narrow distribution in adult tissues (e. g., found in neurons and not in glia), an unusual distribution of cysteines (lack of cysteine 239 instead of a serine and presence of cysteine in the position 124) and high dynamism (Bouchet *et al.*, 2011; Mariani *et al.*, 2015).

Cysteine 239, present in other isotypes, is placed close to the α/β interface (Nogales *et al.*, 1998) and eventually, it may be affected by reactive oxygen species (ROS). When this occurs, microtubule assembly is inhibited; thus lacking this cysteine, the assembly of β III is not inhibited. Therefore, it can be said that β III protects the microtubule from ROS (Mariani *et al.*, 2015) and for this reason, it is expected that β III expression is higher in tissues and tumors with elevated levels of ROS. Mitochondrial membranes are enriched with β III because this organelle is the major producer of ROS (Valero, 2014) and expressing this isotype is an advantage for cancer cells to survive, because they work under a very high oxidative stress (Brown and Bicknell, 2001).

Furthermore, β III-isotype-cysteine 124 forms a cluster with cysteine 127 and cysteine 129 that increases the polymerization dynamism. Since embryonic nervous undergoes rapid growth and differentiation, they require very dynamic microtubules and this is why these tissues also express high levels of β III-tubulin (Katsetos *et al.*, 2003). This high dynamism makes microtubules, which are composed by β III-tubulin, more resistant to chemical compounds that promote tubulin polymerization (Kavallaris, 2010; Matesanz *et al.*, 2014).

The β IV isotype are found in cilia of vestibular hair cells, olfactory nervous and nasal respiratory epithelial cells, thus it is proposed that this tubulin is needed for axonemal structures (Jensen-Smith *et al.*, 2003). However, vestibular hair cells are non-motile, so it is concluded that β IV-tubulin are involved in the axonemal structure, instead of being implicated on motility (Ludueña and Banerjee, 2008). There are two different described β IV-tubulin isotypes (designated as β IVa and β IVb): the first one is only expressed in the brain and the second one is found in different ciliated tissues, but their functions are proved to be very similar.

The fifth isotype (β V) has an undetermined function, although sharing the cysteine distribution with the β III isotype (lack of cysteine 239 and presence of cysteine at position 124), it is thought that it is in charge of the same roles of β III in those tissues that lack it. Cells that overexpress either β III or β V have fragmented and unstable microtubule networks (Bhattacharya *et al.*, 2011; Chao *et al.*, 2012).

Finally, the β VI isotype is significantly divergent from the other isotypes in sequence (is the least conserved β -tubulin) and it is associated with the hematopoietic system (Sharma *et al.*, 2010; Klute *et al.*, 2014).

2.2.2. The α isotypes

The tissue distribution of the six α -tubulin isotypes described in vertebrates is less complex than the distribution of the β isotypes. The αI , clearly the most abundant isoform, and the αII are mainly found in the brain (Romaniello *et al.*, 2015), the $\alpha III/\alpha VII$ in testis, the αIV is widespread, especially located in muscle and heart, the $\alpha V/\alpha VI$ is also widespread, but less common than the others (Ludueña and Banerjee, 2008) and the $\alpha VIII$ -tubulin (the most divergent in sequence) is found in heart, testis, skeletal muscle and at very low levels in the brain and pancreas (Stanchi *et al.*, 2000). The αIII and αVII isoforms are alleles of the same gene, as well as the αV and αVI are (Pratt and Cleveland, 1988) and this is the reason why the respective isotypes are defined as a combination of both alleles.

Except for the $\alpha VIII$, the rest of the α isotypes present a sequence homology over 94% (89% between the αI and $\alpha VIII$) and it is observed that the differences are focused in the carboxy-terminal region (as it was the case with β isotypes). However, the $\alpha VIII$ differences highlight in a loop, which is implicated in lateral contacts. It is thus conceivable that $\alpha VIII$ -microtubules have very different dynamics (Ludueña and Banerjee, 2008).

2.3. Tubulin targeting agents

By different mechanisms, a broad range of highly cytotoxic compounds bind to the $\alpha\beta$ -heterodimer and interfere with microtubule formation, blocking cell cycle at metaphase, cell motion and organelle transport, inducing latter apoptosis. These tubulin-binding agents are therefore called “antimitotic drugs” because of their effects on mitosis. Over recent decades, discovered agents have been drawn from natural environments and have very different chemical structures (figure 8). Bacteria, marine sponges, molluscs and plants are the most characteristic sources, where most of the previously characterized agents have been isolated from (Kavallaris, 2010; Vindya *et al.*, 2015).

Conventional classification of agents that target the microtubule network is composed of two groups: microtubule stabilizing (MSAs) and microtubule destabilizing agents (MDAs).

Components of the first group preferentially bind to assembled tubulin and then preclude the microtubule disassembly, partially stabilizing a disordered loop located in the β -subunit (M-loop) and thus, improving lateral contacts between neighboring protofilaments (Snyder *et al.*, 2001; Prota *et al.*, 2014b). These compounds are also able to act by promoting assembly of heterodimers (Buey *et al.*, 2005).

The majority of tubulin targeting compounds have natural origin and it is thought that they have most likely evolved as broad-spectrum toxins to target eukaryotic tubulin in predators or preys (Field *et al.*, 2013).

On the other hand, members of the second mentioned group, MSAs, prevent microtubule polymerization by blocking GTP-tubulin dimers or facilitate disassembly of preformed microtubules (Andreu *et al.*, 1983; Pera *et al.*, 2013).

However, this classification of drugs as “stabilizers” or “destabilizers” of microtubules is eventually deceptive, since it just concerns to the effect of the compounds at high concentrations, on the polymer mass. Under these conditions, compounds that are able to modulate the mass (either stabilizers or destabilizers),

powerfully suppress the dynamics of microtubules even at a concentration between 10 and 100 fold lower, than these necessary to alter the polymer mass. When only dynamics is affected (*in vivo* conditions), the polymer accumulation does not vary. Nevertheless, it is also possible to achieve an apoptotic induction without employing high drug concentrations, what may be seriously toxic for patients (Jordan and Wilson, 2004; Mukhtar *et al.*, 2014).

Even though at high drug concentrations, MSAs and MDAs show completely different effects, at low concentrations, both groups of compounds exert their function on cell proliferation by blocking mitosis during metaphase (Checchi *et al.*, 2003).

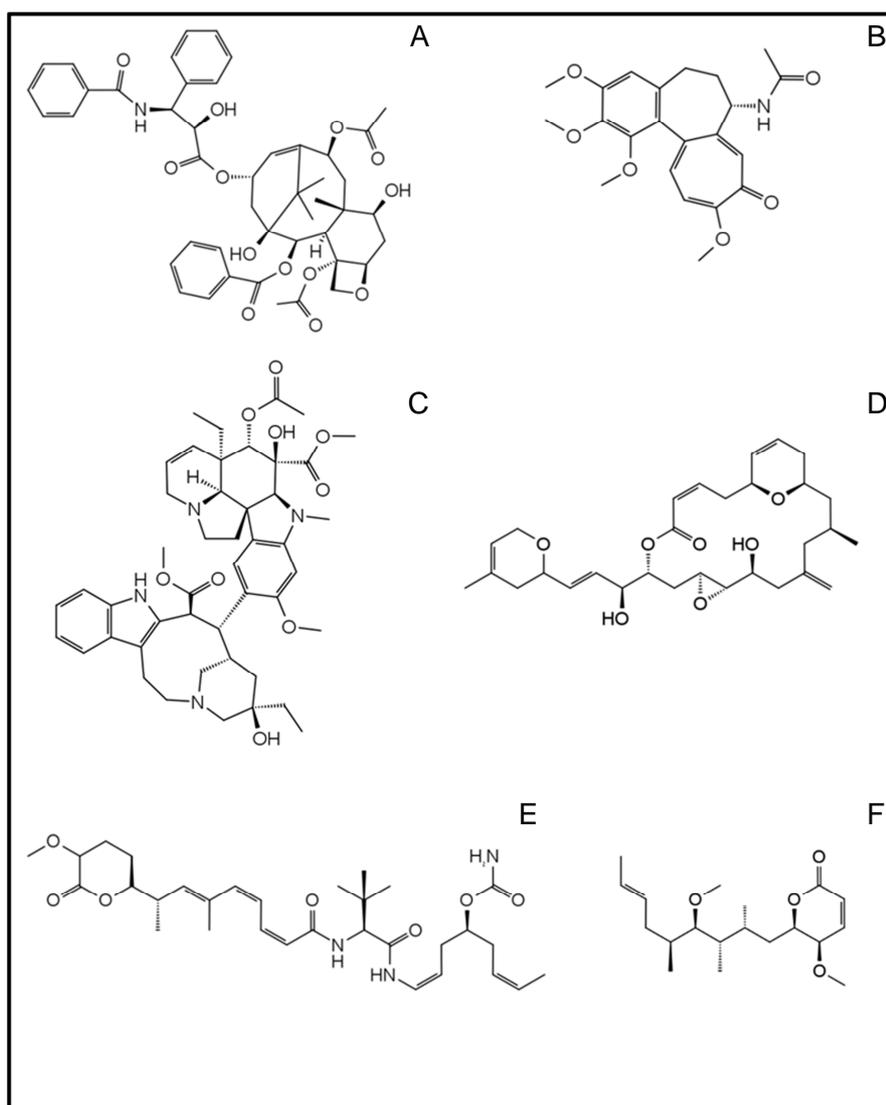


Figure 8: Representation of some of the compounds that interact with tubulin and alter the microtubule dynamics. It is possible to observe the wide heterogeneity in terms of chemical structure. A: Paclitaxel. B: Colchicine. C: Vinblastine. D: Lauimalide. E: PM060184. F: Pironetin.

Since the antimetabolic compounds interfere with microtubule network, many of them also show anti-angiogenic effects (e.g., paclitaxel, vinblastine or combretastatin) because, indirectly, they also affect cell migration and adhesion. Targeting the tumor vasculature is an attractive approach for chemotherapy because of drug accessibility through blood to the metastatic region. The development of new blood vessels is

essential in the new tumor growth, so when drugs destroy the integrity of existing tumor vasculature, the tumoral mass becomes necrotic and die. The key for this approach to succeed is that vessels that supply a metastase are significantly different from those that supply regular tissues: First of them have a high proliferative rate and an increased permeability (Schwartz, 2009; Field *et al.*, 2014). These facts allow to selectively targeting the tumor vasculature.

Additionally there is a second classification of the tubulin targeting compounds that is based on the different binding sites in the protein, where each compound contacts. This classification is more informative because it provides structural information about the targeted site. Nowadays there are six known binding sites: the three classic sites that have been intensively studied (site of paclitaxel, site of colchicine and vinca domain), the site of laulimalide, the recently characterized site of PM060184 and the site of pironetin, the only one which is placed in the α -monomer.

2.3.1. Site of paclitaxel

Paclitaxel was the first MSA, whose effect was described (Schiff *et al.*, 1979). It was originally extracted from the bark of the Pacific yew (*Taxus brevifolia*) in 1962, as a result of a program of the USA to find anticancer compounds from plants. After several years of research, the FDA approved its use in chemotherapy in 1992 (Hussar, 1994) with the trade name of *Taxol*[®].

Paclitaxel has been one of the most widely used chemotherapeutic drugs since its discovery, in a wide variety of cancers, such as breast cancer, ovarian cancer, gastroesophageal cancer, non-small cell lung cancer, Kaposi sarcoma, etc. Both paclitaxel and its known structural analogs (such as docetaxel, commercialized with the trade name of *Taxotere*[®]), can be used as adjuvants, as the main treatment in metastasis or in synergistic combination with other drugs, obtaining satisfactory results in most cases (Jordan and Wilson, 2004).

However, the high toxicity of these compounds (Buey *et al.*, 2007), which is derived from their low specificity for malignant cells, together with the emergence of resistances and the low *in vivo* solubility, have led the expectations of using them in near future, not to be promising.

Some of the most analyzed compounds with natural origin, which are not structural homologues of paclitaxel but bind to the same region, are: epothilones, eleutherobin, discodermolide, dictyostatin, sarcodictyin or the covalent binders cyclostreptin and zampanolide. All of them also act by stabilizing and promoting microtubule polymerization, although each one is at different stages of development. They are intended to be able to reduce or eliminate the drawbacks of the clinical use of paclitaxel (Buey *et al.*, 2005).

There are two associated paclitaxel binding sites and both of them are placed in the β -tubulin subunit. All drugs that bind to the site of paclitaxel, bind with 1:1 stoichiometry, which means that these two sites are mutually exclusive (Díaz *et al.*, 2003; Field *et al.*, 2013). First one was described in 1998 (Nogales *et al.*, 1998) and it is a deep hydrophobic cleft which is located in the luminal surface of the tubulin dimer (figure 9). The two main interactions between tubulin and paclitaxel involve the different rings of its chemical structure. These rings show contacts with the M-loop and with the hydrophobic pocket, which is formed by the histidine 229 and the aspartic acid 226 (Matesanz *et al.*, 2011).

Therefore, when the ligand contacts, the microtubule stability is strengthened because the M-loop (loop which is found between the sheet B7 and the helix H9) is pushed out toward the neighboring protofilament, resulting in more favourable contacts between adjacent protofilaments (Snyder *et al.*, 2001).

Although it was firstly proposed that compounds could enter this site by diffusion, a later model postulated the existence of a secondary binding site, through which ligands access their site on the luminal surface. It was appreciated that binding kinetic is very fast (Díaz *et al.*, 2003), which is an incompatible fact with the access of paclitaxel to the luminal region. In addition, it was also observed that the binding occurred in two steps, so the highly probable existence of a second binding site was reasoned.

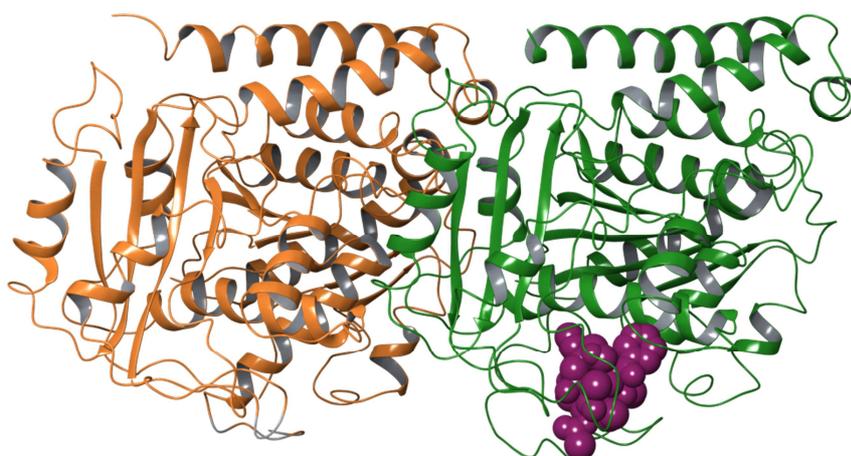


Figure 9: Crystal structure of $\alpha\beta$ -tubulin dimer, bound to paclitaxel. The ribbon diagram that shows α -tubulin on the left, orange and β -tubulin on the right, green. Paclitaxel is represented as purple spheres. Structure extracted from Protein Data Bank (1JFF).

The characterization of the binding of the covalent-binder cyclostreptin to tubulin (Buey *et al.*, 2007), showed residues involved in the contact with the drug, either in the luminal binding site of paclitaxel, such as asparagine 228, or near the type I pore, easily accessible from the microtubule surface, such as threonine 220.

Type I pore is the orifice surrounded by four subunits of tubulin belonging to four different heterodimers.

On the other hand, type II pore is the orifice which is surrounded by four subunits of tubulin belonging to two different heterodimers (Magnani *et al.*, 2009; Barasoain *et al.*, 2010). When the ligand binds to the type I pore, it contacts with the highly flexible loop H6-H7, which belongs to the β -tubulin subunit. Right after this a conformational change takes place, in which the loop is displaced into the lumen, thereby introducing the compound to the internal binding site.

2.3.2. Site of colchicine

Isolated from the poisonous meadow saffron (*Colchicum autumnale*), colchicine was discovered in 1889, many years before paclitaxel (Stafford *et al.*, 2005) and the study of this compound and its interactions allowed the first identification of tubulin (Borisy and Taylor, 1967). Despite the fact that the antimitotic and antivascular potential of the colchicine was early determined, its use as a chemotherapeutic never was

extended because of the high cytotoxicity that it shows (Lu *et al.*, 2012; Canela *et al.*, 2014). Whereas, the FDA approved, in 2009, with the trade name of *Colcrys*[®] (Kesselheim and Solomon, 2010), the use of colchicine in acute gout treatments, and in familial Mediterranean fever, pericarditis or amyloidosis, among other diseases too.

Nowadays, there are numerous described compounds that compete for the same binding site as colchicine, although they could present different poses: podophyllotoxin, nocodazole, combretastatin, pteridine or 2-methoxyestradiol are some examples (Cortese *et al.*, 1977; Barbier *et al.*, 1995; Stafford *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2012). Both colchicine and the other listed compounds, present a 1:1 binding stoichiometry and rapidly destabilize microtubule network (Andreu *et al.*, 1983). Nevertheless, all of them have also a high toxicity due to a marked unspecificity by healthy cells, which can lead to neutropenia (decreased number of neutrophils), anemia or bone marrow damage.

The binding site is a wide region which is located in the interfacial region between the α -subunit and the β -subunit of the same heterodimer (figure 10), mostly buried in the β -subunit (Uppuluri *et al.*, 1993). Ligand mainly contacts with the loop T7, the sheet B9 and the helix H8 of the β -tubulin and also with the loop T5 of the α -tubulin. This binding site is accessible in free dimers, whilst it is occluded in preformed microtubules (Ravelli *et al.*, 2004).

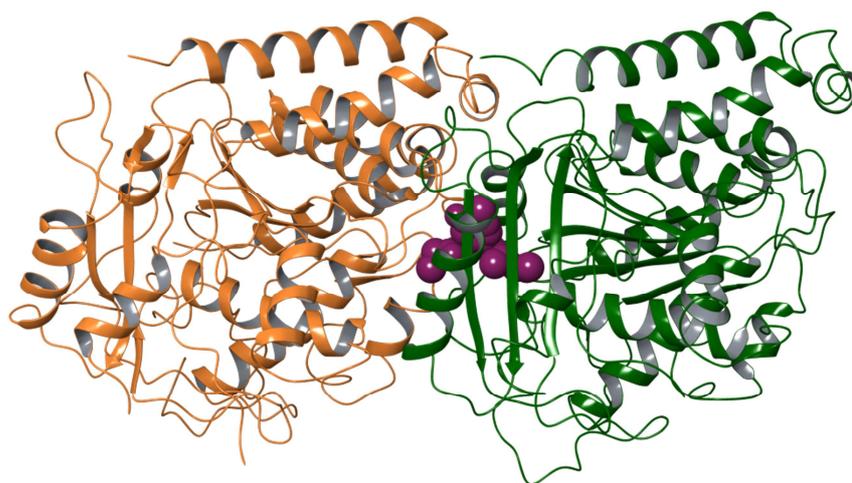


Figure 10: 4.10Å-resolution crystal structure of cow $\alpha\beta$ -tubulin heterodimer, bound to colchicine. The ribbon diagram shows α -tubulin on the left, orange and β -tubulin on the right, green. Colchicine is represented as purple spheres. Structure extracted from Protein Data Bank (1Z2B) (Gigant *et al.*, 2005).

Once binding takes place, the GTPase activity of the colchicine-tubulin complex noticeably increases, by an allosteric effect which is triggered by the binding of the drug. As a consequence, it will promote the appearance of free GDP-tubulin dimers, which are not able to form microtubules. Actually, it has been shown that the binding of colchicine is incompatible with the presence of GTP in the E-site of the same dimer, what reveals that this binding strongly avoids polymerization. Additionally, in the curved binding complex, the M-loop of the β subunit is displaced around 9Å, which is a conformational modification that would lead an steric clash in the binding of two straight tubulins (Ravelli *et al.*, 2004). The consequence of this modification is the prevention of lateral contacts between neighboring protofilaments, a fact that also contributes to depolymerization.

2.3.3. Vinca domain

Antimitotic drugs that target the vinca domain are collectively named as vinca alkaloids. They are dimeric compounds in which an indole and a dihydroindole nuclei are fused together with other complex ring systems (Nagle *et al.*, 2006). Vinca alkaloids were originally isolated from the leaves of the Madagascar pink periwinkle plant (*Catharanthus roseus*) in 1958. Natural products, such as vincristine (Giannakakou *et al.*, 2000) and vinblastine (Na and Timasheff, 1980), are included into this group and are widely and successfully used in the treatment of cancer because of the reduced toxicity. The FDA approved, in 1963, the use of vincristine and in 1965, the use of vinblastine, as chemotherapeutic agents with the trade names of *Oncovin*[®] and *Velban*[®], respectively (Blagosklonny, 2004). Multiple semisynthetic derivatives, such as vinorelbine (*Navelbone*[®]) and vinflunine (*Javlor*[®]), have been also developed, obtaining even higher cytotoxicity toward cancer cells (Ngan *et al.*, 2000; Chi *et al.*, 2015).

Vinca alkaloids have been commonly used in leukemia, some types of sarcoma, pediatric neuroblastoma and small-cell lung cancer in adults, although the dose limiting toxicities depends on each case, according to the different structures. Neurotoxicity is associated with vincristine treatment, while neutropenia is the most serious side effect with the other vinca alkaloids (Risinger *et al.*, 2009).

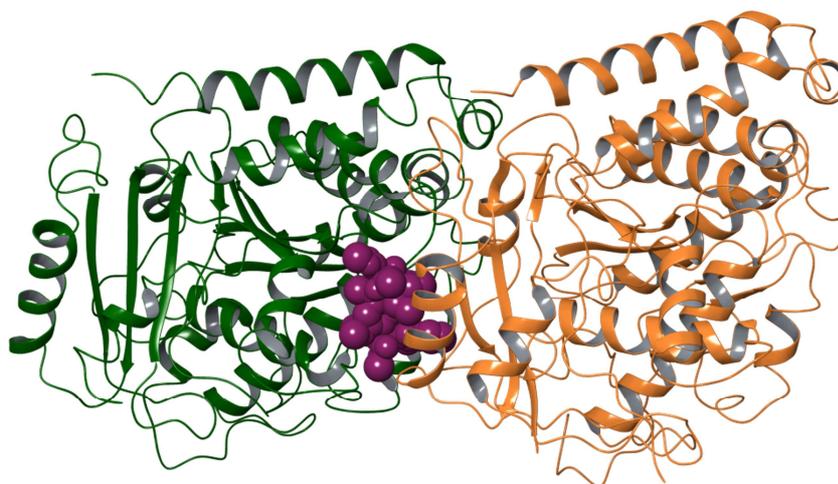


Figure 11: Crystal structure of the vinca domain, occupied by vinblastine. The ribbon diagram shows β -tubulin on the left, green and α -tubulin of the consecutive heterodimer on the right, orange. Vinblastine is represented as purple spheres. Structure extracted from Protein Data Bank (1Z2B).

Even though vinca alkaloids produce a wide range of biochemical effects in cells, such as angiogenesis inhibition or GTPase activity reduction, the main one is related to the intense microtubule depolymerization. At low (nanomolar) concentrations, they are able to arrest cells in metaphase in association with suppression of microtubule dynamics, which decreases the rates of both growth and shortening at the ends of the microtubule (Moudi *et al.*, 2013). However, in the nanomolar range of concentrations, there are no appreciable changes in microtubule mass or spindle organization (Ngan *et al.*, 2000). On the other hand, at higher concentrations (at least a thousand times higher), vinca alkaloids induce the formation of spiral aggregates that lead microtubule disintegration. It has been proposed that such spiral formation constitutes the basic structure in the paracrystals (Himes, 1991; Lobert and Correia, 2000).

Vinca alkaloids bind to their binding domain, mainly at the end of each microtubule with 1:1 stoichiometry. The binding site is located towards the inner lumen, in the interdimeric region (in the middle of two consecutive $\alpha\beta$ -heterodimers) and it plays an important role in the modulation of the lateral contact with other protofilaments. It is boxed in by the carboxy-terminal turn of the helix H6 and the loops T5 and H6-H7 in the β -subunit and by the loop T7, the helix H10 and the sheet B9 in the following α -subunit (figure 11) (Gigant *et al.*, 2005).

When the drug binds, it contacts with both heterodimers and then introduces a wedge at the interfacial region that interferes with tubulin assembly. The binding thereby stabilizes a curved tubulin structure, which is prone to depolymerize (Gigant *et al.*, 2005).

As a consequence of the successful results obtained in the treatment with vinblastine, vincristine, and their derivatives, a wide variety of natural compounds that bind to the same region have been recently discovered, such as halichondrin, hemiasterlin, dolastatin and cryptophycin (Bai *et al.*, 1991; Boukari *et al.*, 2003).

2.3.4. Site of laulimalide

As already stated, the M-loop plays an important role in the lateral contact between protofilaments. It was found that all compounds which bind to the site of paclitaxel act stabilizing the M-loop, although it is also possible to stabilize it, as a result of drug binding to a different binding site. Both laulimalide and peloruside A are natural compounds that bind to this different region with 1:1 stoichiometry (Gapud *et al.*, 2004; Pera *et al.*, 2010). They could be simultaneously present with the compounds of the site of paclitaxel in the same tubulin dimer (figure 12) and they also favour the lateral contacts, so are considered as MSAs (Prota *et al.*, 2014b).

Laulimalide and peloruside A were extracted from marine sponges of the Pacific Ocean (laulimalide from *Cacospongia mycofijiensis* and peloruside A from *Mycale hentscheli*) and both of them maintain their activity in MDR cell lines (Quiñoá *et al.*, 1988; Pryor *et al.*, 2002; Brackovic and Harvey, 2015).

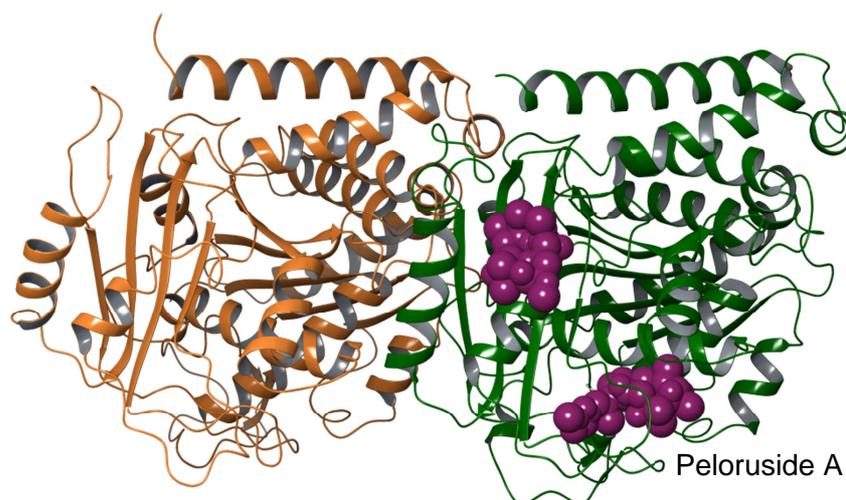


Figure 12: 2.20Å-resolution crystal structure of cow $\alpha\beta$ -tubulin heterodimer, bound to epothilone A and peloruside A. The ribbon diagram shows α -tubulin on the left, orange and β -tubulin on the right, green. Drugs are represented as purple spheres. Structure extracted from Protein Data Bank (4O4L) (Prota *et al.*, 2014b).

The binding site is placed in a β -tubulin pocket that is formed by the helices H9 and H10 and the loop B9-H10 and it is accessible in preformed microtubules. The drug binding induces the stabilization, in a helical conformation, of the segment glutamine 294 – phenylalanine 296 at the C-terminus of the helix H9, what extends the helix by one turn. At the same time, the side-chain of glutamine 294 is shifted by 4.10Å towards the N-terminal base of the M-loop. As a consequence, the M-loop is partially stabilized in a conformation which tends to be associated with the β -subunit of the neighboring protofilament (Prota *et al.*, 2014b). Furthermore, both compounds bind, in the microtubule lattice context, in a manner that facilitates lateral contacts with the helix H3 and the loops H1-B2 and H3-B4 of the neighboring β -tubulin (Churchill *et al.*, 2014).

2.3.5. Site of PM060184

Because of its ability to compete for the binding site with vinca alkaloids, it was initially considered that the ligand PM060184 binds to the vinca domain. Additionally, the powerful destabilizing effect on the microtubule network, the promoted blocking of mitosis in phase G₂/M and the induced formation of tubulin rings supported this hypothesis (Pera *et al.*, 2013), since all these effects were comparable to those observed with vincristine or vinblastine, model ligands for vinca alkaloids. However, a solved crystal structure of tubulin in complex with PM060184 showed that it had found a new binding domain (Prota *et al.*, 2014a).

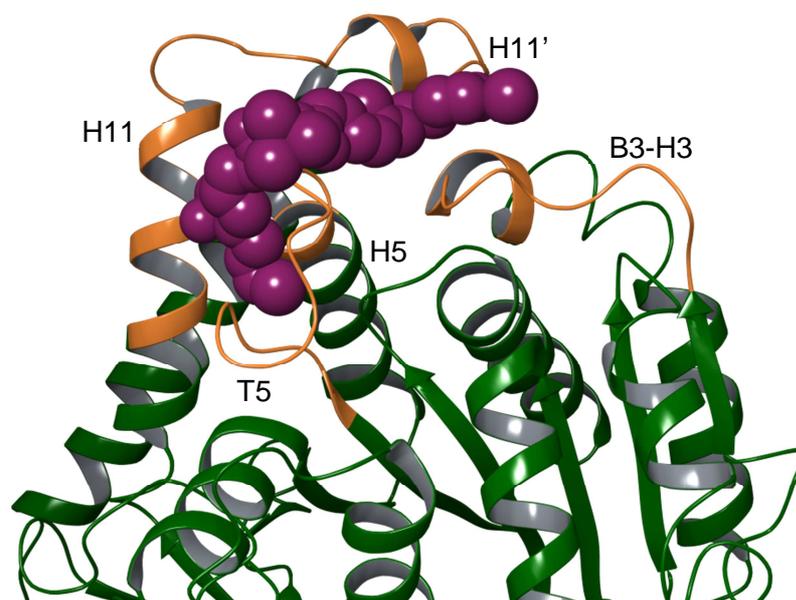


Figure 13: 2.00Å-resolution crystal structure of cow plus end β -tubulin monomer, bound to PM060184. The ribbon diagram shows protein, green, with the secondary structures which are relevant for the contact, highlighted in orange. PM060184 is represented as purple spheres. Structure extracted from Protein Data Bank (4TV9) (Prota *et al.*, 2014a).

PM060184 was isolated from the marine sponge *Lithoplocamia lithistoides* and nowadays, it is currently obtained by total synthesis. It shows effectiveness against MDR tumors *in vivo* and it was proved to bind both to tubulin dimers and also, to the β -tubulin plus end of the microtubule lattice, with the highest known affinity among unassembled tubulin binders (nanomolar range) (Pera *et al.*, 2013).

The binding site is placed in a β -tubulin pocket that is formed by the helices H5 and H11 and the loop B3-H3 and T5 (figure 13). Comparing curved and straight conformational states, it was revealed that drug binding is not affected by the curved-to-straight transition experienced on assembly into microtubules. Thus, it is thus suggested that PM060184 is able to bind to both curved and straight tubulin states.

As a result of the binding process, longitudinal tubulin-tubulin interactions are sterically hindered, since compounds fill the pocket where the helix H8 of α -tubulin is accommodated during the assembly. Additionally, steric clashes are observed between drugs that bind to this site and the loop B9-H10 and the B8 sheet (Prota *et al.*, 2014a). Therefore, these site ligands destabilize microtubules by sequestering tubulin dimers into complexes that have not the ability to assembly.

2.3.6. Site of pironetin

To date, vast majority of described tubulin binders binds to the β -subunit tubulin, whereas very few compounds are known to bind to the α -subunit. The first molecule identified, that targets α -tubulin is called “pironetin”. It is a potent inhibitor of tubulin assembly, which arrests cell cycle in mitosis (Usui *et al.*, 2004), and it was found to maintain their activity in MDR cell lines (Yoshida *et al.*, 2007).

Pironetin was originally isolated from microorganisms of the genus *Streptomyces* although it is also obtained by total synthesis (Gurjar *et al.*, 1996). It is suggested to bind to the α -subunit through a covalent bond with the lysine 352, a residue that belongs to the sheet B9 (Usui *et al.*, 2004). The proposed binding region is delimited by the helix H8, the loop H7-H8 and the sheet B9, so it is facing to the β -tubulin of the contiguous heterodimer (figure 14). Ligand destabilizing effect, therefore, is due to formation of tubulin-drug complexes which are incompetent for assembling.

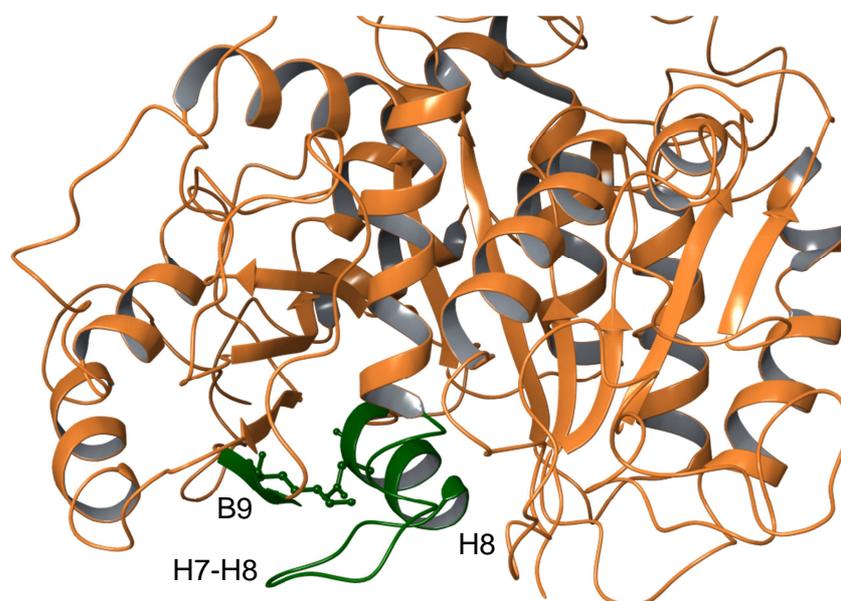


Figure 14: Crystal structure of α -tubulin monomer. The ribbon diagram shows protein, orange, with the proposed secondary structures which are relevant for the contact with pironetin, highlighted in green (Usui *et al.*, 2004). In the suggested binding site, side chains of asparagine 258 and lysine 352 are shown in ball and stick diagram. Structure extracted from Protein Data Bank (1TUB) (Nogales *et al.*, 1998).

The predicted complex between tubulin and pironetin presents two hydrogen bonds between the amino group of the asparagine 258 (which belongs to the helix H8) and the oxygens attached to the C1 and C9 groups of the ligand. The hydrogen bond formed with the oxygen of the C1 group, displaces the electronic density of the pironetin towards the asparagine and, subsequently, the density of the C2-C3 double bond is delocalized. It causes the C3 group to become an electrophilic group that attacks the amino radical of the lysine 352 in order to form a covalent bond.

In addition to the C2-C3 double bond, it is also described that both the oxygen attached to the C9 group and the double bond between C12 and C13 are also essential in the ligand for binding to succeed (Marco *et al.*, 2011).

3. Approaches for designing new drugs

Nature has always represented a massive resource that has supplied mankind with all their necessities. Moreover, the existence of an enormous amount of unexplored natural niches, causes that many human sectors devote special attention to this point.

Medicine has especially served nature to develop treatments for all kind of diseases. Over eons, plants, microorganisms and the life in the seabed have evolved in order to produce toxic compounds for purposes of communication, defense or predation (Cragg *et al.*, 2009). These toxic compounds and their effects on other individuals have aroused great scientific interest through history.

Most successful chemotherapeutic approaches, to date, include the use of drugs also obtained from natural sources: drugs that come from living organisms, from parts of them or from some of their secondary metabolites. Nevertheless, there are still an infinite number of environments to explore, where new drugs could be discovered.

However, all the clinical problems associated with the use of conventional chemotherapies, constitute obstacles to overcome, which have been addressed since therapies were originally developed. Appearance of the MDR phenotype, hypersensitivity reactions caused by poor *in vivo* solubility, undesirable cytotoxic or affinity range are some of the inconveniences to be solved in order to improve the prospects of success of current treatments (Morris and Fornier, 2008).

As technology has progressed, it has been possible to optimize the chemical structures of drugs, based on the characterization of the effect on the cell target. Once this information is known, it is possible to obtain the quantitative structure-activity relationship (QSAR analysis) and determine which functional groups are essential and which ones may benefit the interaction if changed. A slight modification of the ligand can cause large differences in binding affinity for target protein.

Originally, molecular optimization came from the experimental and manual synthesis of molecules. New molecules derived from previously characterized drugs, to which certain molecular determinants are modified, using organic chemistry techniques (Manchukonda *et al.*, 2013).

However, with the advent of bioinformatics, computational techniques have been profusely developed, which allow to firstly *in silico* predict optimal structures and according to the results, synthesizing only most promising molecules. If the crystal three-dimensional structure of a drug target is determined, it is feasible to use computational methods (virtual screening) in order to design drugs that specifically bind to the target protein with an increased effectiveness (Aneja *et al.*, 2006; Katsetos and Dráber, 2012).

By combining organic synthesis and bioinformatics, more precise results are obtained and moreover, a significant cost reduction is achieved.

The ultimate purpose of rational drug design is to generate a pharmacophore for each molecular target, which simplify subsequent designs of new ligands. A pharmacophore is a model which defines the minimum required determinants that a structure should have for binding to occur. The model contains information about the position of hydrophobic centers, aromatic groups and groups prone to form hydrogen bonds (Manetti *et al.*, 2003; Chiang *et al.*, 2009).

A different and quite novel approach for rationally designing new tubulin binders consists on the molecular hybridization of two or more molecules that target different regions of the protein into a single biological entity, which is covalently bound. This is a new concept in drug development that produces new molecules with improved affinity and efficacy. The selection of the two original drugs is based on their expected synergistic pharmacological activities, so the hybrid molecule counterbalances the side-effects associated with the other part of the hybrid. It also amplifies its effect through action on another bio-target, thus minimizing drug resistance (Marco-Contelles and Soriano, 2011; Nepali *et al.*, 2014).

Complementary to rational drug design, it is found the high-throughput screening (HTS). It is an approach to drug discovery that has gained popularity over the last two decades (Macarron *et al.*, 2011) and has become a cornerstone for hit generation in the pharmaceutical industry. It is an automated process of assaying a large number of biological analysis, such as affinity or cytotoxicity determination, in a short period of time by using robotics. Its main goal is to accelerate drug discovery by screening of large compound collections. HTS is an unbiased, random and large scale screening, which does not require prior knowledge of targets or ligands structures and is able to identify novel binding models (Hoelder *et al.*, 2012; Szymanski *et al.*, 2012).

Both rational drug design and HTS aim to discover drugs with improved biochemical characteristics that could be able to win the battle against cancer in a higher percentage of cases.

2

Objetivos

Los tratamientos quimioterapéuticos convencionales adolecen de ciertas limitaciones que reducen considerablemente la probabilidad de éxito, tales como la baja solubilidad del fármaco en soluciones acuosas o la aparición inducida de resistencias. Sin embargo, los hallazgos de los últimos años han permitido alcanzar un mayor conocimiento de los mecanismos de unión, lo que ha provocado la aparición del diseño racional de fármacos destinado a mejorar su eficacia.

En este trabajo se ha estudiado a nivel biológico, bioquímico y estructural la actividad de una molécula con estructura química novedosa, de la que previamente se conocía un efecto citotóxico. También se analizó el efecto de una serie de modificaciones sobre dicho ligando parental, con la pretensión de determinar la implicación de los diferentes determinantes estructurales sobre su actividad.

Para lograrlo, se fijaron los siguientes objetivos concretos:

1. Evaluación de la actividad citotóxica de los compuestos objeto de estudio.
2. Determinación de la diana biológica sobre la que se ejerce la acción.
3. Caracterización del sitio de unión, de la conformación de los ligandos unidos y de sus mecanismos moleculares de acción.
4. Medición de los parámetros bioquímicos que describen la interacción ligando-diana, tales como las estequiometrías de unión, las constantes de afinidad o las constantes cinéticas de reacción.
5. Exploración de la relación entre las modificaciones estructurales de los diferentes compuestos investigados y sus respectivas actividades y optimización de la estructura química.
6. Comparación entre los efectos observados por acción de los ligandos de la serie CSCD y aquellos inducidos por fármacos modelo.

3

Materiales y métodos

1. Productos, tampones y ligandos

1.1. Productos

El dodecil sulfato sódico (SDS), el ácido glicol-éter-diaminotetraacético (EGTA), el ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico (MES), el imidazol, el acetonitrilo, el borohidruro sódico, el tritón X-100, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el polietilenglicol (PEG), el yoduro de propidio, la insulina, el PIPES, el HEPES, el isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), la seroalbúmina bovina, el suero fetal bovino, el Hoechst 33342, el anticuerpo monoclonal DM1A, el anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina de ratón marcado con FITC (G α Mlg), el guanosín trifosfato (GTP), el guanosín difosfato (GDP) y el $\beta\gamma$ -metilen-adenosín trifosfato (APPCP) se obtuvieron de la empresa Sigma-Aldrich. El medio de cultivo RPMI-1640, así como todos los suplementos necesarios para el crecimiento de las líneas celulares: L-glutamina, gentamicina, penicilina/estreptomina y piruvato sódico, fueron adquiridos a Gibco. El Sephadex G25, el DEAE Sephadex A50, la Q Sefarosa y el Superdex 75 procedieron de General Electric Healthcare. El glutaraldehído fue de Emscope. El cloruro de guanidinio, de United States Biochemical Corporation. El dimetilsulfóxido de grado de espectroscopía (DMSO), el dimetilsulfóxido deuterado de grado de espectroscopía (D₆-DMSO), el metanol de grado analítico, el etanol de grado de espectroscopía, el diclorometano de grado analítico, el fosfato monosódico y el disódico de grado analítico, el cloruro de calcio de grado analítico, el cloruro de magnesio de grado analítico, el cloruro de potasio de grado analítico, el cloruro de sodio de grado analítico, el ácido

etilen-diaminotetraacético (EDTA), el sulfato de amonio puro y para análisis, el tris-(hidroximetil)-aminometano de grado analítico (Tris), la sacarosa, el ditiotreitól (DTT), el acetato de uranilo, la N,N-dimetilformamida (DMF), el glicerol y el formaldehído se obtuvieron de Merck. La doxorubicina (o adriamicina), de Calbiochem. El azul de tripano se obtuvo de Serva (Feinbiochemica, Heidelberg). La ARNasa A, la ADNasa y los inhibidores de proteasas fueron de Boehringer Mannheim GmbH.

1.2. Tampones

1. Tampón GAB mM GTP: 10mM fosfato sódico (1:1 $\text{NaH}_2\text{PO}_4:\text{Na}_2\text{HPO}_4$), 3.4M glicerol, 1mM EGTA, mM GTP y 6mM MgCl_2 , pH 6.7.
2. Tampón PEDTA mM GTP y x'mM MgCl_2 : 10mM fosfato sódico (1:1 $\text{NaH}_2\text{PO}_4:\text{Na}_2\text{HPO}_4$), 1mM EDTA, mM GTP y x'mM MgCl_2 , pH 7.0.
3. Tampón NaPi: 10mM fosfato sódico (1:1 $\text{NaH}_2\text{PO}_4:\text{Na}_2\text{HPO}_4$) y 0.1mM GTP, pH 7.0.
4. Tampón DTT: 10mM fosfato sódico (1:1 $\text{NaH}_2\text{PO}_4:\text{Na}_2\text{HPO}_4$), 0.1mM DTT, 0.1mM GTP y 1.5mM MgCl_2 , pH 6.5.
5. Tampón PD10: 15mM PIPES, 0.2mM EGTA, 0.1mM GDP y 0.3mM MgCl_2 , pH 6.8.
6. Tampón T₂RT: 1mM APPCP, 10mM DTT y 0.1mM GDP en tampón PD10.
7. Tampón RB3-A: 20mM Tris, 1mM EGTA y 2mM DTT, pH 8.0.
8. Tampón RB3-B: 20mM Tris, 1mM EGTA, 1M NaCl y 2mM DTT, pH 8.0.
9. Tampón RB3-C: 10mM HEPES, 150mM NaCl y 2mM DTT, pH 7.2.
10. Tampón 1M MES-Imidazol: 0.55M MES y 0.45M Imidazol, pH 6.7.
11. Tampón PBS: 8.1mM Na_2HPO_4 , 1.5mM NaH_2PO_4 , 137mM NaCl y 2.7mM KCl, pH 7.2.
12. Tampón PEM: 0.1M PIPES, 1mM EGTA y 2mM MgCl_2 , pH 6.8.
13. Tampón glicina: 0.13M glicina/NaOH, 0.2M NaCl y 70% glicerol, pH 8.6.

1.3. Ligandos

El paclitaxel, de nombre comercial taxol, fue donado por el Dr. Suffness del National Cancer Institute (Bethesda, Estados Unidos). El 7-0-[2,7-difluoro-4'-(fluoresceín-carbonil)-L-alanil]-paclitaxel (flutax-2), fue sintetizado en el laboratorio del Dr. Fang del Instituto de Materia Médica (Pekín, China). El docetaxel fue adquirido a la empresa farmacéutica Rhône Poulenc Rorer, Aventis (Schiltigheim, Francia). La laulimalida fue proporcionada por el Dr. Northcote de la Universidad Victoria (Wellington, Nueva Zelanda). Tanto la podofilotoxina como la vinblastina se obtuvieron de Sigma-Aldrich, mientras que el compuesto PM060184 provino de la empresa farmacéutica Pharmamar, Grupo Zeltia (Madrid).

Finalmente, los siete compuestos objeto de estudio en esta memoria (tabla 1) constituyen una serie denominada CSCD, que fue recibida de parte de la empresa biotecnológica suiza Syngenta, Novartis (Stein, Suiza).

Todos los compuestos se recibieron en estado sólido (polvo) y fueron disueltos a una concentración de 20mM o 50mM, dependiendo de la solubilidad, en D₆-DMSO. Como excepción, la vinblastina fue disuelta a una concentración de 50mM en agua Mili-Q, al tratarse de un compuesto con una buena solubilidad en dicho medio.

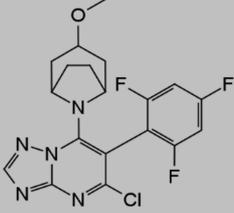
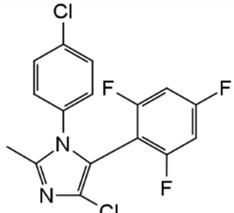
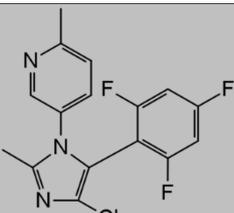
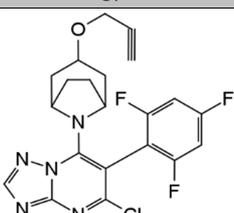
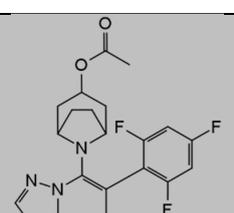
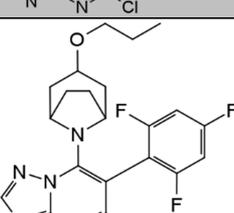
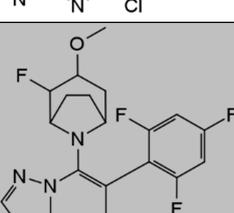
Compuesto	Código	Peso molecular (Da)	Estructura química
CSCD062122	1	423.82	
CSCD625957	2	356.16	
CSCD633965	3	337.73	
CSCD084565	4	447.85	
CSCD084665	5	451.84	
CSCD087953	6	451.88	
CSCD101098	7	441.82	

Tabla 1: Compuestos de la serie CSCD: Nombre, código empleado en la presente memoria, peso molecular y estructuras químicas.

La nomenclatura sistemática del compuesto parental, CSCD062122 (1) es 5-cloro-7-((1R, 5S)-3-metoxi-8-azabicyclo-[3.2.1]-octan-8-il)-6-(2, 4, 6-trifluorofenil)-[1, 2, 4]-

triazol-[1, 5- α]-pirimidina. Los compuestos **2** y **3**, substituyen el anillo central triazol-pirimidina del compuesto **1** por un 4-cloro-2-metil-imidazol. Además, substituyen el azabicyclo original por un 4-clorofenilo y una 2-metilpirimidina, respectivamente.

Por otro lado, el resto de compuestos de la serie (**4**, **5**, **6** y **7**) presentan estructuras químicas notablemente más semejantes a la del compuesto parental. Tal y como puede observarse en la tabla 1, estos ligandos intercambian el radical metóxido unido al azabicyclo por distintos substituyentes y, adicionalmente, el compuesto **7** presenta un radical flúor en la posición 2 del mismo anillo doble.

En cuanto a los demás ligandos empleados, las estructuras químicas del paclitaxel, vinblastina, laulimalida y PM060184 pueden encontrarse en la figura 8, en el capítulo de Introducción (*vide supra*). En la figura 15 se representan las estructuras tanto del flutax-2, como del docetaxel y de la podofilotoxina.

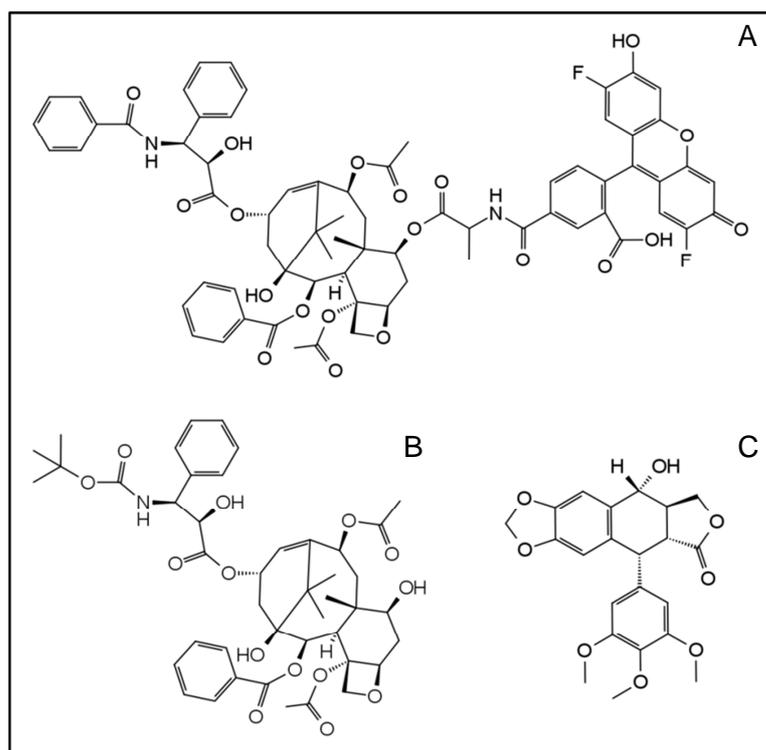


Figura 15: Estructuras químicas del flutax-2 (A) y del docetaxel (B), ligandos que se unen en el sitio del paclitaxel y de la podofilotoxina (C), que se une al sitio de la colchicina.

2. Caracterización de los compuestos

2.1. Espectrofotometría en el espectro ultravioleta-visible

Las medidas de absorbancia de luz en el espectro ultravioleta-visible se realizaron en un espectrofotómetro de doble haz Evolution 201 (Thermo Scientific), en cubetas de cuarzo de 1cm de paso óptico, a 25°C.

La determinación del coeficiente de extinción molar (ϵ) se realizó midiendo el espectro de absorbancia de muestras de los siete ligandos a una concentración de 20 μ M, disueltos en etanol de grado de espectroscopía. Se consideraron las bandas de absorción en los máximos relativos en el intervalo entre 240nm y 340nm.

Para evitar posibles errores de medida causados por un solapamiento entre la señal de la molécula a estudio y la del disolvente (DMSO), se recogieron adicionalmente los espectros de absorbancia de las mismas muestras entre 200nm y 340nm, por HPLC a 25°C. Para ello, dichas muestras se analizaron en un cromatógrafo Agilent 1100 Series acoplado a una columna de fase reversa ZORBAX Eclipse XDB-C18 (15cm x 4.6mm), con un sistema isocrático compuesto por metanol de grado analítico 70% en agua durante 20min a un flujo de 1mL/min.

2.2. Determinación de la solubilidad

La solubilidad en medio acuoso se determinó por centrifugación de muestras de los siete ligandos a una concentración de 50µM en tampón GAB 0.1mM GTP, en una centrífuga Beckman Optima™ TLX, a 25°C. Se ensayaron diferentes condiciones: 20min de reposo en un tubo de polipropileno (*Eppendorf*®), 20min de reposo en un tubo de vidrio, centrifugación durante 20min a 50krpm (108628g) y centrifugación durante 60min a 100krpm (434513g). A continuación, se compararon los espectros de absorbancia de cada muestra (del sobrenadante en las muestras centrifugadas) entre 240nm y 340nm, frente a la señal inicial de cada compuesto, determinándose la solubilidad como la concentración de ligando disuelta en las condiciones menos favorables.

2.3. Espectrometría de masas

Para la determinación de la pureza se analizaron, con un HPLC acoplado a una columna C18 y a un espectrómetro Agilent 6120 Quadrupole con un sistema de ionización por electroespray, 20µL de cada ligando a una concentración de 50µM. Las muestras fueron analizadas con un sistema isocrático compuesto por metanol 70% en agua, durante 20min a un flujo de 1mL/min, a 25°C. Los parámetros del detector fueron configurados a 275°C, 4000V de voltaje de capilar y 150V de fragmentador y se empleó nitrógeno gaseoso puro como solvente.

3. Ensayos de biología celular

3.1. Líneas celulares

La línea celular humana de carcinoma de ovario A2780, donada por la Dra. Giannakakou del Weill Cornell Medical College (Nueva York, Estados Unidos), su variante multirresistente a fármacos por sobreexpresión de glicoproteína-P, A2780AD y la línea de carcinoma humano de pulmón de células no pequeñas A549, procedente de la ATCC (Colección americana de cultivos tipo; del inglés, *American type culture collection*) fueron cultivadas en medio RPMI-1640. Dicho medio fue suplementado con un 10% v/v de suero fetal bovino, 2mM de L-glutamina, 40µg/mL de gentamicina, 100UI/mL de penicilina y 100µg/mL de estreptomycin. Las líneas A2780 y A2780AD fueron complementadas adicionalmente con 0.25UI/mL de insulina bovina. La línea celular A2780AD, con el fenotipo MDR, fue seleccionada mediante el cultivo repetido (9 tratamientos) de la línea sensible A2780, en un medio enriquecido con una concentración de doxorubicina por encima del valor de la CI_{50} teórica de dicha línea sensible y por debajo del valor de la resistente (1µM) (Grosse *et al.*, 1998).

3.2. Citotoxicidad

Con el fin de evaluar el efecto citotóxico de los compuestos de la serie CSCD, se sembraron células de las líneas A2780 y A2780AD a una densidad de 120000 y 200000 células/mL respectivamente, en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se añadieron 80 µL y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24h. Al cabo de ese tiempo, se añadieron otros 20 µL de medio con diluciones seriadas de ligando cubriendo un rango de concentraciones amplio y sin exceder un 0.5% v/v máximo de DMSO y se incubó la placa, de nuevo, otras 48h.

A continuación se realizó el ensayo de viabilidad del MTT modificado (Smith *et al.*, 1988). Se añadieron 20 µL de MTT (2.5mg/mL) en cada pocillo y se dejó 4h más en incubación. El MTT es un compuesto metabolizado por el enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células metabólicamente activas, produciendo un compuesto azulado (formazán). Así pues, la concentración de formazán es directamente proporcional al número de células vivas. Al cabo de las últimas 4h de incubación, se disuelven los complejos de formazán generados, con una mezcla de 10% SDS y 45% DMF, pH 5.5. Tras media hora en agitación, se midió la absorbancia de la placa a 595nm y, en paralelo, a 690nm (esta segunda medida se utiliza para corregir la señal de fondo), con un lector de placas Thermo Scientific Appliskan. Los valores de CI₅₀ (concentración de ligando a la cual, se observa una inhibición del crecimiento celular de un 50%) se determinaron a partir de la representación de los valores de absorbancia frente a la concentración de ligando. El ajuste de los puntos a un modelo sigmoidal de dosis-respuesta revela el parámetro deseado. Se realizaron, al menos, cuatro medidas para cada ligando estudiado, incluyendo el paclitaxel y la vinblastina como controles.

3.3. Ciclo celular

El efecto de los ligandos sobre la progresión del ciclo celular se determinó en un citómetro de flujo Coulter Epics XL sobre células de la línea A549 (Andreu y Barasoain, 2001). Previamente, se incubaron 180000 células/mL en placas de 24 pocillos, con 1mL en cada uno y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24h. A continuación, se añadió en cada pocillo diferentes concentraciones de ligando (cubriendo un amplio rango y sin exceder un 0.5% v/v máximo de DMSO) y se incubó, de nuevo, a 37°C durante 20h más. Se lavaron entonces con PBS y se fijaron con etanol 70% en agua a 4°C, durante, al menos, 2h. Posteriormente, se realizaron dos lavados más con PBS y luego, se resuspendieron en 500 µL de PBS con 60 µg/mL de ARNasa A libre de ADNasa y 50 µg/mL de yoduro de propidio (tinción de ADN) y se incubaron a 37°C durante 30min. Finalmente, las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo.

Este análisis se realizó para los siete compuestos de la serie CSCD y además, para el paclitaxel y la vinblastina como controles. Adicionalmente, se añadió un control con el mismo volumen de DMSO utilizado en las demás muestras.

3.4. Inmunofluorescencia indirecta

Mediante una tinción fluorescente de la tubulina y del material genético en células A549 y su posterior observación con un microscopio óptico, fue posible determinar el efecto de los ligandos sobre la red de microtúbulos, la mitosis y la

morfología de los núcleos celulares en la línea celular seleccionada. Para la realización de este experimento, se sembraron células A549 a una densidad de 130000células/mL en placas de 24 pocillos, en los que se colocaron previamente cubreobjetos redondos de 12mm en el fondo. Las placas se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24h. Después de este tiempo, se añadieron concentraciones crecientes de los ligandos (cubriendo un amplio rango y sin exceder un 0.5% v/v máximo de DMSO) y se incubó, de nuevo, a 37°C durante 20h más. Luego, para evitar la pérdida de células despegadas, se centrifugaron las placas durante 5min a 1500rpm (470g) en el tampón estabilizante de microtúbulos PEMP (PEM con 4% PEG). A continuación, se permeabilizó cada cubreobjetos (con las células adheridas a ellos) durante 90 segundos con 0.5% tritón X-100 en PEM y entonces, se fijaron con 3.7% formaldehído disuelto en PEM, durante 30min (de Inés *et al.*, 1994). Después de realizar lavados con PBS, los cubreobjetos fueron incubados con el anticuerpo monoclonal contra α -tubulina DM1A a una dilución 1/400 en PBS con 3% BSA durante 1h a 37°C. Más tarde, tras lavar de nuevo en PBS para eliminar los restos del anticuerpo primario no unido, se incubó el anticuerpo secundario de cabra contra inmunoglobulina de ratón (marcado con FITC, a una dilución 1/200 en PBS con 3% BSA durante 1h a 37°C. En último lugar, después de los correspondientes lavados con PBS, se incubó el marcador de ADN Hoechst 33342 en una dilución 1/100 en PBS durante 30min. Los cubreobjetos tratados se montaron sobre portaobjetos convencionales, añadiendo 15 μ L de tampón glicina para conservar la preparación. Cada una de ellas fue finalmente fotografiada con un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan equipado con una cámara fotográfica CMOS Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V2 C11440, con un objetivo de 100X.

4. Proteínas

4.1. Purificación de tubulina

La tubulina empleada en el presente trabajo se obtuvo de cerebros vacunos con menos de 12 meses, cedidos por el Matadero Municipal Vicente de Lucas de Segovia y por el Matadero Incova Centro Cárnico de El Espinar (Segovia). De acuerdo a la literatura (Andreu, 2007), en primer lugar se homogeneizaron en frío 6 cerebros con un homogeneizador de aspas y se eliminaron las membranas celulares por centrifugación. Esta centrifugación se llevó a cabo con dos rotores SLA3000 y dos centrifugas Sorvall RC-5C Plus durante 35min a 11krpm (20449g) y 4°C. A continuación siguió una precipitación fraccionada en dos partes: primero con sulfato amónico (32%) y a continuación con sulfato amónico (43%), siendo ambas centrifugaciones también de 35min a 11krpm (20449g) y 4°C. Luego, se resuspendió el precipitado y se realizó una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex A50. Para ello, en primer lugar se mezcló la muestra con la resina y se secó con una bomba de vacío. A continuación, se lavó la mezcla seca, primero, con una solución 0.4M de KCl para eluir otras proteínas y más tarde con una solución 0.8M de KCl para eluir la tubulina. Dicho eluido se precipitó entonces con sulfato amónico para análisis (43%) y el correspondiente precipitado se cargó en una columna de cromatografía de filtración en gel Sephadex G25. Aquellas fracciones resultantes que contenían tubulina funcional fueron seleccionadas mediante una precipitación con 30mM de cloruro de magnesio. El exceso de magnesio se eliminó a continuación con una diálisis, utilizando membranas de diálisis

Slide-a-lyzer de Thermo Scientific, durante 16h en una solución crioprotectora (1M de sacarosa o 33% v/v de glicerol). En último lugar, se determinó la concentración de la solución resultante, realizando diluciones 1/200 en 6M de cloruro de guanidinio, donde el coeficiente ϵ de la tubulina a 275nm es de $109000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Andreu *et al.*, 1984).

Al inicio de cada experimento con tubulina, una alícuota conservada en nitrógeno líquido fue descongelada y equilibrada en el tampón adecuado, sin magnesio, mediante cromatografía de filtración en gel Sephadex G25 (25cm x 0.9cm). Las fracciones con proteína fueron identificadas mediante la lectura de la absorbancia a 295nm y aquellas con mayor absorbancia fueron centrifugadas durante 20min a 50krpm (108628g) y 4°C, con un rotor TLA120.2. Finalmente, se midió la absorbancia a 275nm de una disolución 1/20 del sobrenadante (tubulina activa) en 10mM fosfato sódico, 0.1% SDS, pH 7.0, donde el coeficiente ϵ de la tubulina es de $107000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Andreu *et al.*, 1984).

4.2. Microtúbulos estabilizados

Para la preparación de microtúbulos estabilizados, se partió de 40mg de tubulina que se equilibró en tampón GAB 0.1mM GTP (sin magnesio). Después de centrifugar y medir la concentración resultante, se añadió 6mM de cloruro de magnesio y hasta 1mM de GTP a la solución con la proteína. Se incubó después dicha solución en un baño a 37°C durante 30min para inducir el ensamblaje y a continuación, se añadió glutaraldehído a una concentración de 20mM para estabilizar el polímero y se incubó de nuevo durante 10min más. El exceso de glutaraldehído se eliminó más tarde al incubar sobre hielo la muestra con 40mM de borohidruro sódico durante 10min. Como consecuencia de la reacción producida con el borohidruro sódico se libera hidrógeno gaseoso, que forma espuma. Así pues, dicha espuma se eliminó mediante pulsos suaves de centrifugación. La muestra fue dializada hasta el día siguiente frente al tampón sin magnesio y por último, fue congelada gota a gota sobre nitrógeno líquido y almacenada (también en nitrógeno líquido). En estas condiciones, los microtúbulos obtenidos son estables durante largos períodos de tiempo. (Díaz *et al.*, 2000).

4.3. Determinación de la concentración de sitios de unión en microtúbulos estabilizados

Una vez congelados los microtúbulos sobre nitrógeno líquido, se determinó espectrofotométricamente la concentración de éstos en una muestra diluida en el tampón de diálisis. Para ello, se prepararon diluciones con una concentración final de 2 μM de microtúbulos y se incubaron 30min a 25°C con 5 μM de flutax-2, en presencia o ausencia de 100 μM de docetaxel. Las muestras se incubaron luego durante 20min a 50krpm (108628g) y 25°C con un rotor TLA100, para sedimentar los microtúbulos. Una vez terminada dicha centrifugación, se separó el sobrenadante del precipitado y se resuspendió éste último en 10mM fosfato sódico, 0.1% SDS, pH 7.0. Después, se realizaron diluciones 1/5 en 10mM fosfato sódico, 0.1% SDS, pH 7.0 y se determinó la concentración de flutax-2 en cada fracción, obteniendo para ello los espectros de fluorescencia con un lector de placas Thermo Scientific Varioskan Flash, empleando longitudes de onda de excitación y de emisión de 495nm y 520nm, respectivamente.

La diferencia entre la concentración de flutax-2 en el precipitado en ausencia de docetaxel y la concentración de flutax-2 en el precipitado en presencia de docetaxel,

revela la concentración de sitios totales (en $2\mu\text{M}$ inicial). También es posible calcular el mismo valor al restar la concentración de flutax-2 en el sobrenadante en presencia de docetaxel, de la concentración de flutax-2 en el sobrenadante en ausencia de docetaxel.

4.4. Purificación de RB3

El plásmido pET-3d con el material genético que codifica para la proteína RB3 y para un gen de resistencia a ampicilina, fue donado por el Dr. Steinmetz del Paul Scherrer Institut (Villigen, Suiza). Para purificar la proteína RB3, se llevó a cabo una transformación del plásmido en la cepa bacteriana *Escherichia coli* BL21 (DE3), mediante choque térmico. Entonces, las células transformadas se seleccionaron mediante el crecimiento en placas con ampicilina. A continuación, se incubaron los transformantes en agitación a 140rpm y 37°C en un agitador orbital New Brunswick Scientific I26 hasta que se alcanzó una densidad óptica de 0.6u. A. En ese momento, se inició la sobreexpresión del plásmido inducida por IPTG (1mM) y se mantuvo la incubación durante 4h más. A continuación, se realizó una precipitación (con un rotor SLA3000) y una posterior resuspensión del precipitado en tampón RB3-A, en presencia de ADNasa e inhibidores de proteasas. Más tarde, se lisaron las células y se centrifugó el lisado durante 15min a 12krpm (16696g) y 4°C con un rotor Ti45. Se hirvió después el sobrenadante a 95°C durante 10min y se centrifugó de nuevo durante 1h a 36krpm (150264g) y 4°C . El sobrenadante resultante fue cargado en una columna de intercambio aniónico en gel Q Sefarosa, eluyendo con un gradiente 0%-50% de tampón RB3-B sobre el tampón RB3-A. Tras comprobar mediante electroforesis, las fracciones recogidas que contenían la proteína RB3, se concentraron juntas hasta 5mL. Este volumen se cargó luego en una columna de gel filtración en gel Superdex 75 (60cm x 1.6cm), empleando para ello el tampón RB3-C. Se determinaron por último, las fracciones con la proteína mediante electroforesis, se concentraron juntas hasta un volumen final de 1mL y se calculó la concentración por espectrofotometría, siendo el coeficiente ϵ a 280nm de $1490\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Barbier *et al.*, 2010). La muestra final se alicuotó en fracciones de $200\mu\text{L}$, siendo conservadas en nitrógeno líquido.

Para confirmar la concentración real de las alícuotas congeladas con RB3, se realizó una cromatografía de alta resolución de gel filtración con una columna Tosoh Bioscience TSKgel G4000SW_{XL} asociada al HPLC, empleando el tampón DTT como fase móvil a un flujo de $0.5\text{mL}/\text{min}$. Se determinó la relación entre dímeros y tetrámeros de muestras con $10\mu\text{M}$ de tubulina, incubadas a 25°C durante 30min en tampón DTT, en presencia de concentraciones de RB3 comprendidas entre $2\mu\text{M}$ y $3\mu\text{M}$ ($0.05\mu\text{M}$ de incremento entre cada muestra). Dado que una concentración de RB3 de $2.5\mu\text{M}$ genera una relación dímero-tetrámero de 1:1 en $10\mu\text{M}$ de tubulina, el experimento permite confirmar la concentración de RB3 determinada espectrofotométricamente.

5. Ensayos bioquímicos de interacción tubulina-ligando

5.1. Espectrofluorimetría

Los espectros de fluorescencia fueron obtenidos en un fluorímetro Horiba Jovin Yvon Fluoromax-2, a 25°C . Se midieron, por triplicado, muestras con una concentración de ligando de $10\mu\text{M}$ (1, 4, 5, 6 ó 7), que fueron previamente incubadas a 25°C durante

30min en presencia o ausencia de 10 μ M de tubulina. A continuación, todas las muestras fueron analizadas, excitando en el máximo de absorbancia del compuesto (en torno a 320nm), y registrando la emisión entre 330nm y 600nm. Se utilizó una cubeta transparente de cuarzo de 1cm de paso óptico, y se fijaron las aperturas de los haces de excitación y de emisión a 2nm y 5nm, respectivamente.

5.2. Ensayos de modulación del ensamblaje mediada por ligando

Con el fin de determinar el efecto *in vitro* de los ligandos sobre el ensamblaje de la tubulina, se equilibró la proteína en tampón GAB 1mM GTP y 6mM MgCl₂ y, en paralelo, también en tampón PEDTA 1mM GTP y 7mM MgCl₂. Se incubaron, por triplicado, muestras con 20 μ M de tubulina y 22 μ M de ligando problema. Adicionalmente, se determinó el efecto del DMSO, como control sin ligando, el de la podofilotoxina, como control negativo y el del docetaxel, como control positivo. Por último, se estudió únicamente en tampón GAB, el efecto de un exceso del 10% c/c del compuesto **1**, de DMSO, de docetaxel y de vinblastina sobre 10 μ M, 25 μ M, 30 μ M y 40 μ M de tubulina.

Las muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos y a continuación, se centrifugaron durante 20min a 50krpm (108628g) y 37°C en una centrífuga Beckman Optima™ TLX con un rotor TLA100. Después, se separaron sobrenadante y precipitado, y se resuspendió dicho precipitado en 10mM fosfato sódico, 0.1% SDS, pH 7.0. A continuación, se diluyeron ambas fracciones 5 veces, de tal manera que la composición final de la muestra contuviese una parte de tampón y cuatro de 10mM fosfato sódico, 0.1% SDS. La concentración en todas las fracciones fue determinada fluorimétricamente con un lector de placas Thermo Scientific Varioskan Flash, empleando unas longitudes de onda de excitación y de emisión de 280nm y 323nm, respectivamente.

5.3. Unión a microtúbulos estabilizados

Para la determinación de la unión de los compuestos objeto de estudio a microtúbulos estabilizados, se incubaron dichos microtúbulos a una concentración de 20 μ M en presencia de 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 30 μ M ó 50 μ M de compuesto **1**, en el tampón en el que se dializaron los microtúbulos cuando fueron preparados (sección 4.2 del presente capítulo). La incubación se realizó a 37°C durante 30min y luego, se centrifugaron las muestras durante 20min a 50krpm (108628g) y 37°C en una centrífuga Beckman Optima™ TLX con un rotor TLA100. Una vez concluida la centrifugación, se separó el sobrenadante del precipitado y se resuspendió dicho precipitado en 10mM fosfato sódico, pH 7.0. Luego, se añadió docetaxel (10 μ M) en cada fracción a modo de estándar interno y después, se extrajeron todas tres veces con un volumen de diclorometano (los compuestos problema son más solubles en diclorometano que en el tampón acuoso). A continuación, las muestras extraídas en diclorometano se secaron al vacío con un concentrador Savant Speed Vac, se resuspendieron en 50 μ L de metanol al 70% y fueron analizadas por HPLC. El equipo se conectó a una columna de fase reversa C18 y se empleó un flujo constante de 1mL/min y, como fase móvil, el mismo metanol 70% con el que se resuspendieron las muestras. La concentración de cada compuesto en cada muestra se calculó mediante la integración del área del pico correspondiente en el cromatograma resultante, normalizándose por el área del pico del estándar interno, indicativo éste del rendimiento de la extracción con diclorometano.

5.4. Unión a dímeros de tubulina

Para comprobar la posible unión de los ligandos de la serie CSCD a dímeros, en primer lugar se equilibró la tubulina en tampón PEDTA 0.1mM GTP y 1.5mM MgCl₂. Se incubó entonces una muestra con una concentración de 20μM de proteína y un exceso del 10% c/c del compuesto PM060184, a 25°C durante 30min. De este modo se forman dímeros estabilizados de tubulina, ya que su región interdimérica se bloquea al unirse el compuesto con alta afinidad (Pera *et al.*, 2013).

A continuación, se incubó la mezcla de tubulina y PM060184 en presencia de 0, 5μM, 10μM, 20μM, 30μM ó 40μM de compuesto **1** durante 30min a 25°C. Tras este período de tiempo, se centrifugaron las muestras en una centrífuga Beckman Optima™ TLX con un rotor TLA100 durante 2h a 100krpm (434513g) y 25°C y después, se separaron la mitad superior de la mitad inferior. Se llevó el volumen entonces hasta 200μL, se añadió docetaxel como estándar interno (10μM), se extrajeron todas las fracciones con diclorometano, se secaron, resuspendieron en la fase móvil y procesaron por HPLC, tal y como se encuentra detallado en la sección 5.3 del presente capítulo. En paralelo, a partir de alícuotas de 20μL de cada fracción se determinó la concentración de tubulina por la reacción del BCA a 562nm (Smith *et al.*, 1985).

5.5. Ensayos de desplazamiento de flutax-2

El ensayo de desplazamiento de flutax-2 permite determinar si existe competición entre los compuestos objeto de estudio y el sitio del paclitaxel, midiendo cambios en la anisotropía de la fluorescencia. La anisotropía es la propiedad de las moléculas de alterar la fluorescencia emitida en función del ángulo de detección. Cuando una molécula excitada con luz polarizada pierde libertad rotacional como efecto de la unión, aumenta su señal anisotrópica. Se trata de una cualidad adimensional, r (ecuación 1), aditiva siempre y cuando, la intensidad de fluorescencia, f , de las formas libres y unidas sea la misma (Lakowicz, 2006).

$$r = \sum_i (f_i r_i) \quad (\text{ecuación 1})$$

El análogo fluorescente, hidrosoluble y activo del paclitaxel, flutax-2, presenta las características descritas, por lo que es posible determinar, con este compuesto, la competición por su sitio de unión midiendo la variación en la anisotropía de la fluorescencia. Esta variación sólo es observada cuando tiene lugar la liberación del flutax-2 unido, provocado por concentraciones crecientes de compuesto.

Para ello, se incubaron 50nM de microtúbulos estabilizados y 50nM de flutax-2 en presencia de 10nM, 20nM, 50nM, 100nM, 200nM, 500nM, 1μM, 2μM ó 10μM de compuesto **1**, durante 30min a 37°C, en el tampón en el que se dializaron previamente los microtúbulos cuando fueron preparados (sección 4.2 del presente capítulo). La incubación se llevó a cabo en una placa de 96 pocillos (los pocillos de los bordes no fueron utilizados), por agitación. Tras dicha incubación, se midió la anisotropía de fluorescencia con un lector de placas BMG Polarstar Galaxy a 25°C, empleando unas longitudes de onda de excitación y de emisión de 495nm y 520nm, respectivamente. Además, se realizó la misma determinación empleando docetaxel, a modo de control positivo (Buey *et al.*, 2004).

5.6. Ensayos de competición por el sitio de la laulimalida por HPLC

Con el fin de estudiar la competición de los ligandos de la serie CSCD con los del sitio de la laulimalida, se incubaron microtúbulos estabilizados a una concentración de 5 μ M junto a laulimalida en una concentración equimolar, en presencia de 0, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M ó 30 μ M de compuesto **1**, durante 30min a 37°C, en el tampón en el que se dializaron previamente los microtúbulos cuando fueron preparados (sección 4.2 del presente capítulo). A continuación, se centrifugaron las muestras en una centrífuga Beckman Optima™ TLX con un rotor TLA100 durante 20min a 50krpm (108628g) y 37°C y después, se separó el sobrenadante del precipitado, resuspendiendo posteriormente dicho precipitado en tampón NaPi. Se añadió luego una concentración de 5 μ M de docetaxel, como estándar interno, se extrajeron todas las muestras con tres volúmenes de diclorometano y se secaron en un Speed Vac. Entonces, se resuspendió cada muestra en 50 μ L de metanol 55% y se determinó la concentración de ligando por HPLC, utilizando para ello una columna C18. Se configuró el equipo para procesar cada muestra durante 25min con una fase móvil compuesta por los dos sistemas isocráticos siguientes: Metanol 55% en los 10min primeros y en los 15min finales, metanol 70%.

5.7. Ensayos de competición por fluorescencia

La competición por los sitios de colchicina, PM060184 y el dominio de vinca se llevó a cabo mediante la determinación de espectros de emisión de fluorescencia, empleando una longitud de onda de excitación de 320nm y registrando la emisión de fluorescencia entre 330nm y 600nm. Se incubaron, a 25°C durante 30min, muestras con 10 μ M de tubulina equilibrada en tampón NaPi, 10 μ M de compuesto **1** ó **4** y 20 μ M de competidor. Las señales fueron obtenidas con un fluorímetro de cubeta Horiba Jovin Yvon Fluoromax-2, a 25°C y se compararon cualitativamente con la señal procedente de un control sin competidor, que contenía la tubulina, el ligando problema y el mismo volumen total de DMSO que en el resto de casos.

5.8. Efecto de los ligandos sobre microtúbulos de *Aspergillus nidulans*

Mediante el estudio del efecto de los compuestos sobre la tubulina de *Aspergillus nidulans* se puede comprobar la reversibilidad de la unión. En primer lugar, se cultivaron células del hongo en medio mínimo para microscopía Watch Minimal Medium (WMM), pH 6.5, cuya composición se describe en la literatura (Peñalva, 2005). Una vez crecidas las células, se incubaron durante 30min a 28°C, en presencia de compuesto **1** a una concentración de 20 μ M. Tras la incubación, se reemplazó el WMM por medio fresco sin ligando. Se tomaron fotografías, tanto del efecto del compuesto, como del efecto posterior del lavado sobre el hongo, con un microscopio de epifluorescencia Leica DMI6000-B, equipado con una cámara fotográfica CCD Hamamatsu ORCA-ERII, con un objetivo de 63X.

5.9. Ensayos de ultracentrifugación analítica

Los experimentos de velocidad de sedimentación se realizaron en el Servicio de Ultracentrifugación Analítica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) de

Madrid, siendo el responsable el doctor Juan Román Luque-Ortega. Para ello, se utilizó una centrífuga analítica Beckman Optima™ XL-I equipada con un sistema de detección en el espectro ultravioleta-visible de longitud de onda variable y otro de detección por interferencia de Rayleigh (Philo, 2009).

La tubulina utilizada en todos los experimentos fue previamente equilibrada en tampón PEDTA, a diferentes concentraciones de GTP y magnesio. A continuación, se incubaron muestras de tubulina con ligando durante 30min a 25°C y entonces, se realizaron los experimentos de velocidad de sedimentación, a la misma temperatura. Se empleó una velocidad angular de 45krpm (163296g), con un rotor An50Ti y células de doble sector con ventanas de cuarzo de 1.2cm de paso óptico.

Los perfiles de sedimentación obtenidos varían con el tiempo de acuerdo a la ecuación de Lamm (Claverie *et al.*, 1975; Schuck, 1998, 2000) (ecuación 2). El ajuste de este modelo con los datos experimentales permite determinar los coeficientes de sedimentación y de difusión de las especies formadas (Brown y Schuck, 2008), pudiendo así conocer los diferentes estados de oligomerización presentes.

$$\frac{dC}{dt} = \left(\frac{1}{r}\right) \left(\frac{d}{dr}\right) \left[rD \left(\frac{dC}{dt}\right) - S\omega^2 r^2 C \right] \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde C es la concentración de la proteína, t es el tiempo, r la distancia radial desde el eje del rotor hasta el frente en la celda, D es el coeficiente de difusión, S el coeficiente de sedimentación y ω la velocidad angular.

Para la determinación del ajuste se utilizó el modelo c(s) del programa informático *Sedfit*, que contempla una de las aproximaciones posibles de la citada ecuación de Lamm. (Schuck y Demeler, 1999).

El valor de S obtenido tiene que ser corregido en función de la densidad y de la viscosidad del medio para poder ser comparado con otros experimentos en otros medios y/o en otros equipos. Así pues, la tubulina en su forma dimérica aparece en torno a 6S en tampón PEDTA, siendo 5.6S su valor corregido (Jourdain *et al.*, 1997). Los datos experimentales se corrigieron al valor en agua a 20°C, con el programa informático *Sednterp* (Laue *et al.*, 1992).

Las distribuciones de coeficientes de sedimentación resultantes de este experimento son calculadas a partir de los perfiles de velocidad de sedimentación. Al comparar las distribuciones medidas de manera conjunta por interferencia de Rayleigh y por absorbancia, se ven picos alineados entre sí. Dicho alineamiento permite determinar la concentración correspondiente de ligando unido a cada una de las distintas especies oligoméricas de tubulina, observadas en la citada distribución de coeficientes.

5.10. Determinación de la estequiometría de unión por HPLC

Con el fin de determinar las estequiometrías de unión de los siete compuestos objeto de estudio a la tubulina, se llevó a cabo, por triplicado, el mismo experimento tanto en tampón GAB 1mM GTP y 6mM MgCl₂ como en tampón PEDTA 1mM GTP y 7mM MgCl₂. Así pues, después de equilibrar la proteína en el tampón correspondiente, se incubaron muestras de tubulina a una concentración de 20μM en presencia de 0, 2μM, 5μM, 10μM, 15μM, 20μM, 30μM, 40μM, 50μM ó 75μM de ligando durante 30min a 37°C. A continuación, se centrifugaron las muestras en una centrífuga Beckman Optima™ TLX con un rotor TLA100 durante 20min a 50krpm (108628g) y 37°C y

después, se separó el sobrenadante del precipitado. Una vez separadas las fracciones, se resuspendió el precipitado con tampón sin magnesio y entonces, se añadió docetaxel como estándar interno, a una concentración de 20 μ M. Más tarde se extrajeron todas tres veces con diclorometano, se secaron en un Speed Vac y se resuspendieron en 50 μ L de metanol 70%. Entonces se analizó la concentración de ligando por HPLC, en carreras de 20min. El equipo se conectó a la columna de fase reversa C18 y se empleó metanol 70% como fase móvil. En paralelo, se determinó la concentración de proteína en cada fracción mediante la reacción del BCA.

6. Constantes de unión

6.1. Determinación por fluorescencia

Las constantes cinéticas de interacción entre la tubulina y los ligandos fueron calculadas, por fluorescencia, para diferentes concentraciones de ligando. Se halló la afinidad del compuesto **1**, tanto por la tubulina como por el complejo T₂R, a 25°C.

Para la realización del experimento con tubulina se equilibró en primer lugar la proteína en tampón PEDTA 0.1mM GTP y 1.5mM MgCl₂, mientras que para determinar la cinética con el complejo T₂R, la proteína fue equilibrada en tampón DTT. Los espectros de fluorescencia fueron recogidos, por triplicado, en un fluorímetro Horiba Jovin Yvon Fluoromax-2, con una cubeta transparente de cuarzo de 1cm de paso óptico. Se analizaron muestras con 2 μ M de proteína (en el caso del complejo T₂R, 2 μ M de tubulina y 2 μ M de RB3) y 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M ó 60 μ M de compuesto **1**, a 25°C. Para el cálculo de la constante cinética k₋₂, se analizó una muestra preincubada durante 30min a 25°C, en presencia de 2 μ M de T₂R y 2 μ M de CSCD062122, a la que se añadió vinblastina en una concentración de 100 μ M. Todas las muestras fueron analizadas, excitando a 320nm y registrando la emisión a 460nm hasta alcanzar una meseta en la señal. Una vez obtenidas todas las medidas, los ajustes a los modelos matemáticos se realizaron utilizando el programa informático QtiPlot (ProIndep Serv SRL).

6.2. Determinación por ultracentrifugación analítica

Las constantes de afinidad fueron determinadas asimismo combinando la información obtenida a partir de experimentos de velocidad de sedimentación, de HPLC y de fluorescencia.

Por un lado, se llevaron a cabo experimentos en los que se modificaba la concentración de cloruro de magnesio utilizada entre unos y otros, con el objetivo de conocer el papel del catión Mg²⁺ en la unión de los compuestos a su diana. Aparte, también se realizó un segundo tipo de experimentos en los que la variable modificada era la concentración inicial de ligando, con el objetivo de determinar las constantes de unión del ligando a su diana y la de autoasociación de la tubulina. Por último, también se calculó la constante de afinidad por el sistema T₂R con la misma técnica.

Para la realización del primer tipo, se equilibró la tubulina en tampón PEDTA 0.1mM GTP y la concentración correspondiente de cloruro de magnesio. Luego se prepararon muestras con una concentración de ligando de 5 μ M, incubadas en presencia de concentraciones de tubulina de 0, 0.2 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M ó 10 μ M, durante 30min a 25°C. En este caso, se analizaron los siete compuestos de la serie CSCD.

En cuanto al segundo tipo de experimentos, se equilibró tubulina en tampón PEDTA 0.1mM GTP y 1.5mM de $MgCl_2$ y a continuación, se prepararon muestras con compuesto **1** a 2.5 μ M, 5 μ M ó 10 μ M, incubadas en presencia de concentraciones de tubulina de 0, 0.2 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M ó 10 μ M, durante 30min a 25°C.

Para el cálculo de la constante de afinidad en el sistema T_2R , se equilibró tubulina en tampón DTT y luego se incubaron muestras con tubulina y RB3 en concentraciones de 10 μ M y 7.5 μ M, respectivamente, en presencia de concentraciones de compuesto **1** de 12 μ M. La incubación se llevó a cabo durante 30min a 25°C.

Una vez preparadas e incubadas las muestras, se analizaron por ultracentrifugación analítica del mismo modo que se encuentra detallado en la sección 5.9 del presente capítulo. Los coeficientes de sedimentación promedio de cada muestra fueron calculados con el programa informático *Sedfit*. A partir de los coeficientes de sedimentación promedio y de las concentraciones de tubulina teóricas, se obtuvieron las constantes de unión aparentes ($K_{2,ap}$) con el programa informático *SwKeq* (figura 16).

```

$ ./SwKeq_2.1.exe
The program calculates the equilibrium constant and the degree of polymerization of a protein using the concentration dependence of the sedimentation coefficient to 20oC in water and considering an isodesmic process.

please type: SwKeq.x models So Mw file_name_Ct[uM]_vs_Sw20

models: In this option will choose the Hydrodynamic model for protein polymers
if type 1 the hydrodynamic model will be NA2/3
if type 2 the hydrodynamic model will be linear (spheres)
if type 3 the hydrodynamic model will be linear (21 beads)
if type 4 the hydrodynamic model will be Helical (spheres)
if type 5 the hydrodynamic model will be Helical (21 beads)
if type 6 the hydrodynamic model will be Helical (42 beads)

These models were tested by C.A. Sontag et al., Biophysical Chemistry 108 (2004) 215-230

So is the Heterodimer Sedimentation Coefficient and the recommended values in case of tubulin protein are:

5.82 S obtained by J.G. de la Torre, J.M. Andreu, Hydrodynamic analysis of a,b-tubulin heterodimer and double rings, J.Mol. Biol. 238(1994) 223-225.

Other value could be 5.36 S obtained by Alday and Correia, Macromolecular Interaction of Halichondrin B Analogues Eribulin (E7389) and ER-076349 with Tubulin by Analytical Ultracentrifugation, Biochemistry 2009, 48, 7927-7938

Mw is the molecular weight in kDa

```

Figura 16: Pantalla principal del programa informático *SwKeq*, ejecutado en Windows.

SwKeq está diseñado para ser utilizado con sistemas en los que la proteína evaluada polimeriza isodésmicamente, como es el caso de la tubulina. El programa requiere un fichero de entrada donde se especifique el coeficiente de sedimentación promedio para cada concentración total (C_t) de proteína utilizada. Una vez aportado dicho fichero, estima una constante de asociación, en unidades molares, para la que calcula la concentración de la especie dimérica empleando la ecuación 3.

$$C_t = \sum C_i = \sum \left[I \cdot \left(\frac{k_i}{M_w} \right)^{I-1} \cdot (c_1)^I \right] \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde C_t es la concentración total de proteína, C_i la concentración de cada especie, I es el grado de polimerización, k_i es la constante isodésmica estimada, M_w es la masa molecular de la proteína y c_1 la concentración de dímeros en el equilibrio.

Dado que en sistemas isodésimicos la concentración de todas las especies está relacionada con la concentración del dímero (ecuaciones 4, 5 y 6), únicamente se requiere hallar dicho valor para conocer todos los demás.

$$c_1 = K_1 c_1 \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$c_2 = K_2 (c_1)^2 \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$c_I = K_I (c_1)^I \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde K_1 es la constante de equilibrio global teniendo un sistema con un grado de polimerización (dímeros que no reaccionan), c_2 la concentración de la especie tetramérica, K_2 la constante de equilibrio aparente teniendo un sistema con dos grados de polimerización (dímeros que forman tetrámeros), c_1 la concentración de la especie I-mérica y K_I es la constante de equilibrio global teniendo un sistema con I grados de polimerización (Lobert y Correia, 2000).

La constante de equilibrio global es conocida también puesto que es igual al producto de las constantes isodésimicas (por tanto, todas de igual valor) de todos los pasos de polimerización considerados (ecuación 7).

$$K_I = k_2 k_3 \dots k_I \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde k_2 es la constante de la reacción entre dos dímeros para formar un tetrámero, k_3 la constante de la reacción entre un tetrámero y un dímero para formar un hexámero, etc. Todas las constantes son idénticas e iguales a k_1 .

SwKeq calcula el valor de c_1 por separado para los diferentes coeficientes de sedimentación promedio introducidos en cada fichero de entrada y a continuación, determina, en cada caso, el coeficiente de sedimentación teórico empleando la ecuación 8. Luego ajusta el valor de la constante de afinidad inicial hasta que la diferencia resultante entre los coeficientes teóricos y experimentales es mínima.

$$\overline{s_{20,w}} = \frac{\sum \left[s_i^0 \cdot (1 - g_i \cdot c_i) \cdot I \cdot \left(\frac{k_i}{M_w} \right)^{I-1} \cdot (c_1)^I \right]}{\sum \left[I \cdot \left(\frac{k_i}{M_w} \right)^{I-1} \cdot (c_1)^I \right]} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde $\overline{s_{20,w}}$ es el coeficiente de sedimentación promedio corregido como si se realizase el ensayo en agua a 20°C, s_i^0 el coeficiente de sedimentación inicial de cada especie y g_i es una constante, de valor igual a 0.018mL/mg, que corrige el valor de la concentración y que es aplicable al estudiar sistemas de no idealidad hidrodinámica (Sontag *et al.*, 2004).

Por último, una vez ajustado el valor de la constante de asociación, *SwKeq* modifica el parámetro del grado de polimerización, I, y repite todo el proceso hasta que las diferencias entre los coeficientes de sedimentación son, de nuevo, minimizadas.

Según la aproximación considerada para el mecanismo de polimerización, la manera de hallar el coeficiente de sedimentación inicial, s_i^0 , de cada especie varía. Existen diversos modelos estudiados en la bibliografía, como por ejemplo, el de radio axial constante en el que dicho coeficiente inicial se calcula de acuerdo a la ecuación 9.

$$\ln\left(\frac{s_i^0}{s_1}\right) = \left(\frac{2}{3}\right) (\ln(I)) \quad (\text{Ecuación 9})$$

Donde s_1 es el coeficiente de sedimentación de la especie dimérica y se introduce en el programa a nivel de comando.

Unos modelos consideran una polimerización a lo largo de un mismo eje, mientras que otros consideran una polimerización helicoidal, presentando cada uno una función característica descrita en Sontag *et al.*, 2004. Los modelos helicoidales se diseñaron en base a las hélices inducidas por la vinblastina y la diferencia entre ellas reside en el número de bolas que conforma cada subunidad; 21 ó 42. El modelo de 21 bolas curva la estructura proteica tanto a nivel intradimérico como a nivel interdimérico, mientras que el de 42 lo hace exclusivamente entre dímeros. El programa informático desarrollado es capaz de trabajar con los seis modelos descritos, aunque se debe indicar que aquel que mejores ajustes proporcionó fue el modelo helicoidal de 21 bolas. La función que describe dicho modelo es:

$$\ln\left(\frac{s_i^0}{s_1}\right) = 0.4911(\ln(I)) - 0.0006354(\ln(I))^2 \quad (\text{Ecuación 10})$$

En paralelo al experimento de velocidad de sedimentación, se centrifugaron alícuotas de 200 μ L de cada muestra en una centrifuga Beckman Optima™ TLX con un rotor TLA100, durante 2h a 100krpm (434513g) y 25°C. A continuación, se separó la mitad superior y la mitad inferior de cada muestra y se llevaron hasta un volumen final de 200 μ L. Entonces se añadió en todas, una concentración de docetaxel de 10 μ M como estándar interno, se extrajeron con diclorometano y se secaron en un Speed Vac. Finalmente, se resuspendieron en 50 μ L de fase móvil (metanol 70%) y se analizó la concentración de ligando por HPLC, en carreras de 20min. El equipo se conectó a la columna de fase reversa C18 y se empleó metanol 70% como fase móvil. Adicionalmente, la concentración de tubulina se determinó por BCA.

Exclusivamente en el caso de los experimentos en los que se varía la concentración inicial de ligando es posible describir la constante aparente obtenida con *SwKeg* como una relación entre la constante de unión del ligando (K_1) y la de autoasociación de la tubulina (K_2). A partir de la representación de las constantes aparentes frente a las concentraciones de ligando libre para cada muestra, se ajustaron los datos obtenidos al modelo propuesto en el capítulo de Resultados, utilizando el programa informático QtiPlot (ProIndep Serv SRL).

Finalmente, la constante de afinidad real del compuesto **1** por el sistema T₂R, se determinó directamente, a partir de los datos experimentales procedentes de la ultracentrifugación analítica y del HPLC, sin necesidad de utilizar el programa *SwKeg*.

7. Ensayos estructurales

7.1. Ensayos de resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica adecuada para el análisis de complejos proteína-ligando ya que ofrece la posibilidad de estudiar con exactitud procesos dinámicos, en medios acuosos.

Sólo los átomos que presentan un momento angular intrínseco (o espín) diferente de cero, tienen la capacidad de interactuar con campos magnéticos, pudiendo alterar el estado de su espín como consecuencia de esta interacción.

En un imán, al someter a una molécula a un campo magnético suficientemente intenso, todas las partículas alinean sus espines de acuerdo a dicho campo. De esta manera, un pulso en la región de las radiofrecuencias, aplicado en un plano perpendicular al campo magnético, induce transiciones en el estado de los espines de la molécula objeto de estudio. Una vez que el pulso cesa, los espines nucleares, que se encuentran fuera del equilibrio, tienden a recuperar espontáneamente su estado inicial, emitiendo el exceso de energía. Esta señal, amplificada y digitalizada posteriormente, es la que da lugar al espectro de RMN (Freeman, 1997).

7.1.1. Espectroscopía de orden difusional (DOSY-RMN)

El término difusión molecular se refiere al movimiento de moléculas en solución debido a movimientos Brownianos, que tienen lugar en ausencia de otras fuerzas externas. A lo largo del tiempo, el movimiento de una molécula en un medio resulta una propiedad conocida como coeficiente de difusión (D) y depende de la temperatura y de la naturaleza, tanto del solvente como de la partícula difundida.

El experimento de DOSY permite determinar estos coeficientes de difusión en sistemas ligando-proteína. Los coeficientes calculados se relacionan de modo inversamente proporcional con el tamaño promedio de las especies oligoméricas de la muestra, con lo que cuanto más grandes sean (en promedio) dichas especies, menor será la capacidad de difusión de la muestra.

La distancia recorrida por una molécula difundiendo depende de la cantidad de moléculas que tenga alrededor. Esta limitación, denominada fuerza de fricción (F) se puede calcular mediante la ecuación de Stokes (ecuación 11).

$$F_f = -6\pi\eta r v \quad (\text{Ecuación 11})$$

Donde η es la viscosidad (expresada en $\text{kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), r es el radio hidrodinámico de la molécula y v su velocidad.

Aparte de esto, el coeficiente de fricción (F) viene definido por:

$$F = 6\pi\eta r \quad (\text{Ecuación 12})$$

Por tanto, la ecuación de Stokes-Einstein nos permite establecer la relación:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (\text{Ecuación 13})$$

Donde k_B es la constante de Boltzman ($1.38066 \cdot 10^{-23} \text{ kg} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$), T es la temperatura en Kelvin (Johnson, 1999).

Para aproximar experimentalmente el valor del coeficiente de difusión mediante técnicas de RMN, se requiere la adquisición de una serie de espectros de protón en los que se aumenta progresivamente la fuerza de los gradientes y se analiza, a continuación la atenuación de la intensidad de las señales en cada espectro.

Dicha atenuación de la señal de RMN cumple la siguiente ecuación:

$$\frac{A}{A_0} = -e^{\left[G^2 g^2 d^2 \left(\frac{T-d}{3}\right) D\right]} \quad (\text{Ecuación 14})$$

Donde A es la señal registrada, A_0 es la intensidad máxima, G es la fuerza del gradiente, g es la constante giromagnética de la sonda ($2.6752 \cdot 10^4 \text{ G}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para el protón), d es la duración del gradiente y T, el tiempo de difusión entre gradientes.

Al representar $-\ln \frac{A}{A_0}$ vs. $\left[G^2 g^2 d^2 \left(\frac{T-d}{3}\right) D\right]$, una vez adquiridos los espectros, se obtiene una recta de regresión cuya pendiente es igual a D.

En este caso, para la obtención de los espectros de DOSY, se empleó un pulso denominado *ledgp2s*, según su código en la librería de pulsos Bruker, que compensa posibles errores debidos a corrientes *eddy*. Las bobinas que aplican los gradientes pueden inducir corrientes eléctricas parásitas (*eddy*) en los materiales conductores que se oponen al efecto magnético y alteran la evolución de los espines nucleares, distorsionando el espectro resultante. Una manera de minimizar estas corrientes consiste en adicionar un tiempo de recuperación antes de la adquisición durante el cual, dichas corrientes pueden desvanecerse (Gibbs y Johnson, 1991; Chen *et al.*, 1998).

Así pues, la determinación del coeficiente de difusión mediante resonancia magnética nuclear fue llevada a cabo a partir de muestras de tubulina con una concentración de $15 \mu\text{M}$, que fue previamente equilibrada en tampón deuterado PEDTA 0.1 mM GTP y 1.5 mM MgCl_2 . Cada muestra fue incubada, más tarde, en presencia de 0 , $4 \mu\text{M}$, $15 \mu\text{M}$ ó $30 \mu\text{M}$ de compuesto **1**, durante 30 min a 25°C .

Los espectros DOSY fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker AVANCE 500 MHz , durante 2 h a 37°C . El equipo fue configurado con un tiempo de difusión (“delta grande”) de 0.4 s y un pulso de gradiente (“delta pequeña”) de 0.22 s . Finalmente, los espectros fueron procesados y representados con la herramienta para experimentos de DOSY contenida en el programa informático Bruker *TopSpin 2.1*.

7.1.2. Espectroscopía de diferencias en la transferencia de saturación (STD-RMN)

En este caso, la tubulina se equilibró en tampón NaPi deuterado 0.1 mM GTP y 1.5 mM MgCl_2 y a continuación, se incubó a una concentración de $10 \mu\text{M}$ en presencia de $150 \mu\text{M}$ de compuesto **1**, durante 30 min a 25°C . Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron adquiridos, en este caso, en un espectrómetro Bruker AVANCE 600 MHz equipado con una criosonda, a 10 K . Se obtuvieron con un tiempo de saturación de 2 s , con una concatenación de 40 pulsos de 50 ms separados entre sí por 1 ms .

Los espectros hallados fueron procesados con *TopSpin 2.1*, mientras que con otro programa, CORCEMA-ST, se determinó el efecto teórico del ligando sobre la señal de STD, al unirse a la tubulina no ensamblada (Canales *et al.*, 2011). La correlación entre los datos teóricos y los datos experimentales permite confirmar la identidad de los epítomos de unión del ligando analizado.

7.2. Ensayos de microscopía electrónica de transmisión

La observación de las estructuras macromoleculares inducidas por el compuesto **1** sobre la tubulina, se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de transmisión.

En primer lugar, se equilibró la tubulina, en paralelo, tanto en tampón GAB 1 mM GTP y 6 mM MgCl_2 , como en tampón PEDTA 1 mM GTP y 7 mM de MgCl_2 . A

continuación, la proteína fue incubada en presencia de compuesto **1** o docetaxel (como control positivo), por triplicado. Una concentración de proteína de 10 μ M se incubó con una concentración de ligando de 25 μ M, durante 30min a 25°C. Después, se añadió en cada muestra glutaraldehído al 0.1% v/v, durante 5min a 25°C, para estabilizar los complejos proteicos formados. Al cabo de esos 5min, se paró la reacción con 100mM de glicina que actúa bloqueando los grupos aldehído libres (Ngwenya *et al.*, 2005).

Los complejos proteicos estabilizados con glutaraldehído, fueron almacenados a 4°C para pudieran ser utilizables en ensayos de microscopía electrónica de transmisión durante largos períodos de tiempo, sin perder la conformación estructural original.

Así pues, después de haber sido estabilizadas, las muestras fueron diluidas 10 y 100 veces en tampón PEDTA sin magnesio y más tarde, se estudiaron todas estas diluciones. Para ello, previamente se tuvieron que preparar las rejillas de MET. Las rejillas que se emplearon fueron de cobre, con una malla de 400líneas/pulgada, que fueron recubiertas con Formvar y carbón por el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) de Madrid. Por un lado, la resina Formvar, formada por alcohol vinílico, acetato de vinilo y formaldehído, actúa como una película delgada sobre la que se apoyan las muestras y a través de la cual puede discurrir el haz de electrones. Por otro lado, el carbón refuerza la película de Formvar.

Antes de ser utilizadas, las rejillas se sometieron a una descarga iónica durante 1min, lo que genera una superficie hidrofílica sobre la película de Formvar que facilita la adsorción de la muestra al material. Para tal fin, se empleó un evaporador de Quorum Technologies Polaron Turbo E6700.

Una vez preparadas las rejillas, éstas se cargaron con cada una de las muestras a temperatura ambiente y se tiñeron posteriormente con acetato de uranilo 1% p/v (tinción negativa). Luego, se adhirió a la superficie del carbón de cada rejilla 10 μ L de muestra durante 2min y entonces, se retiró el exceso por capilaridad usando un papel de filtro. Tras tres lavados con agua Mili-Q y la consiguiente eliminación del exceso por capilaridad, se incubaron en presencia de 15 μ L de acetato de uranilo, durante 1min. Finalmente, después de retirar nuevamente el volumen por capilaridad de las rejillas, se dejaron secar a 25°C y más tarde fueron almacenadas a la misma temperatura. El uso del acetato de uranilo en ensayos de MET está muy extendido, debido a que protege la muestra de la radiación y del vacío del interior de la columna del microscopio y además, aumenta el contraste.

Las muestras fueron visualizadas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1230, estabilizado a 100kV. La adquisición de imágenes se realizó bajo condiciones de mínima dosis (10-15e-/Å²) y se utilizó para ello un detector CMOS TVIPS 4k x 4k. Las imágenes se obtuvieron a 50000 aumentos, con un factor de corrección de 1.45 y una resolución final de 0.228nm/píxel.

7.3. Ensayos de dispersión de rayos X a ángulos bajos

En un experimento de SAXS, una muestra en solución es expuesta a un haz incidente de rayos X de una longitud de onda específica, monocromática y colimada (Baldon *et al.*, 2015). Como resultado de la colisión tiene lugar la consecuente dispersión elástica de fotones (dispersión en la que el choque de dos o más átomos no causa deformaciones permanentes de éstos, con lo que mantienen su energía cinética). Como fruto de dicha dispersión, muchas ondas interfieren constructivamente entre ellas

generando máximos de intensidad que pueden ser detectados (Pauw, 2013). Los máximos comprendidos en el intervalo entre 0 y 5 grados respecto a la dirección del haz incidente son los que se consideran máximos de SAXS y aportan la información estructural de mayor definición (Boldon *et al.*, 2015).

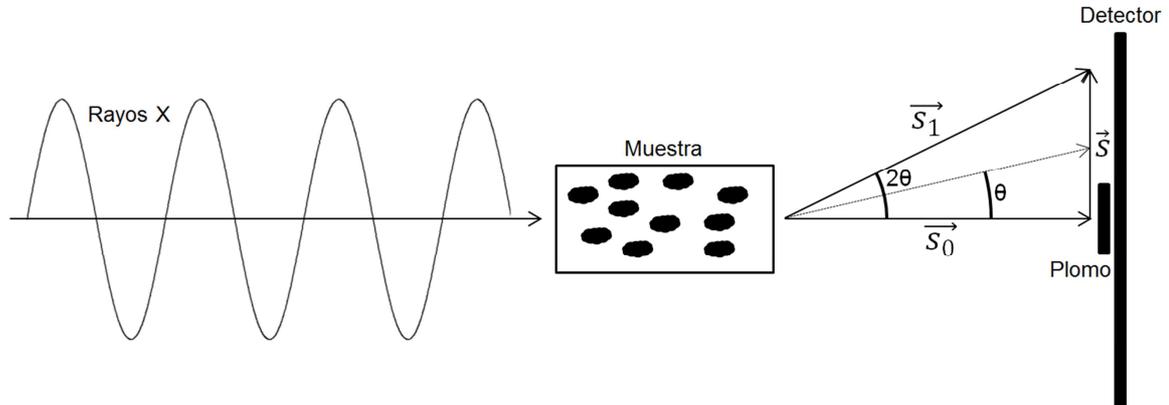


Figura 17: Esquema del método de detección de señal en el experimento de SAXS. El vector \vec{s}_0 corresponde al haz incidente no dispersado, que tiene que ser bloqueado por una pieza metálica para no saturar el detector y el vector \vec{s}_1 corresponde al haz dispersado, expresado en términos de número de onda (frecuencia). Cuanto mayor es el ángulo de incidencia (θ), más grande es el vector de dispersión (\vec{s}) detectado.

Al irradiar una muestra cualquiera se genera un ángulo de incidencia y un ángulo de dispersión de igual valor. Así pues, si se toma el haz incidente como referencia (igual a 0°) el ángulo final observado será la suma de ambos valores, 2θ (figura 17). La magnitud de dicho ángulo final se corresponde de manera directamente proporcional con el módulo del vector de dispersión (\vec{s}) detectado. Así pues, expresando los vectores en unidades de frecuencia circular, para ángulos tan pequeños como los medidos en SAXS, la bisectriz del ángulo de incidencia intersecciona con el vector de dispersión exactamente en su punto medio, formando dos ángulos de 90° . Este hecho permite calcular el valor de \vec{s} mediante reglas trigonométricas.

$$\text{sen}\theta = \frac{\left(\frac{\vec{s}}{2}\right)}{s_1} \quad (\text{Ecuación 15})$$

Si se expresa \vec{s}_1 como una frecuencia circular, se denomina \vec{q}_1 y se define como:

$$\vec{q}_1 = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (\text{Ecuación 16})$$

Donde λ es la longitud de onda del haz incidente.

Así pues, relacionando las ecuaciones 15 y 16 se obtiene la ecuación 17:

$$\vec{q} = \frac{4\pi}{\lambda} \text{sen}\theta \quad (\text{Ecuación 17})$$

Si \vec{s}_1 se expresa como una frecuencia lineal, se define directamente como la inversa de la longitud de onda y su vector de dispersión \vec{s} cumple la ecuación 18.

$$\vec{s} = \frac{2}{\lambda} \text{sen}\theta \quad (\text{Ecuación 18})$$

Así pues, como los equipos de SAXS informan del vector de dispersión en unidades circulares, para transformarlos en valores lineales hay que dividirlos por 2π .

Dado que la ley de Bragg (ecuación 19) permite estudiar la difracción de los rayos X sobre superficies repetitivas, se puede relacionar con la ecuación 18 para obtener la ecuación 20:

$$\lambda = 2d \text{sen}\theta \quad (\text{Ecuación 19})$$

$$d = \frac{1}{s} \quad (\text{Ecuación 20})$$

Donde d es la distancia entre los planos de la red cristalina.

Se observa por tanto que a medida que disminuye \vec{s} (los vectores de dispersión más próximos al centro del detector) la distancia entre planos medidos aumenta. Estos vectores describen los primeros armónicos de la estructura y son los de mejor definición.

Una vez calculado el valor del vector \vec{q} , el equipo mide la intensidad en cada punto del detector en función del número de fotones que llega a cada uno, representando entonces la intensidad de la señal (eje \overline{OY}) frente al valor del vector de dispersión (eje \overline{OX}).

Los patrones de dispersión de SAXS fueron recogidos, tanto en condiciones que promueven la polimerización, como en condiciones que la dificultan. Por ello, se equilibró tubulina, tanto en tampón GAB 1mM y 6mM de MgCl_2 , como en tampón PEDTA 1mM GTP y 7mM de MgCl_2 . A continuación, durante 30min a 37°C , se incubaron muestras de tubulina a una concentración de $45\mu\text{M}$ y $60\mu\text{M}$, respectivamente, en presencia de un exceso de ligando del 10% c/c.

Las determinaciones fueron realizadas para el compuesto **1**, para el **2** y para la vinblastina (como modelo de ligando que induce la formación de hélices de tubulina) (Hodgkinson *et al.*, 1992).

La realización de los experimentos tuvo lugar en la estación de difracción no cristalina BL11-NCD del Laboratorio de luz de sincrotrón ALBA, situado en Cerdanyola del Vallés (Barcelona). Se empleó un haz de luz, cuya longitud de onda fue aproximadamente de 1\AA y cuya energía osciló en torno a 10keV . El detector, situado a 2m de la muestra, fue un CCD ADSC Quantum 210r. Tenía un área activa de 210mm^2 (4096píxels) x 210mm^2 (4096píxels). El detector fue calibrado con behenato de plata, que presenta un espaciado de 58.38\AA en su primer máximo en el perfil de dispersión (Wolf *et al.*, 2001).

Durante el registro de datos, se mantuvo una temperatura constante de 37°C , conectando la cubeta que contenía las muestras a un baño de agua programado a la temperatura adecuada. Para cada muestra, la señal fue acumulada durante 10min.

El análisis de datos se realizó usando el programa informático *Fit2d* (ESRF, Dr. Hammersley) para obtener el perfil de SAXS de la muestra en el espacio recíproco. A partir de las imágenes originales en dos dimensiones, el programa mencionado genera un difractograma monodimensional. Adicionalmente, el patrón de dispersión monodimensional fue corregido a continuación, mediante la eliminación del ruido de fondo, utilizando para ello el programa informático PRIMUS (Konarev *et al.*, 2003). También fue empleado para determinar los espectros promedio de los duplicados

obtenidos con el tampón PEDTA. Una vez procesados todos los espectros, éstos fueron representados frente al vector \vec{s} .

A partir de la magnitud de los vectores de dispersión de los máximos $J_{0,1}$ y $J_{1,1}$, se calculó el diámetro y la longitud del paso de vuelta de la estructura macromolecular inducida por la presencia de los ligandos problema.

Después de calcular estos parámetros se construyeron ficheros de coordenadas, en formato PDB, con la posición en el espacio ocupada por cada monómero de tubulina, formando hélices de 3 giros.

Finalmente, se compararon los perfiles experimentales con los perfiles teóricos calculados a partir de los ficheros de coordenadas PDB previamente construidos, utilizando para ello los programas informáticos CRY SOL (Svergun *et al.*, 1995) y DALAI (Chacón *et al.*, 1998), en paralelo.

Las coordenadas utilizadas para la generación de cada fichero PDB fueron optimizadas, hasta que las diferencias entre las posiciones de los máximos de los perfiles teóricos y los experimentales fueron no significativas.

7.4. Ensayos de cristalografía

Con el fin de obtener estructuras cristalográficas de la tubulina y el compuesto **1**, unidos fue necesario previamente obtener complejos T_2RT vacíos. Estos complejos son tetrámeros estabilizados T_2R a los que se le une la proteína tubulina-tirosina ligasa (TTL). Esta proteína, purificada y cedida por el grupo del profesor Michel O. Steinmetz del Paul Scherrer Institut de Villigen (Brugg, Suiza), se une a la interfaz del heterodímero curvado en el complejo T_2R y estabiliza la estructura (Prota *et al.*, 2013).

Así pues, en primer lugar se equilibró una alícuota de tubulina en tampón PD10 mediante una cromatografía de filtración en gel Sephadex G25 (8cm x 0.9cm). A continuación, aquellas alícuotas con proteína se mezclaron, luego se realizó una dilución 1/10 y entonces, se midió la absorbancia a 278nm. La concentración se determinó teniendo en cuenta que el coeficiente ϵ , en ese tampón y a esa longitud de onda, es igual a $135300M^{-1}cm^{-1}$.

Después, se incubó tubulina en una concentración de $160\mu M$ con RB3 en una relación tubulina-RB3 de 1:6 y con TTL en una relación tubulina-TTL de 1:0.6, en tampón T_2RT . El complejo T_2RT formado de esta manera, se cristalizó mediante el método de difusión de vapor o de la gota colgante, durante 48h a $20^\circ C$ (Chen *et al.*, 2002). Para que la cristalización tuviera lugar, se añadió solución precipitante en el pocillo sobre el cual se encontraba el complejo T_2RT . La solución precipitante contenía 5% de polietilenglicol, 11%, 12%, 13% ó 14% de glicerol, 30mM de $MgCl_2$, 30mM de $CaCl_2$ y 100mM de tampón MES/imidazol, pH 6.7.

Los complejos cristalizados fueron incubados, tras 48h de crecimiento, en presencia del compuesto **1** a una concentración de 2mM, diluido en 10% de polietilenglicol, 20% de glicerol, 1mM APPCP, 10mM DTT y 0.1mM GDP, durante 2h. Después de dicha incubación, se almacenaron en nitrógeno líquido a $-196^\circ C$.

Los datos de dispersión de los cristales fueron recogidos (figura 18), en la estación X06DA-PXIII del Laboratorio de luz de sincrotrón SLS, perteneciente al Paul Scherrer Institut en Villigen, provincia de Brugg, Suiza. Se empleó un haz de luz, cuya longitud de onda era igual a 1.08\AA y cuya energía osciló en torno a 11.5keV. El detector, situado a 250mm de la muestra, fue un Dectris PILATUS 2M-F. Tenía un área activa de

254mm² (1475píxels) x 289mm² (1679píxels), con una velocidad de refresco de 60Hz. Se recogió información de los 360° de cada cristal, ya que se encontraban unidos a un cabezal goniométrico que permitía una total capacidad de rotación. Se adquirió una imagen por cada décima de grado de rotación, con un tiempo de exposición de 0.1s cada una. Una vez que se hubieron obtenido todas ellas, fueron procesadas con el programa informático XDS (Kabsch, 2010).

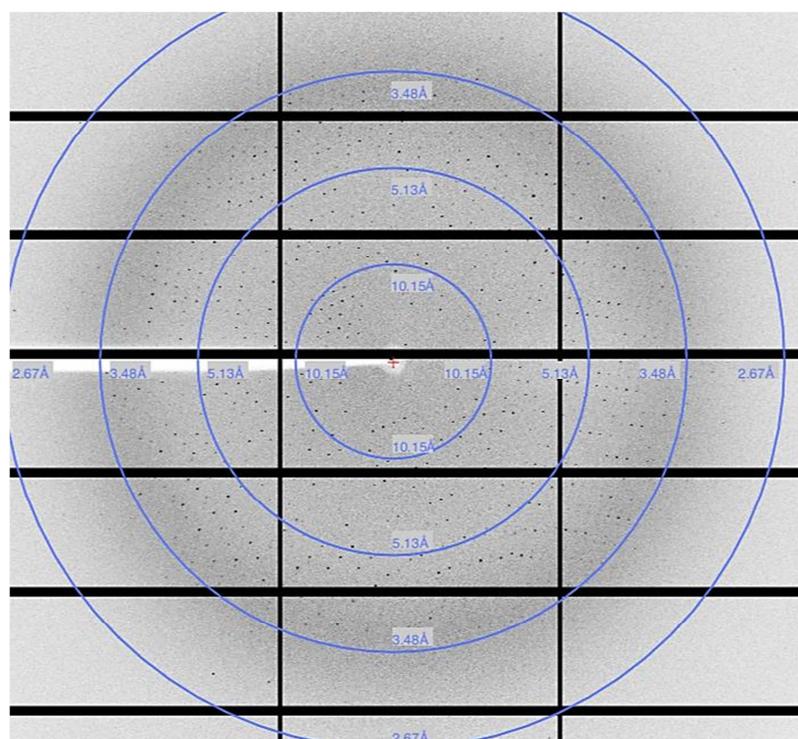


Figura 18: Patrón de dispersión de rayos X del complejo T₂RT-compuesto **1** cristalizado. Las circunferencias azules delimitan los intervalos de resolución.

El refinamiento final y la optimización de las estructuras tridimensionales propuestas a partir de los datos de difracción de rayos X recogidos, fue realizado por el doctor Ashwani Sharma. Como resultado, se generó un fichero de coordenadas PDB, que describe la posición en el espacio ocupada por cada residuo del complejo T₂RT y por el ligando objeto de estudio.

Finalmente, todas las representaciones esquemáticas contenidas en la presente memoria, elaboradas a partir del citado fichero PDB, fueron realizadas con el programa informático Maestro 9.9 (Schrödinger, Inc., Estados Unidos).

7.5. Ensayos de bioinformática

La determinación de la conformación estructural que adquieren los compuestos de la serie CSCD al unirse a la tubulina fue realizada mediante estudios bioinformáticos de modelado molecular.

Estas simulaciones fueron llevadas a cabo por la doctora Ruth Matesanz del Servicio de Bioinformática del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) de Madrid, mediante algoritmos genéticos “lamarckianos” realizados con el programa informático *AutoDock 4.0* (Morris *et al.*, 1998).

A partir de la estructura cristalográfica obtenida a partir del complejo T₂RT-compuesto **1**, se realizaron los modelados moleculares para todos los compuestos objeto de estudio (incluido el compuesto **1**). Para la realización de dichos modelados moleculares, únicamente se dotó de flexibilidad a la estructura de los ligandos, mientras que la estructura de la proteína fue fijada.

En último lugar, se hallaron los contactos entre cada pose resultante y la proteína, con el programa informático *Chimera*. Los contactos hidrofóbicos se determinaron midiendo las distancias entre los diferentes residuos de la proteína y los grupos funcionales de los compuestos, considerándose positivas aquellas distancias inferiores a 4.5Å.

4

Resultados

1. Propiedades biofísicas

En primer lugar se caracterizaron las propiedades biofísicas de los siete compuestos que conforman la serie objeto de estudio. Se determinó, para cada ligando: coeficiente de extinción molar, solubilidad, pureza y tiempos de retención en HPLC; propiedades físico-químicas que sirvieron de base para el diseño experimental.

1.1. Coeficiente de extinción molar

Los compuestos orgánicos por lo general se comportan como buenos cromóforos, debido a que presentan estructuras capaces de absorber radiación electromagnética (García-Segura *et al.*, 2007). El coeficiente de extinción molar expresa numéricamente cómo de intensa es dicha absorción de radiación, la cual puede ser calculada en función de la “ecuación de Lambert-Beer” a partir de una concentración de compuesto conocida, siempre que se analice la región ultravioleta-visible donde la señal es lineal. El conocimiento de los coeficientes de extinción molar (ϵ) permite establecer la longitud de onda para la cual, la absorbancia es mayor y por tanto, más sensible a la concentración de ligando. De este modo, se puede hacer uso de la espectrofotometría como método de detección de los ligandos analizados.

Con el objeto de obtener dichos parámetros, se determinaron los espectros de absorbancia de los ligandos (a una concentración fija de 20 μ M), disueltos en etanol de grado de espectroscopía. Adicionalmente, se obtuvieron los espectros de absorbancia de todos los compuestos a partir de carreras de HPLC, debido a que los máximos de los

espectros de los compuestos **2** y **3** solapaban con la absorbancia del disolvente en el que estaban preparadas las muestras.

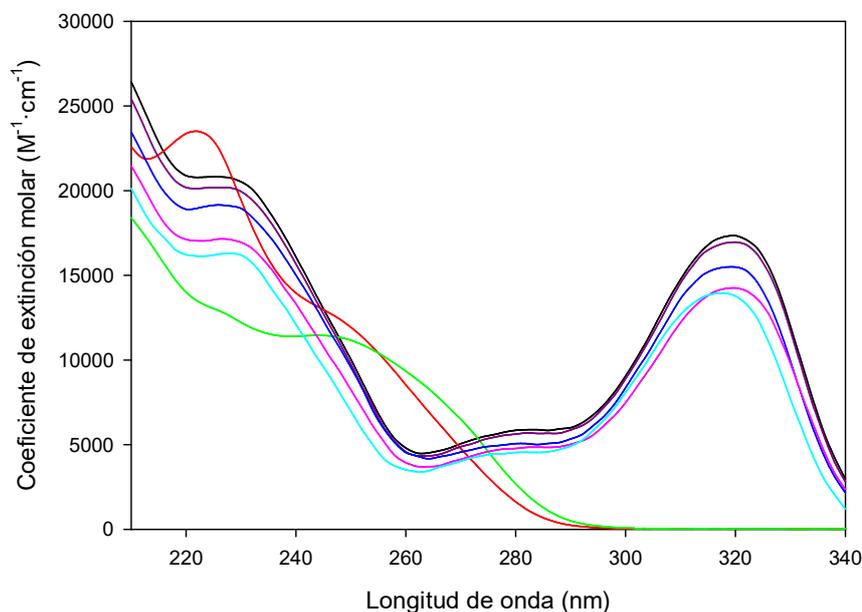


Figura 19: Espectros de absorción en la región ultravioleta-visible de los compuestos objeto de estudio: **1** (negro), **2** (rojo), **3** (verde), **4** (morado), **5** (azul), **6** (rosa) y **7** (cian).

Como se aprecia en la figura 19, todos los ligandos absorben luz en la región ultravioleta-visible, observándose un perfil diferente para los ligandos **2** y **3**. Mientras que el resto de compuestos presenta un máximo en torno a 320nm, los ligandos citados presentan su máximo a una longitud de onda más corta. En la tabla 2 se listan las posiciones de los máximos y los valores de ϵ en ellos, para las moléculas analizadas.

Compuesto	$\lambda_{\text{máximo}}$ (nm)	Coefficiente de extinción molar ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$)
1	320	20000 ± 1000
2	222	24600 ± 700
3	243	13200 ± 900
4	319	17100 ± 100
5	319	16800 ± 700
6	320	15500 ± 600
7	318	14500 ± 300

Tabla 2: Coeficientes de extinción molar de los compuestos estudiados, en unidades de $M^{-1} \cdot cm^{-1}$, extraídos de análisis independientes en HPLC.

1.2. Solubilidad

Para determinar el límite máximo de concentraciones de ligando libre en medios acuosos se determinó la solubilidad en cada caso. Al mismo tiempo se estudió de qué manera interaccionan los diferentes contenedores en los que se llevaron a cabo todas las reacciones, con los compuestos. A la vista de los resultados en tampón GAB 0.1mM GTP, a 25°C, se concluye que con los compuestos **1**, **2**, **3**, **4**, **5** y **7** es posible alcanzar concentraciones por encima de 50 μ M, independientemente del contenedor empleado,

ya que todos los espectros de absorbancia medidos son iguales entre sí. La excepción la presenta el compuesto **6**, cuyo límite de solubilidad es igual a $20\mu\text{M}$ (figura 20).

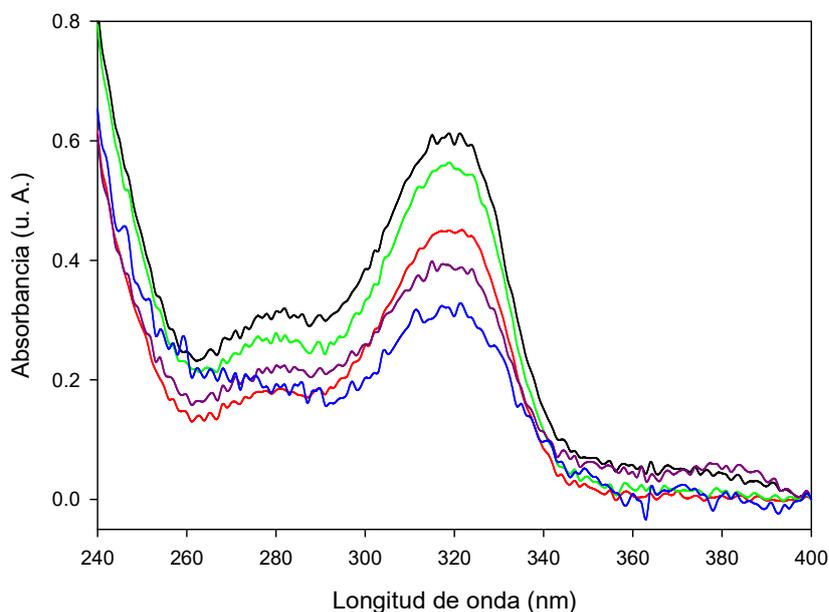


Figura 20: Espectros de absorbancia en la región ultravioleta-visible de una dilución 1:10 de muestras del compuesto **6** en tampón fosfato a una concentración de $50\mu\text{M}$. Espectro inicial (negro), después de 20min de incubación en un tubo de polipropileno (*Eppendorf*[®]) (rojo), después de 20min en un tubo de vidrio (verde), tras una centrifugación de 20min a 50krpm (108628g) (morado) y tras una centrifugación de 60min a 100krpm (434513g) (azul).

1.3. Pureza

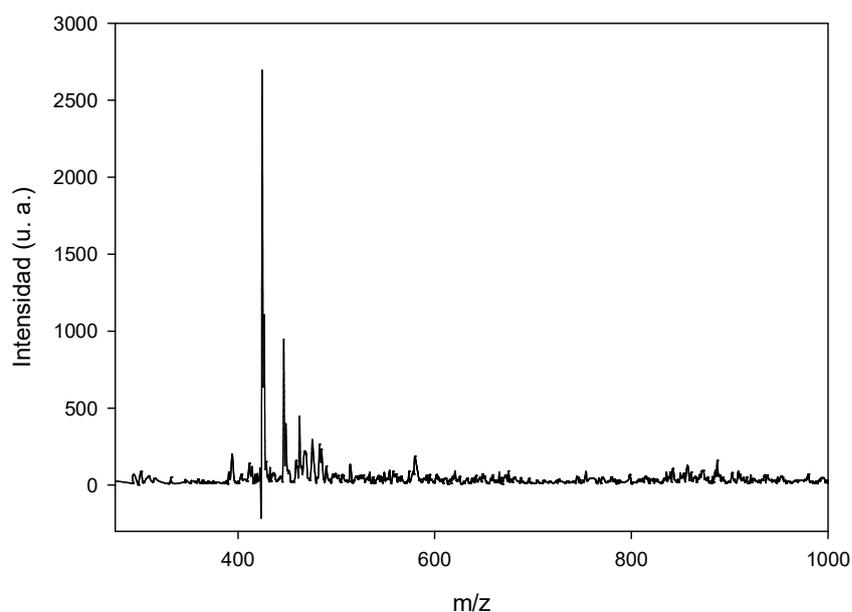


Figura 21: Espectro de masas del compuesto **1** obtenido con ionización por electroespray. El pico principal (o pico base) corresponde a una masa igual a 424Da. Los demás picos observados corresponden a los diferentes aductos de la misma molécula, formados como consecuencia del proceso de ionización.

Para la determinación de la pureza se obtuvieron los espectros de masas mediante ionización por electroespray (ESI, de sus siglas en inglés). Está descrito que ésta es la técnica más útil para el análisis de macromoléculas ya que previene la fragmentación de los analitos (Desiderio, 1993).

Tras el análisis de todos los compuestos, se observó únicamente una molécula presente en cada muestra, por lo que puede decirse que el grado de pureza es próximo al 100% (figura 21). Todos los picos observados en la gráfica corresponden a los diferentes aductos de la misma molécula.

1.4. Identificación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Para la cuantificación de los ligandos, éstos fueron analizados por HPLC con una columna de fase reversa C18. Se desarrolló un método cromatográfico que permitiese cuantificar las señales de cada uno de los ligandos. La fase móvil establecida (metanol 70% en agua), resuelve todos los compuestos, del docetaxel (tiempo de retención de 9min), compuesto empleado como estándar interno. Los tiempos de retención determinados de esta manera se encuentran detallados en la tabla 3.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	λ_{abs} (nm)
1	12.35	320
2	11.82	220
3	3.52	220
4	13.19	320
5	7.09	320
6	4.68	320
7	3.49	320

Tabla 3: Tiempos de retención de los compuestos objeto de estudio en una columna de fase reversa C18 con metanol 70% en agua y longitudes de onda en que son monitorizados.

2. Efecto de los ligandos en líneas celulares

Una vez determinadas las propiedades biofísicas de los compuestos de la serie CSCD, se procedió a caracterizar su efecto a nivel celular.

2.1. Citotoxicidad

En primer lugar se midió la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de todos los ligandos, en una línea de células de carcinoma de ovario A2780 y en su variante multirresistente a fármacos por sobreexpresión de la glicoproteína-P, A2780AD.

El estudio de la citotoxicidad, fue efectuado en cuatro experimentos independientes (tabla 4) y reveló que los compuestos estudiados son activos aunque, al menos, un orden de magnitud menos activos que los dos controles utilizados: paclitaxel y vinblastina.

No obstante, a diferencia de dichos controles, los compuestos muestran una mayor actividad en la línea resistente, hecho que indica que son peores substratos de la glicoproteína-P (gp-P). La gp-P presenta una mayor afinidad por los compuestos más hidrofóbicos, debido a que un factor esencial en la unión es el coeficiente de reparto del

ligando entre la fase acuosa (el citosol) y la lipídica (la membrana) (Binkhathlan y Lavasanifar, 2013).

Compuesto	A2780 (nM)	A2780AD (nM)	R/S (Índice de resistencia)
Paclitaxel	0.8 ± 0.1	600 ± 100	750 ± 20
1	51 ± 6	81 ± 5	1.60 ± 0.05
2	99 ± 7	98 ± 2	1.00 ± 0.03
3	140 ± 20	350 ± 10	2.50 ± 0.20
4	200 ± 40	250 ± 10	1.30 ± 0.10
5	250 ± 20	330 ± 10	1.32 ± 0.04
6	600 ± 100	630 ± 50	1.05 ± 0.04
7	430 ± 50	620 ± 20	1.45 ± 0.07
Vinblastina	1.0 ± 0.3	100 ± 10	100 ± 10

Tabla 4: Citotoxicidad de los compuestos objeto de estudio, en comparación con la del paclitaxel y la de la vinblastina en las células de carcinoma de ovario sensibles (A2780) y en su variante multiresistente por sobreexpresión de la gp-P (A2780AD). Los datos representan la media ± error estándar de, al menos, cuatro experimentos independientes. La relación R/S representa el índice de resistencia de la línea A2780AD, obtenido al dividir la CI_{50} de la línea resistente entre la CI_{50} de la línea sensible.

En la tabla 4 se muestra el índice de resistencia (R/S) de la línea celular A2780AD para cada uno de los compuestos. Cuanto mayor sea la relación R/S, tanto más resistente se muestra la línea celular tumoral frente al compuesto en cuestión. De las medidas se concluye que el compuesto **1** es el más activo (51nM) seguido del **2** (99nM). Asimismo el ligando **6** resultó ser el menos activo de la serie, ya que mostró un valor de CI_{50} igual a 600nM.

2.2. Efecto sobre el ciclo celular

El estudio del valor de CI_{50} pone de manifiesto que los ligandos estudiados son citotóxicos en células. Adicionalmente, al evaluar el efecto sobre el ciclo celular se puede establecer si dicha actividad afecta a la segregación cromosómica, característica común entre los agentes antimitóticos (Abal *et al.*, 2003), lo que es indicativo de que la tubulina puede ser su diana de acción.

Este ensayo se llevó a cabo en un citómetro de flujo, en el que se obtiene un histograma representativo de la población celular, donde se encuentran tres regiones bien definidas (figura 22, control). La primera región corresponde a la fase G_0/G_1 , que es la fase de reposo y de presíntesis de ADN, donde hay células diploides. La región media entre picos corresponde a la fase S o de síntesis, es una meseta en la cual la célula duplica su contenido de ADN, convirtiéndose en tetraploide (4n). Después de esta fase aparece un pico menor correspondiente a las células en fase G_2/M , que tiene doble contenido de ADN (4n). En algunos casos podría aparecer en células tratadas con algunos compuestos una región llamada sub- G_0/G_1 que corresponde a células con menor contenido en ADN, lo cual puede correlacionarse con células en apoptosis.

Así pues, se incubaron células de carcinoma de pulmón A549 en presencia de concentraciones crecientes de cada ligando (10nM a 20 μ M) durante 20 horas. Los valores expresados en cada gráfico (figura 22) corresponden a la mínima concentración de ligando a la cual, el ciclo se encuentra totalmente detenido en la fase G_2/M .

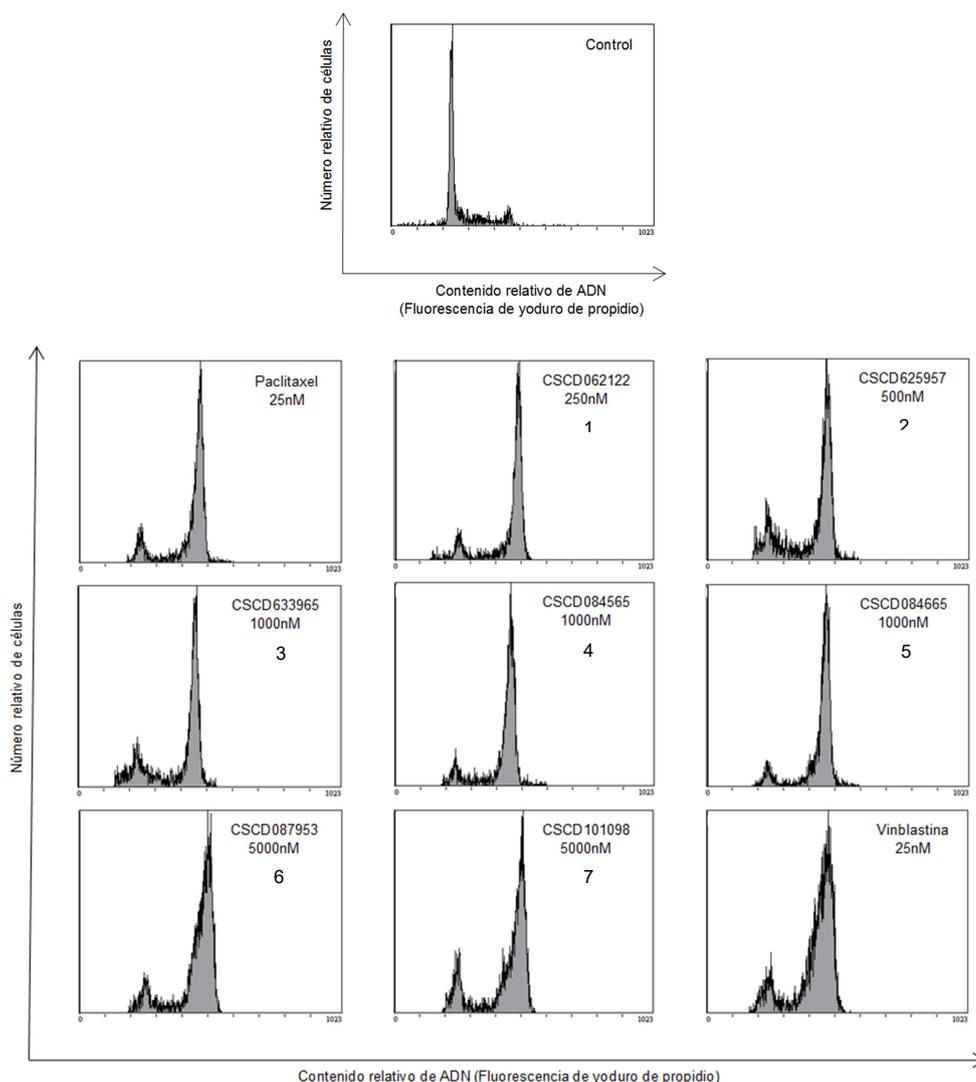


Figura 22: Efecto sobre el ciclo celular en células A549 en presencia de paclitaxel, de los compuestos objeto de estudio y de vinblastina. El ciclo celular control (arriba) se obtuvo con células sin tratar o tratadas con el vehículo de los ligandos. Se muestra la mínima concentración a la que se genera la máxima acumulación de células en la fase G₂/M del ciclo celular.

De manera homóloga a la determinación de la citotoxicidad, este ensayo reveló que el ligando más activo, el que requiere una menor concentración para detener el ciclo celular es el compuesto **1**, seguido del compuesto **2**. A pesar de esto, tanto el paclitaxel como la vinblastina, utilizados como controles positivos, mostraron valores un orden de magnitud más bajo que los del ligando más activo de la serie (25nM frente a 250nM).

Además, se concluye que los compuestos **6** y **7** son los menos activos en ambos ensayos, siendo 5μM la concentración requerida para que dichos ligandos detengan el ciclo celular en la fase G₂/M en las condiciones ensayadas.

2.3. Efecto sobre la red de microtúbulos citoplásmicos, los husos mitóticos y la morfología de los núcleos celulares

Como ya se ha mencionado, la detención del ciclo celular es un efecto característico de los agentes antimitóticos. Para confirmar que los compuestos objeto de

estudio se comportan como antimitóticos, se llevó a cabo el estudio de su efecto sobre la red de microtúbulos, la mitosis y sobre la morfología de los núcleos celulares, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta en células A549.

Las muestras fueron comparadas con aquellas obtenidas en presencia de paclitaxel, como modelo de agente estabilizante de microtúbulos (Díaz *et al.*, 1993) y con las obtenidas en presencia de vinblastina, como modelo de despolimerizador de microtúbulos (Hodgkinson *et al.*, 1992; Gigant *et al.*, 2005).

Para el desarrollo del experimento, se cultivaron células durante 24h a 37°C en presencia de concentraciones crecientes de ligando (desde 10nM hasta 20µM), siendo la concentración representada aquella a la que se observó mayor efecto a una menor concentración. En ningún caso se utilizaron volúmenes de DMSO (el vehículo de los ligandos) superiores al 0.5% v/v.

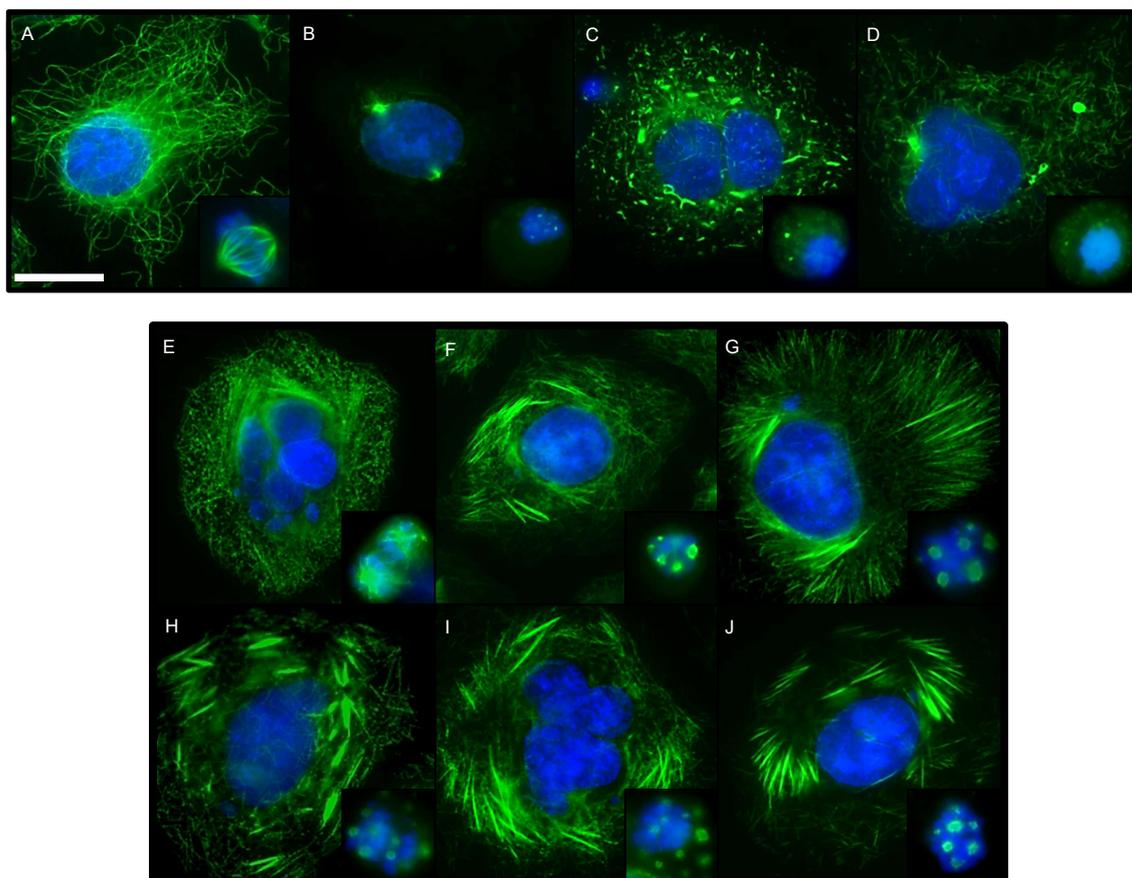


Figura 23: Efecto de los compuestos de la serie CSCD sobre la red de microtúbulos citoplásmicos, ensayado sobre células de la línea A549 en interfase, husos mitóticos y morfología nuclear. Los microtúbulos se marcaron en verde con el anticuerpo DM1A contra α -tubulina, mientras que el ADN se marcó en azul con Hoechst 33342 en células interfásicas y en los husos mitóticos (insertos). A: Control de células no tratadas o tratadas con DMSO (vehículo de los ligandos). B: vinblastina, 50nM. C: **2**, 5µM. D: **3**, 5µM. E: taxol, 50nM. F: **1**, 100nM. G: **4**, 5µM. H: **5**, 5µM. I: **6**, 5µM. J: **7**, 5µM. La barra situada en el panel A representa 10µm. Todos los paneles mostrados tienen el mismo aumento.

La observación de las imágenes permite establecer una clara diferencia entre los efectos provocados por los compuestos **2** y **3** (figura 23, C y D), que tienen la estructura química que más difiere del resto, y los efectos provocados por los demás compuestos

de la serie. Los compuestos **2** y **3** muestran carácter despolimerizador, presentando la red de microtúbulos en diferentes estados de fragmentación, con su tubulina formando acúmulos proteicos de diferentes tamaños distribuidos por todo el citosol. Adicionalmente se pueden observar células mitóticas con el material genético condensado formando una esfera y con evidencias de los microtúbulos del huso mitótico (husos de tipo III), o sin microtúbulos (husos tipo IV) (Jordan *et al.*, 1992). Estos efectos son comparables a los observados en el caso de las células tratadas con vinblastina (figura 23, B), ejemplo de fármaco despolimerizador de microtúbulos.

A pesar de encontrar similitudes, también existen diferencias significativas entre los efectos causados por la vinblastina y **2** y **3**. Mientras que la vinblastina desintegra completamente la red de microtúbulos hasta no apreciar apenas tubulina en las células, parece que los compuestos **2** y **3** fragmentan la red produciendo segmentos observables. Estos segmentos podrían ser estadios previos en la desintegración de la red, y se considera que podría obtenerse un efecto más similar al producido por la vinblastina a 50nM aumentando la concentración (figura 23, B). Para analizar esta posibilidad se comparó el efecto a altas concentraciones de los tres ligandos (figura 24).

En el primer panel se observa que la vinblastina induce la formación de paracristales. Está descrito en la bibliografía que a concentraciones superiores a 1 μ M de vinblastina, se induce la formación de paracristales poligonales y largos de tubulina (Na y Timasheff, 1982; Himes, 1991; Jordan *et al.*, 1992). Estas estructuras sólo se observan, por tanto, en las muestras incubadas con dicho fármaco a una concentración superior a 1 μ M (5 μ M y 20 μ M).

En cambio, los compuestos **2** y **3** no llegan a inducir la formación de estas estructuras ni desintegran por completo la red de microtúbulos, sino que forman agregados irregulares de tubulina en torno al núcleo. Este hecho indica que, a pesar de que estos ligandos son capaces de fragmentar la red de microtúbulos a bajas concentraciones (inferiores a 5 μ M), no actúan como la vinblastina, ya que provocan la agregación de la proteína a concentraciones superiores.

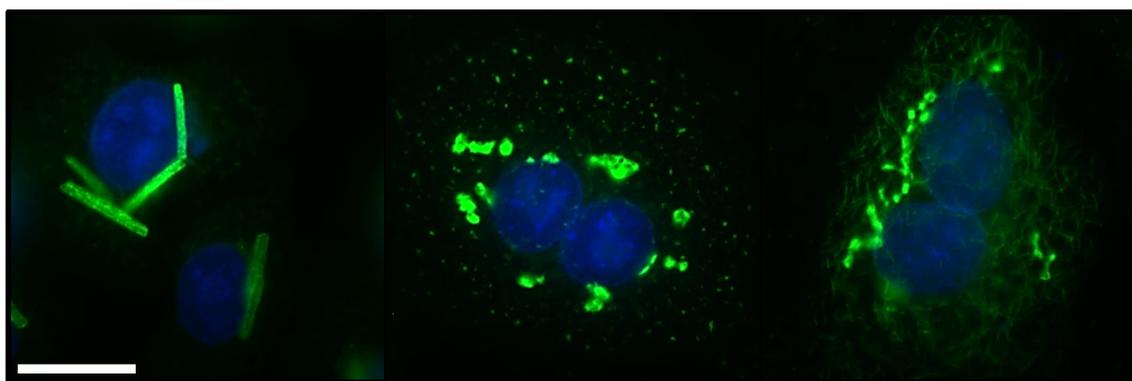


Figura 24: Efecto de 20 μ M de vinblastina (izquierda), 20 μ M de **2** (centro) y 20 μ M de **3** (derecha) sobre la red de microtúbulos citoplásmicos, ensayo sobre células de la línea A549 en interfase, husos mitóticos y morfología nuclear. Los microtúbulos se marcaron en verde con el anticuerpo DM1A contra α -tubulina, mientras que el ADN se marcó en azul con Hoechst 33342 en células interfásicas A549. La barra situada en el panel de la izquierda representa 10 μ m. Todos los paneles mostrados tienen el mismo aumento.

El resto de compuestos induce la formación de un gran número de manojos de microtúbulos cortos y densos (figura 23, F, G, H, I y J), estructuras características de los

agentes estabilizantes de microtúbulos como el paclitaxel (figura 23, A) (Barasoain *et al.*, 2010). Estas estructuras se forman como consecuencia de un contacto lateral entre los microtúbulos, mejorado por acción de los ligandos.

No obstante, como ocurre al comparar los compuestos **2** y **3** con la vinblastina, también se observan diferencias entre las células tratadas con el resto de compuestos y las tratadas con paclitaxel. Mientras que con los ligandos objeto de estudio se observan células mitóticas aberrantes con husos pequeños y multipolares, en el caso del paclitaxel las mitosis tienen un aspecto diferente y presentan, como es esperable, uno o dos polos, notablemente más grandes y estrellados que en el caso de los compuestos analizados (Evangelio *et al.*, 1998).

En cuanto a la morfología nuclear, el paclitaxel induce la aparición de células micronucleadas, característica propia de agentes estabilizantes y observable también en presencia de estos ligandos.

Al comparar, a continuación, el efecto causado por altas concentraciones de ligando (20 μ M), se advirtió que los compuestos **1**, **4**, **5**, **6**, y **7** presentan agregados de tubulina similares y en algunos casos más pequeños que los anteriormente descritos (datos no mostrados). Dichos agregados no aparecen en aquellas células tratadas con concentraciones altas de paclitaxel.

2.4. Estudio de la reversibilidad de los efectos celulares de los compuestos

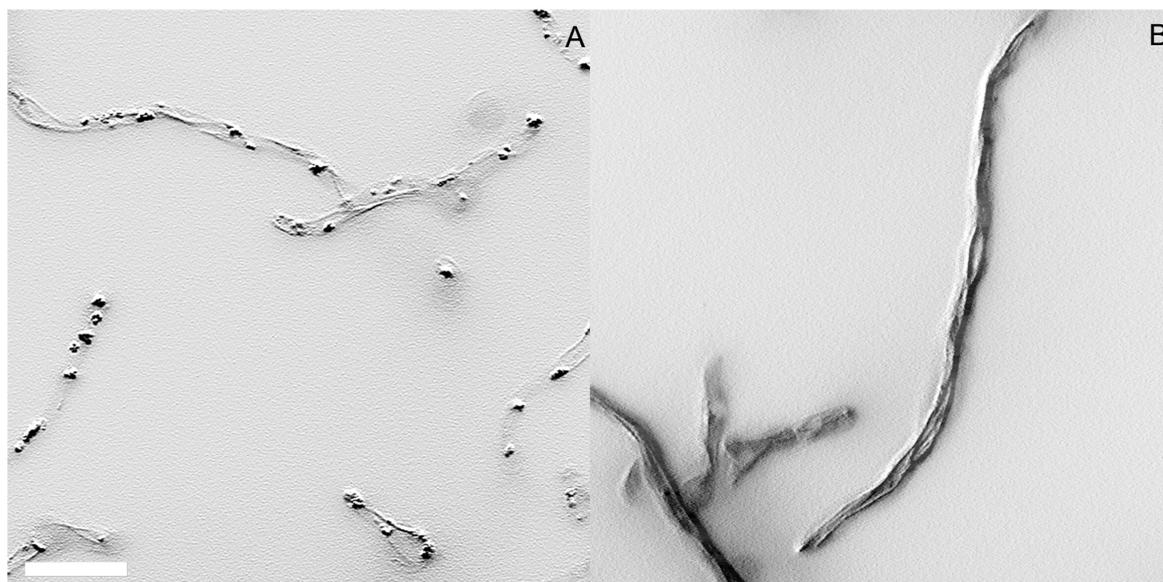


Figura 25: A: Efecto agregante de 20 μ M del compuesto **1** sobre la tubulina de *Aspergillus nidulans*, tras un tratamiento de 30min a 28°C con el compuesto. B: Recuperación de la morfología funcional de la red de microtúbulos. La barra situada en el panel A representa 10 μ m. Ambas imágenes tienen el mismo aumento.

La mayoría de los compuestos que se unen a la tubulina, lo hacen de manera reversible y al mismo tiempo, la mayoría de los que se unen de manera reversible se comportan mayoritariamente como inhibidores de la dinámica de los microtúbulos, como por ejemplo, la vinblastina (Panda *et al.*, 1996; Sackett, 2008).

Para el estudio de la reversibilidad, se analizó el efecto de los compuestos sobre la red de microtúbulos del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*, un experimento que

fue realizado en colaboración con el profesor Miguel Ángel Peñalva, del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) de Madrid (Hernández-González *et al.*, 2015).

Se realizó una incubación durante 30min a 28°C, de una muestra de hongos incubada en medio WMM en presencia de 20µM del compuesto **1** y, a continuación, se reemplazó el WMM por un medio nuevo sin ligando añadido, a modo de lavado. Se realizaron fotografías de los hongos tratados con un microscopio de epifluorescencia, antes y después de dicho lavado.

En base a los resultados obtenidos se observa, tal y como se ha mostrado anteriormente (figura 23, F), que el compuesto **1** induce la formación de agregados de tubulina. Además, transcurridos 15min desde la substitución del medio por otro fresco sin ligando, se comprobó que la red de microtúbulos recupera su morfología funcional, idéntica a la de los controles (figura 25).

3. Efecto de los ligandos en el ensamblaje de tubulina

Una vez conocida la toxicidad de los compuestos objeto de estudio y confirmada su interacción con la red de microtúbulos en líneas celulares humanas, así como la reversibilidad de la reacción, se decidió estudiar si dicha acción tiene lugar a través de la unión con la tubulina o con alguna otra proteína asociada a los microtúbulos y, en ese caso, de qué manera modulan el ensamblaje.

3.1. Unión a la tubulina

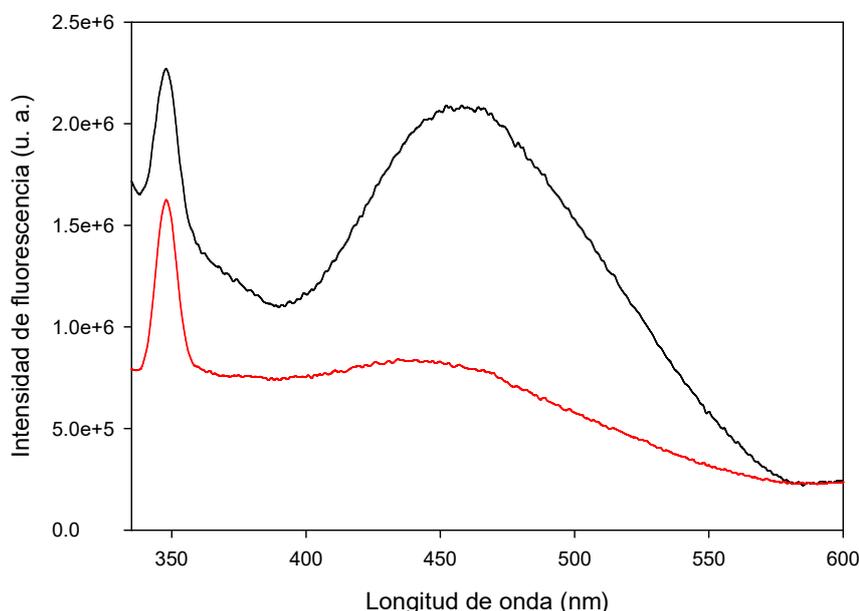


Figura 26: Espectros de emisión de fluorescencia de 10µM del compuesto **1** libre (rojo) y unido, incubado en presencia de una concentración de tubulina de 10µM (negro). Espectros obtenidos a 25°C en tampón NaPi (0.1mM GTP).

Para detectar una posible unión a la tubulina se compararon las señales de fluorescencia del ligando en presencia y ausencia de tubulina. Para ello, se excitó el ligando **1** a una longitud de onda próxima a su máximo de absorbancia, y se comprobó

si existía una señal de emisión de fluorescencia diferencial y suficientemente grande como para poder discernir con claridad, entre la forma libre y la forma unida a la tubulina. El fenómeno de “emisión adquirida” tiene lugar como consecuencia de varios procesos que pueden ocurrir en el momento de la unión y que alteran el rendimiento cuántico de una molécula: una disminución en la rotación intramolecular de algún enlace que disminuya las posibilidades de una relajación térmica y aumente las de una relajación fluorescente, una interacción positiva con algún aminoácido de la proteína (por ejemplo, un apilamiento de enlaces π aromáticos que aumente la rigidez de la molécula) o un favorecimiento de las excitaciones electrónicas como consecuencia del medio (por ejemplo, un medio apolar desfavorece la aparición de puentes de hidrógeno que puedan desplazar hacia ellos la densidad electrónica dificultando la excitación) (Lakowicz, 2006). Así pues, disponer de un conjunto de ligandos con estas características permite monitorizar la unión con facilidad.

Debido a que los compuestos **2** y **3** absorben por debajo de 280nm, su espectro de emisión solapa completamente con el de la tubulina, un mejor fluoróforo, por lo que no fue posible utilizar técnicas de fluorescencia para seguir la unión de dichos ligandos. En el caso de los otros cinco compuestos, sí se obtuvo una señal de emisión diferencial entre sus formas libres y unidas, con un máximo en torno a 460nm, después de una excitación a 320nm de una mezcla de 10 μ M de ligando con 10 μ M de proteína (figura 26). Este hecho indica que existe interacción entre, al menos, los cinco compuestos citados y la tubulina, en las condiciones del ensayo.

3.2. Modulación de la polimerización de tubulina

La tubulina ensambla para formar microtúbulos, mediante condensación nucleada no covalente, de manera cooperativa. La concentración crítica (Cr) es el valor por encima del cual, la tubulina en equilibrio polimeriza para formar microtúbulos (Oosawa y Asakura, 1975; Himes *et al.*, 1977). El valor de Cr mostrado por la tubulina es alterado por la composición del medio, ya que éste modula dramáticamente la concentración de proteína requerida para que el ensamblaje tenga lugar. Además, una molécula que interacciona con la tubulina, también altera el equilibrio aumentando o disminuyendo el grado de polimerización. Si el valor de Cr disminuye como efecto de la interacción con un ligando, éste mismo será considerado como agente estabilizante y si aumenta, será considerado como agente desestabilizante (Buey *et al.*, 2005).

Como se ha dicho, el medio en el que se lleva a cabo el ensayo constituye un factor determinante en la concentración crítica. Así pues, se calcularon los valores de Cr para los siete ligandos en tampón con y sin glicerol (1mM de GTP) añadiendo en cada caso un exceso del 10% c/c de compuesto frente a la concentración de tubulina.

La interacción del glicerol con la tubulina es termodinámicamente desfavorable ya que incrementa el potencial químico de la proteína. La unión entre heterodímeros de tubulina reduce el número de contactos con el glicerol y desciende, por tanto, la energía libre (Na y Timasheff, 1981), favoreciéndose de este modo la polimerización.

Como se puede observar en los dos gráficos mostrados (figura 27), los ligandos estudiados inducen el ensamblaje *in vitro* de la tubulina en cualquiera de los dos tampones. El compuesto **1** posee un efecto ligeramente mayor al del resto en GAB, mientras que el **7** es claramente el menos activo de la serie en ambos casos. Además, los compuestos **2** y **3**, muestran actividad de la misma forma que el resto.

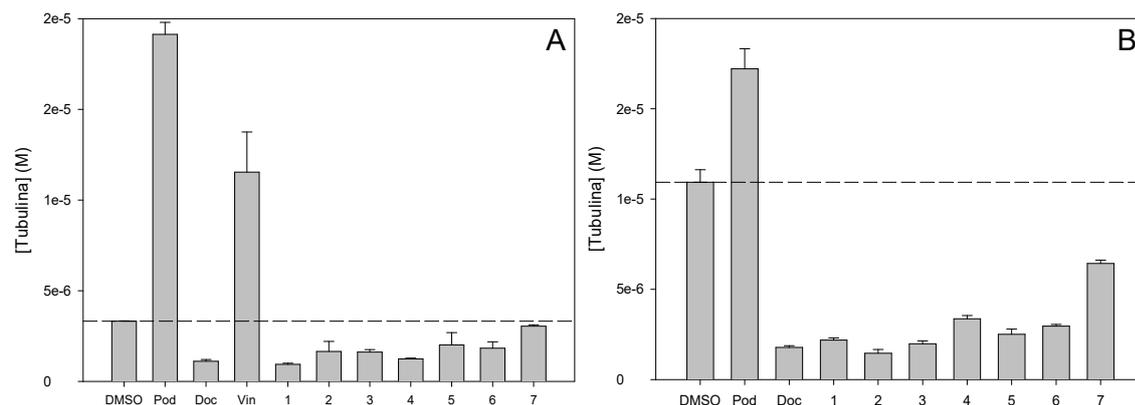


Figura 27: Efecto de los ligandos en el valor de concentración crítica, a 37°C, en tampón con glicerol (A, tampón GAB 6mM MgCl₂) y sin glicerol (B, tampón PEDTA 7mM MgCl₂). Se representa la concentración de tubulina en el sobrenadante después de una centrifugación de 20µM de proteína y un 10% c/c de exceso de ligando. Se muestran las determinaciones con DMSO, como control sin ligando (la línea discontinua marca su valor); podofilotoxina, como control negativo y docetaxel, como control positivo. El valor en presencia de vinblastina se muestra exclusivamente en el gráfico A.

En la determinación del efecto inducido por un exceso del 10% c/c del ligando **1** sobre diferentes concentraciones de tubulina, se observa el mismo resultado en todos los casos (datos no mostrados), lo que confirma la existencia de concentración crítica.

El estudio en presencia de vinblastina resulta también de interés ya que permite contrastar el carácter despolimerizador de esta droga respecto al efecto observado en presencia de los compuestos **2** y **3**. No obstante, sólo se analizó el efecto en tampón GAB ya que se conoce que una droga desestabilizante de microtúbulos, en medio sin glicerol, modula el valor de Cr de una manera similar a la podofilotoxina.

Este estudio confirma el carácter polimerizador de los ligandos **2** y **3**, a pesar de que fragmentan la red de microtúbulos en los ensayos de inmunofluorescencia.

4. Unión a los diferentes estados de agregación de la tubulina

Hasta este punto, la tubulina ha sido identificada como la molécula diana de los compuestos objeto de estudio y se ha descrito la manera en que dichos compuestos modulan el ensamblaje de la proteína en equilibrio. Mediante la posterior determinación de la unión a los demás estados de agregación que se presentan en la célula (dímeros, tetrámeros o microtúbulos) se puede aproximar el mecanismo de acción de los ligandos.

4.1. Unión a microtúbulos

La conformación de la tubulina en solución y la de los microtúbulos es diferente, por lo que, un compuesto puede unirse de manera diferencial a estos dos estados de agregación (Smith y Jordan, 2010). Para estudiar la unión al microtúbulo se emplearon polímeros estabilizados con glutaraldehído según se detalla en la sección 4.2 del capítulo de Materiales y métodos.

Durante la realización de este experimento se incubaron microtúbulos estabilizados (20µM) en presencia de concentraciones crecientes del compuesto **1**

(desde 2 μ M hasta 50 μ M), a 37°C. Después de centrifugar las muestras, toda la proteína aparece en el precipitado (Díaz *et al.*, 2000) y se considera que todo el compuesto sedimentado en esa misma fracción es aquel que es capaz de unirse. La concentración de ligando se siguió por HPLC con el método determinado previamente (tabla 3).

Se observa que la concentración en el precipitado es cero o próxima a cero independientemente de la concentración de ligando añadida (figura 28). No obstante, el valor parece incrementarse en los puntos más altos, aunque este hecho podría ser explicado como fruto del atrapamiento de una pequeña cantidad de ligando en el precipitado. De esta manera se determinó que el compuesto **1** no se une a los microtúbulos preformados.

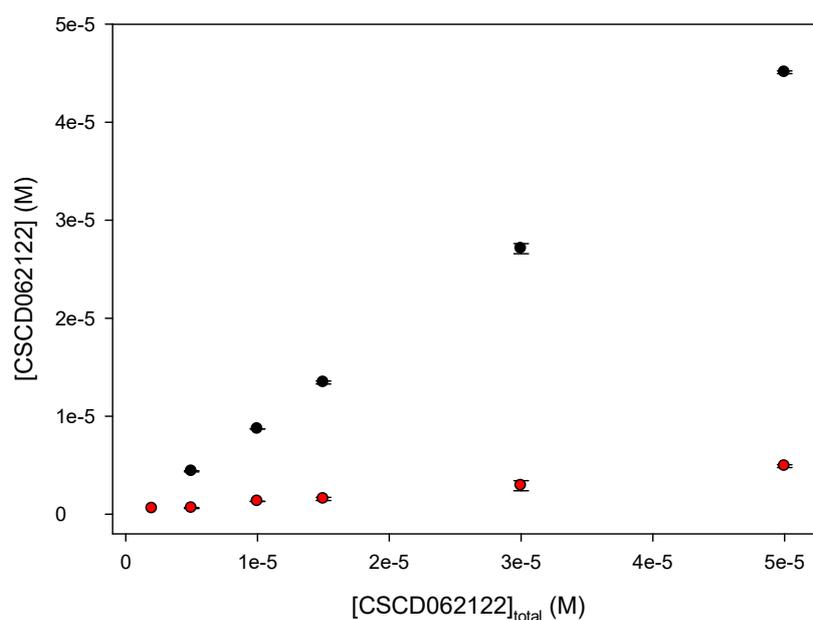


Figura 28: Presencia del compuesto **1** en el sobrenadante (negro) y en el precipitado (rojo) después de una centrifugación con concentraciones crecientes de ligando junto a 20 μ M de microtúbulos estabilizados, a 37°C.

4.2. Competición con el sitio del paclitaxel y con el de la laulimalida

En la literatura está descrito que tanto el sitio del paclitaxel (Díaz *et al.*, 2000) como el sitio de la laulimalida (Pera *et al.*, 2010) son accesibles en los microtúbulos estabilizados.

Para analizar, en primer lugar, la competición con el sitio del paclitaxel, se ensayaron las variaciones en las medidas de anisotropía de fluorescencia, r , para flutax-2, a 37°C, de muestras con 50nM de microtúbulos estabilizados incubadas con el análogo fluorescente a una concentración de 50nM, como efecto de la adición de concentraciones crecientes de compuesto **1** o de docetaxel, como control positivo (desde 10nM hasta 10 μ M) (Buey *et al.*, 2007).

A la vista de los resultados (figura 29), se concluye que el compuesto **1** no compite con el paclitaxel, ya que la señal del flutax-2 no disminuye ni ante una concentración 200 veces superior del ligando objeto de estudio. El docetaxel, en cambio, alcanza un desplazamiento superior al 90% en el punto más concentrado, por lo que queda demostrada su competición con el sitio del paclitaxel.

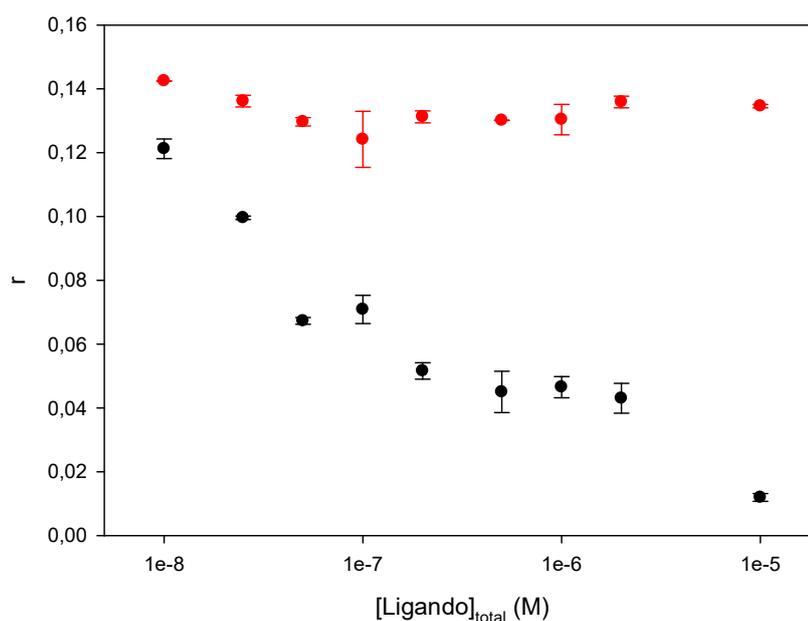


Figura 29: Desplazamiento de flutax-2 con concentraciones crecientes de docetaxel (negro) y de **1** (rojo), medido a través de la variación en la señal de anisotropía de fluorescencia, excitando a 492nm y leyendo con un filtro de corte de 530nm.

A continuación, la competición por el sitio de la laulimalida se analizó incubando una concentración de 5µM de microtúbulos estabilizados junto a 5µM de laulimalida durante 30min, a 37°C. Más tarde se añadieron concentraciones crecientes del compuesto **1** (desde 0 hasta 30µM) y se centrifugaron las muestras durante 20min a 50krpm (108628g) y 37°C.

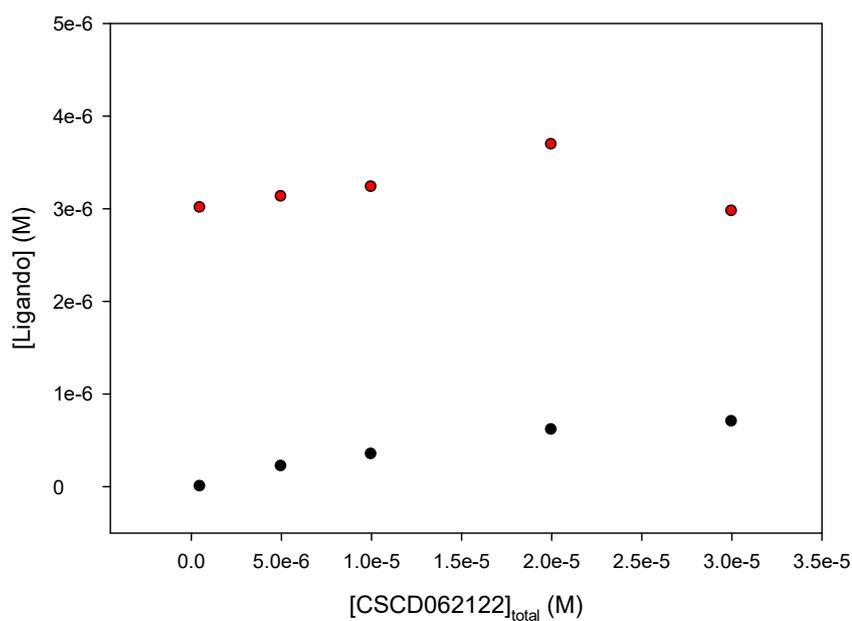


Figura 30: Determinación por HPLC de la concentración del compuesto **1** (negro) y de la laulimalida (rojo) en el precipitado después de una centrifugación de 5µM de microtúbulos estabilizados y 5µM de laulimalida en presencia de concentraciones crecientes de ligando.

Después de separar sobrenadante de precipitado en todas las muestras (los microtúbulos sedimentan fácilmente al precipitado), se siguió la concentración de los compuestos por HPLC.

Este experimento reveló que el compuesto **1** tampoco compite con la laulimalida por el sitio de unión (figura 30). Se observa, sin embargo, una presencia creciente de compuesto **1** en el precipitado a medida que se incrementa la concentración total, que puede ser debido a una interacción inespecífica con la proteína. Además, esa concentración en el precipitado no alcanza en ningún caso el valor de $5\mu\text{M}$, concentración de ligando que se encontraría unido a $5\mu\text{M}$ de microtúbulos en presencia de un gran exceso respecto a la proteína (seis veces en el punto más concentrado), en caso de que la unión tuviese lugar.

Al no observarse competición del compuesto **1** por los sitios accesibles en microtúbulos, se confirma el resultado previo (figura 28) de que el ligando estudiado no es capaz de unirse específicamente al polímero estabilizado de tubulina.

4.3. Unión a dímeros de tubulina

Descartada la unión de los compuestos a los microtúbulos, se estudió su unión al heterodímero de tubulina estabilizado. Si una concentración determinada de tubulina se preincuba con concentraciones equimolares ($20\mu\text{M}$) del compuesto PM060184, se producen dímeros que no pueden ensamblar entre sí para producir oligómeros mayores (Pera *et al.*, 2013; Prota *et al.*, 2014).

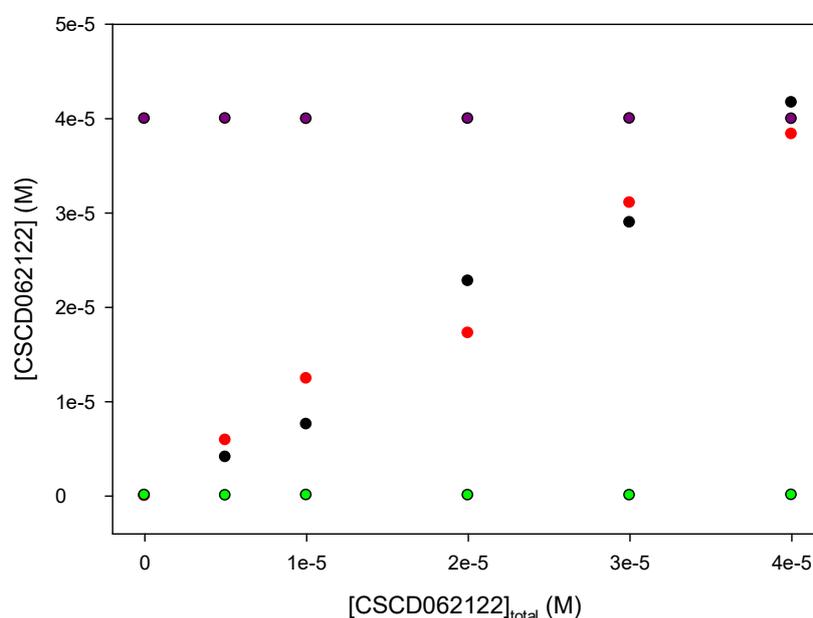


Figura 31: Unión del compuesto **1** a dímeros estabilizados. En negro se muestra la concentración de ligando presente en la mitad superior y en rojo la de la mitad inferior, mientras que en verde se representa la concentración de tubulina en la mitad superior y en morado la de la inferior, después de una centrifugación de $20\mu\text{M}$ de proteína en presencia de concentraciones crecientes de compuesto, a 100krpm (434513g) durante 2h y a 25°C .

Este sistema permite estudiar si un ligando es capaz de unirse a la tubulina en su forma dimérica, siempre que el sitio de unión del ligando objeto de estudio no sea

coincidente con el del PM060184 y que su constante de afinidad por la proteína sea notablemente inferior a la del PM060184, que se encuentra en torno a 10^9M^{-1} . En este caso, el sistema se consideró apto ya que, en base a la citotoxicidad calculada se conoce que el compuesto **1** es 50 veces menos activo que la vinblastina (tabla 4) y al mismo tiempo está descrito que la vinblastina a su vez es 25 veces menos activa que el PM060184 (Pera *et al.*, 2013). Así pues, se estima que el ligando **1** es aproximadamente 3 órdenes de magnitud menos afín que el PM060184.

Por tanto, estos dímeros bloqueados se incubaron con concentraciones crecientes de **1** (desde 0 hasta $40\mu\text{M}$) en tampón PEDTA 0.1mM de GTP y 1.5mM MgCl_2 , a 25°C y se centrifugaron a altas velocidades con el fin de separar una fracción sin proteína y otra con ella (sección 4.1 del presente capítulo). La concentración de ligando en cada fracción se siguió por HPLC y la de tubulina por absorbancia del BCA.

Como puede apreciarse en la figura 31, la concentración de ligando en ambas fracciones es la misma, con lo que se deduce que la concentración de ligando unido es cero. Por tanto, se concluye que el compuesto **1** no se une al dímero, bien por no tener la capacidad, o bien por competir con el PM060184, un ligando mucho más afín.

Así pues, el hecho de que el compuesto **1** no se una a los dímeros estabilizados sugiere que su sitio de unión se encuentra en la región interdimérica y necesita que se unan, al menos, dos dímeros entre sí para que el sitio esté completo.

4.4. Unión a tetrámeros de tubulina

La hipótesis de que la unión del compuesto **1** requiere la unión de dos heterodímeros de tubulina entre sí, puede probarse mediante la caracterización de la unión del ligando a un tetrámero estabilizado por el ensayo de velocidad de sedimentación de ultracentrifugación analítica. La formación de tetrámeros estables se logra usando un tipo concreto de proteínas asociadas a la tubulina.

La estatmina u oncoproteína Op18 es una fosfoproteína citosólica de 17 kDa que tiene un papel fundamental como factor desestabilizante de microtúbulos (Gigant *et al.*, 2000). Como efecto de la unión de la estatmina todas las funciones clave de los microtúbulos, tales como división celular, transporte intracelular, motilidad celular o mantenimiento de forma se ven dramáticamente afectadas (Steinmetz, 2007) habiéndose demostrado además que se expresa de forma más activa en algunos tipos de cánceres como el sarcoma (Baldassarre *et al.*, 2005). Ejerce su papel desestabilizante en su forma no fosforilada (Steinmetz *et al.*, 2000), incrementando el ratio de catástrofe dentro de la dinámica de los microtúbulos y secuestrando tubulina libre, reduciendo así la concentración de tubulina dimérica disponible para ensamblar (Devred *et al.*, 2008).

RB3 es una proteína neural que comparte el dominio de unión a microtúbulos con la estatmina Op18 (Honnappa *et al.*, 2003). Se une a dos dímeros alineados y polarizados, por la cara opuesta a la del dominio de vinca y, por su extremo N-terminal contacta con el extremo negativo del tetrámero formado a modo de capuchón. Esta unión constituye la estructura conocida como T_2R que no tiene la capacidad de polimerizar ni la de desensamblarse (Gigant *et al.*, 2005). Por este motivo se considera que la estructura T_2R es un tetrámero estabilizado.

La estructura de este complejo resuelta a 3.5Å (figura 32), demuestra que la posición relativa entre los dímeros está ligeramente curvada lo que favorece la

desestabilización de los microtúbulos. No obstante, está descrito que la proteína RB3 es capaz de unirse tanto a dímeros rectos, presentes por ejemplo en los microtúbulos, como a los curvados, generando en todos los casos estructuras tetraméricas curvadas (Barbier *et al.*, 2010). Cuando la proteína RB3 carece de su extremo N-terminal, el tetrámero que se forma sí tiene la capacidad de contactar con otros tetrámeros formando anillos (Gigant *et al.*, 2005).

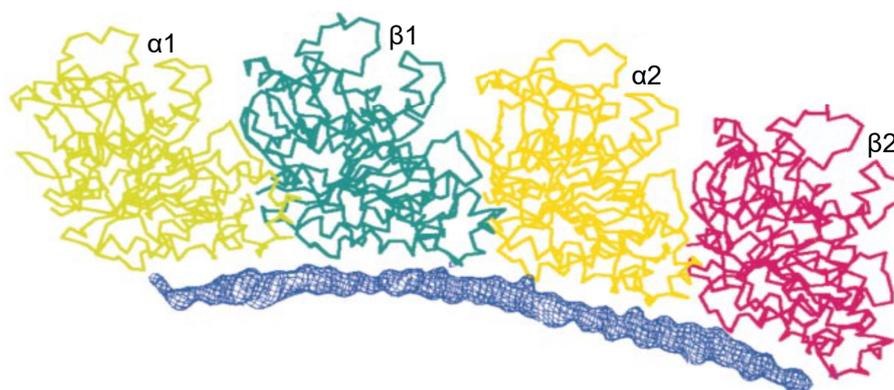


Figura 32: Figura modificada de Gigant, 2000. Reconstrucción cristalográfica del sistema T_2R donde se observa el contacto de la proteína RB3 a los cuatro monómeros y la posición relativa curvada entre los dos heterodímeros de tubulina.

El sistema T_2R resulta de interés para el estudio de compuestos que se unen en el dominio de vinca, sitio de unión ubicado en la región interdimérica $\alpha 2$ - $\beta 1$, ya que éste se encuentra formado, estable y perfectamente accesible desde el primer momento.

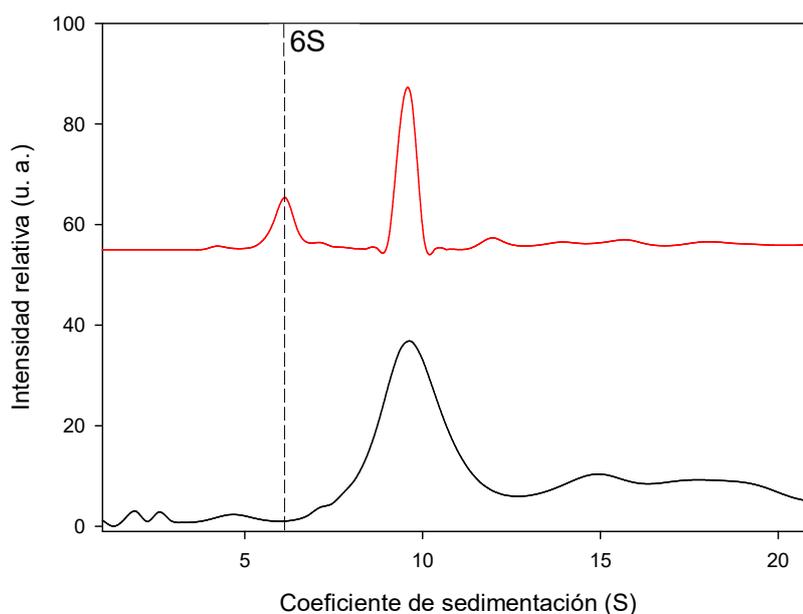


Figura 33: Distribución de coeficientes de sedimentación de una muestra de $10\mu M$ de tubulina con $2.5\mu M$ de RB3 y $12\mu M$ del ligando **1** en tampón DTT con $0.1mM$ de GTP y $1.5mM$ de $MgCl_2$, a $25^\circ C$. En negro se muestra la absorbancia a $320nm$ (ligando) y en rojo la interferencia de la proteína. La línea discontinua representa el coeficiente de sedimentación del dímero de tubulina.

La proteína RB3 presenta una alta afinidad por la tubulina ($K_a = 6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) en tampón DTT (Honnappa *et al.*, 2003), por lo que, en el rango micromolar, una relación de concentraciones de 2:1 de tubulina frente a ésta dispone toda la proteína en su forma tetramérica.

Ensayando la unión en una muestra con $10\mu\text{M}$ de tubulina y $2.5\mu\text{M}$ de RB3, incubada en presencia de $12\mu\text{M}$ del ligando **1**, por AUC se observó la forma tetramérica (a 9.5S), cierta cantidad de proteína en su forma dimérica (a 6.0S) y también una pequeña concentración de oligómeros procedentes, probablemente, de la agregación del dímero inducida por el ligando. Además, a partir de la distribución de coeficientes obtenida por absorbancia a 320nm se comprobó que el compuesto **1** sí se une a la proteína en su forma tetramérica y además, se confirmó la no unión de dicho compuesto al dímero. Esto es debido a que se observó un máximo de absorbancia alineado con la especie tetramérica, mientras que no se observó máximo alguno a 6.0S (figura 33).

4.5. Competición con los sitios de la colchicina, del compuesto PM060184 y con el dominio de vinca

Considerando la unión del compuesto **1** a los diferentes estados de agregación de la tubulina, se observa que el compuesto no puede unirse al microtúbulo ni al dímero, pero sí que es capaz de hacerlo a la forma tetramérica, lo que indica que el lugar implicado en el contacto se encuentra en la región interdimérica. Para ahondar en la identificación del sitio de unión de todos los compuestos de la serie, se estudió, por fluorescencia, la competición con los sitios no accesibles en el microtúbulo: El sitio de la colchicina, el del compuesto PM060184 o el dominio de vinca.

Para la realización de este ensayo se escogieron como sondas los compuestos **1** y **4**, por ser los más activos según el estudio de citotoxicidad (tabla 4), de aquellos que presentan homología estructural. De esta manera, un mismo resultado para ambos compuestos permite determinar el sitio de unión de los demás compuestos homólogos (**5**, **6** y **7**) en base a dicha homología.

Se compararon, por tanto, los espectros de emisión de muestras con $10\mu\text{M}$ de tubulina y $10\mu\text{M}$ de compuesto (**1** y **4**, en paralelo) incubadas en presencia de $20\mu\text{M}$ de diversos competidores en tampón NaPi (0.1mM GTP), a 25°C . Estos competidores fueron seleccionados en función de que no interfiriesen en la señal del ligando estudiado. Por este motivo, se considera que la podofilotoxina es una sonda más apropiada que la colchicina para estudiar la competición con el sitio de unión que comparten. En el caso de la vinblastina, se hizo una excepción ya que, a pesar de interferir ligeramente con la emisión de los compuestos objeto de estudio, a lo largo de todo este proyecto resultó de interés la comparación entre los compuestos estudiados y dicho fármaco quimioterapéutico.

En cuanto a la muestra sin competidor, cabe destacar que se añadió en ella el mismo volumen de DMSO que en el resto de casos para suprimir el efecto del disolvente de la medida.

La unión del ligando **1** fue medida por fluorescencia, tal y como se explica en el apartado 3.1 del presente capítulo, excitando a 320nm (el máximo de absorbancia del ligando) y leyendo la emisión entre 380nm y 600nm. Así pues, una disminución en la señal corresponde a una menor concentración de compuesto (**1** ó **4**) unido al haber sido desplazado, en parte, por competición.

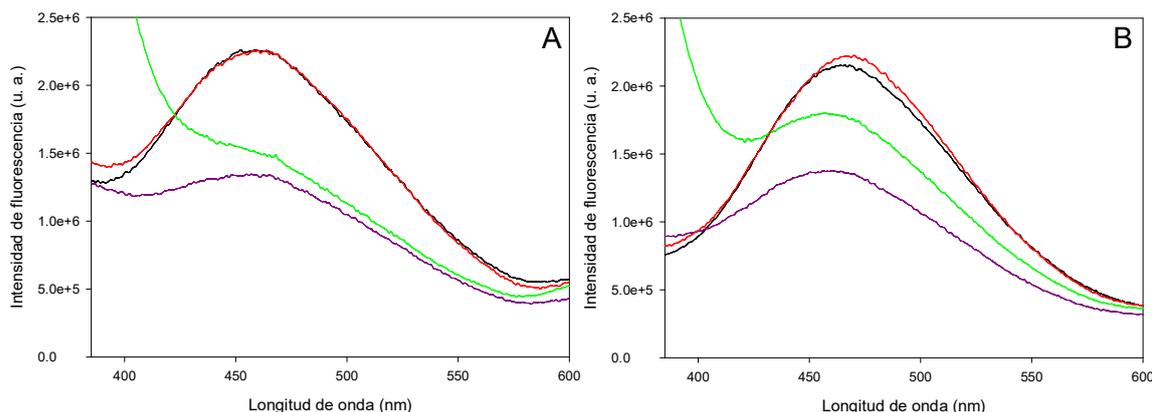


Figura 34: A: Espectros de emisión de fluorescencia de $10\mu\text{M}$ de tubulina y $10\mu\text{M}$ del compuesto **1** (A) ó **4** (B) en ausencia de competidores (con DMSO, negro), y en presencia de $20\mu\text{M}$ de podofilotoxina (rojo), vinblastina (verde) y PM060184 (morado).

Las medidas realizadas revelaron el mismo resultado para los dos ligandos estudiados (figura 34). No se observó en ningún caso competición por el sitio de la colchicina mientras que sí se apreció, tanto por el del compuesto PM060184, como por el dominio de los alcaloides de vinca. Como ya se ha mencionado, en presencia de vinblastina se aprecia una señal significativa a longitudes de onda inferiores a 450nm procedente del competidor unido (vinblastina), aunque en cualquier caso, se aprecia que el máximo a 460nm es menor que el control.

Por último, debido a que el resultado es coincidente en los dos casos estudiados, se puede concluir que el sitio de unión de los compuestos químicamente homólogos es el mismo y que éste se encuentra localizado en la región interdimérica. En cuanto a los compuestos **2** y **3**, no se puede establecer la misma relación, puesto que presentan diferencias significativas en cuanto a sus estructuras químicas.

5. Efecto del magnesio en el equilibrio tubulina-ligando

La concentración de iones de magnesio presentes en el medio afecta de un modo drástico al equilibrio de polimerización de la tubulina. En la proteína existen dos tipos de sitios de unión para el magnesio y se diferencian entre sí en función de la afinidad del sustrato por ellos.

El primero es de alta afinidad (del orden de 10^6M^{-1}) y está ubicado junto al sitio del nucleótido (tanto al sitio del nucleótido intercambiable como al no intercambiable). La proximidad entre el sitio del magnesio y el sitio del nucleótido permite que el ion metálico se comporte como cofactor en el enlace del GTP, siendo la interacción entre el magnesio y el GDP considerablemente más débil. Así pues, debido a que la unión del nucleótido GTP es el motor fundamental en el ensamblaje de tubulina, se puede decir que, al facilitar la unión del nucleótido, el magnesio en su sitio de alta afinidad altera la dinámica de polimerización de manera indirecta.

El segundo sitio del magnesio une los iones con una afinidad mucho menor (en un orden entre 10^2 y 10^3M^{-1}) y, a pesar de que su localización aún no está determinada, está descrito que el magnesio unido a él está involucrado en la polimerización de un modo directo (Menéndez *et al.*, 1998).

Una vez establecido que los compuestos objeto de estudio son capaces de perturbar el equilibrio químico de la tubulina al unirse a ella, se procedió a determinar la forma en que la concentración de magnesio interfiere en dicha unión. Para ello, se estimó mediante HPLC la saturación fraccional del compuesto unido (proporción de ligando unido respecto a la concentración de ligando total) en presencia de 0.2mM, 1.5mM y 3.0mM de cloruro de magnesio.

Se incubaron muestras con 5 μ M del compuesto **1** con concentraciones crecientes de tubulina (desde 0 hasta 10 μ M) en tampón PEDTA 0.1mM GTP y la concentración de magnesio adecuada en cada caso, a 25°C y se centrifugaron a 100krpm (434513g) durante 2h.

La manera de determinar las concentraciones de ligando libre y unido en condiciones que dificultan la polimerización de tubulina, consiste en la centrifugación de las muestras a estudio a velocidades que sedimentan la proteína, y la posterior separación de la mitad superior, libre de tubulina, y la mitad inferior. Bajo estas condiciones toda la proteína precipita, mientras que el ligando no lo hace. De este modo, la concentración de ligando libre puede ser determinada, ya que ésta es igual a la concentración medida en la mitad superior (Díaz *et al.*, 1993). La concentración de ligando libre es igual en ambas mitades, aunque en la inferior, adicionalmente, se encuentra toda la fracción unida a la proteína.

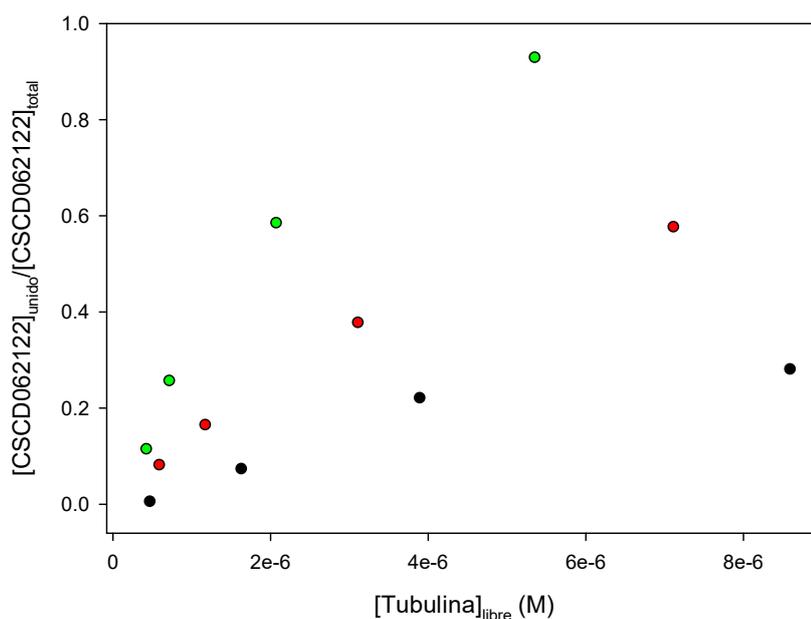


Figura 35: Saturación fraccional del compuesto **1** unido, frente a la concentración de tubulina libre, medida en tampón PEDTA con 0.1mM de GTP y 0.2mM (negro), 1.5mM (rojo) o 3.0mM de MgCl₂, a 25°C.

Se observa que la saturación fraccional es mayor a medida que se incrementa la concentración de magnesio (figura 35), con lo que se puede concluir que cuanto más magnesio hay en el medio (al menos hasta 3.0mM), una mayor fracción de proteína se encuentra oligomerizada y por tanto, más ligando está unido. De esta forma se observa que la unión del compuesto **1** guarda una relación directa con la oligomerización de tubulina, en este intervalo de concentraciones, independientemente de la concentración empleada de magnesio.

6. Modulación de la oligomerización

6.1. Oligomerización inducida por el compuesto 1

En la bibliografía se describe que la presencia de magnesio induce, por sí sola, la autoasociación isodésmica y oligomérica de la tubulina (Na y Timasheff, 1982). Debido a que se ha observado una relación directa entre la concentración de magnesio y la unión del ligando, se concluye que dicha unión se encuentra asociada a la oligomerización. Para la caracterización de la oligomerización de tubulina inducida por los compuestos, se abordó la determinación de los coeficientes de difusión de las especies formadas mediante el uso de técnicas de RMN.

En este caso, los experimentos fueron llevados a cabo en colaboración con el grupo del profesor Jesús Jiménez-Barbero del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) de Madrid, siendo el responsable el doctor Manuel Álvaro Berbís.

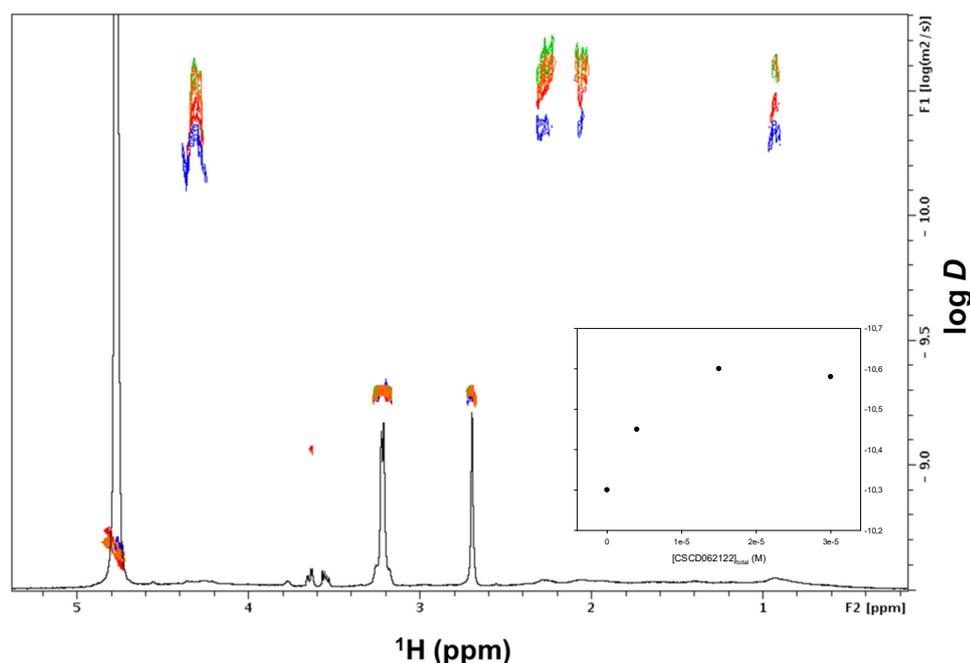


Figura 36: Espectros 2D de DOSY para 15µM de tubulina en presencia de concentraciones crecientes del compuesto **1**: 0µM (azul), 4µM (rojo), 15µM (naranja) y 30µM (verde). En negro se representa el espectro protónico 1D del ligando. El inserto representa la relación entre el logaritmo del coeficiente de difusión y la concentración de ligando total.

La figura 36 muestra los espectros DOSY (en tampón PEDTA deuterado con 0.1mM GTP y 1.5mM MgCl₂, a 25°C) obtenidos en presencia de concentraciones fijas de tubulina y crecientes del compuesto más activo, el **1**, superpuestos. En ella se aprecia que el coeficiente de difusión promedio de los complejos tubulina-compuesto formados varía desde $5 \cdot 10^{-11}$ m²/s para la muestra sin ligando (15µM de tubulina), hasta $2.5 \cdot 10^{-11}$ m²/s en presencia de 15µM de tubulina y 30µM de **1**. Dado que se puede establecer una relación inversa entre coeficiente de difusión y tamaño promedio de los complejos, se concluye entonces que el ligando objeto de estudio induce la formación de estructuras mayores, en promedio, que un dímero. Asimismo se aprecia que el tamaño promedio de la muestra aumenta hasta llegar a una concentración del

compuesto **1** de 15 μ M y no se incrementa a concentraciones de ligando superiores. Esto puede indicar que con una relación 1:1 se alcanza el tamaño máximo, mientras que por encima de esa relación estequiométrica, el sistema no evoluciona más.

6.2. Perturbación del estado de agregación inducida por el compuesto **1**

Una vez conocido el efecto polimerizador de los compuestos en base a la disminución provocada del valor de Cr y que el sistema no evoluciona a partir de una relación de concentraciones entre la tubulina y el ligando de 1:1, mediante técnicas de ultracentrifugación analítica se pueden caracterizar con precisión los tamaños de todas las especies oligoméricas formadas en el equilibrio.

Las dos aproximaciones más utilizadas en ultracentrifugación analítica son el equilibrio de sedimentación y la velocidad de sedimentación (Cole *et al.*, 2008). A pesar de que la primera aproximación permite caracterizar procesos de asociación, la gran cantidad de tiempo que requiere, descarta su uso en presencia de tubulina, ya que la vida media de ésta es de unas 6 horas (Prakash y Timasheff, 1992). La velocidad de sedimentación, en cambio, requiere de mucho menos tiempo (aproximadamente 4 horas) y permite la determinación a tiempo real de diversos parámetros hidrodinámicos tales como el radio friccional o el coeficiente de sedimentación (S). Mediante la aplicación de velocidades angulares suficientemente altas (por encima de 10⁵g) se consigue que las macromoléculas sedimenten (Ralston, 1993). Así, la velocidad aplicada provoca la formación de un límite claro entre la muestra y el resto de la celda, que es descrito a diferentes tiempos originando una distribución de coeficientes de sedimentación. La manera en que varían los perfiles de sedimentación con el tiempo viene descrita, como ya ha sido mencionado, por la ecuación de Lamm.

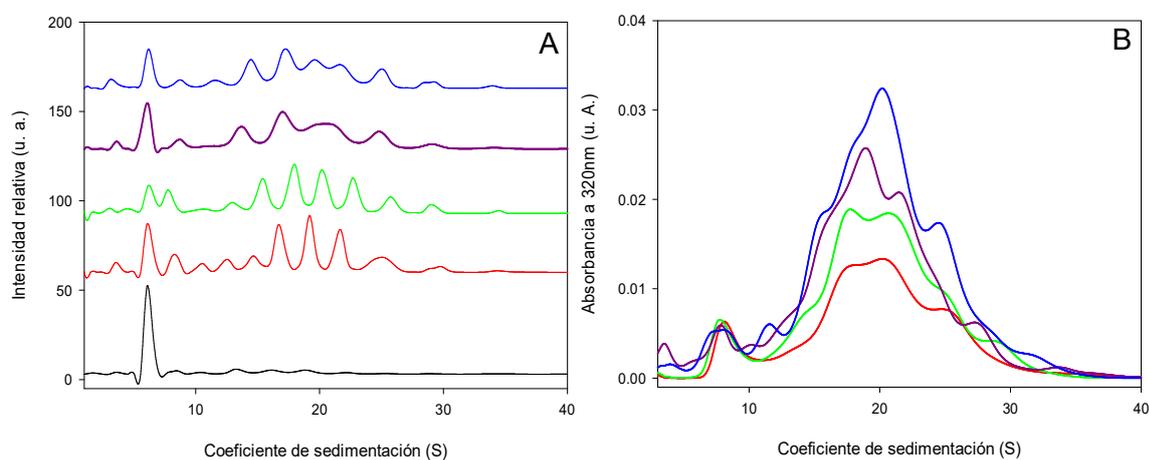


Figura 37: A: Distribución de coeficientes de sedimentación de 30 μ M de tubulina en PEDTA con 0.1mM de GTP y 1.5mM de MgCl₂, a 25°C, en presencia de concentraciones crecientes del compuesto **1**. Se representa la distribución de los diferentes oligómeros formados sin ligando (negro), con 15 μ M (rojo), 25 μ M (verde), 35 μ M (morado) y 45 μ M (azul). B: Espectros de absorbancia a 320nm de las mismas muestras recogidos simultáneamente.

El efecto del ligando **1** sobre la tubulina se estudió en el mismo tampón utilizado en el ensayo de DOSY (PEDTA 0.1mM GTP y 1.5mM MgCl₂), empleando diferentes concentraciones de ligando frente a una concentración fija de tubulina igual a 30 μ M.

De acuerdo a los resultados obtenidos, en presencia de una concentración de ligando igual a $15\mu\text{M}$, el efecto agregante es perfectamente observable (figura 37, A). Se forma una amplia variedad de oligómeros de diferentes tamaños, cuyos coeficientes de sedimentación se encuentran comprendidos entre 8S y 25S, siendo los mayoritarios aquellos con coeficientes comprendidos entre 15S y 25S.

Además, la concentración de dímeros se reduce de manera significativa, pasando de $16.2\mu\text{M}$ en ausencia de ligando, a $2.7\mu\text{M}$. A concentraciones mayores de ligando **1**, se observa la misma concentración de dímeros en todos los casos (constante en torno a $2.7\mu\text{M}$), mientras que los oligómeros más pequeños (aquellos con coeficientes entre 8S y 15S) desaparecen. En estas condiciones, los oligómeros de mayor tamaño siguen siendo los que presentan coeficientes entre 15S y 25S.

A pesar de aumentar la concentración de ligando en las muestras sucesivas, el efecto causado apenas varía, lo que posiblemente indica una estequiometría para el compuesto **1** próxima a 1:1.

En presencia de un exceso de ligando, el tamaño promedio de las especies formadas bajo estas condiciones es de $(500 \pm 200)\text{kDa}$, masa molecular que se corresponde con oligómeros de entre 3 y 7 dímeros.

Si como acción del ligando se indujese la formación de microtúbulos u otros polímeros de gran tamaño, los coeficientes de sedimentación de esas estructuras serían tan grandes que no se vería perfil de velocidad de sedimentación alguno, ya que se irían al fondo de la celda antes de comenzar el análisis.

Dado que la concentración observada de proteína tanto en las muestras con ligando como en la que carece de él es la misma ($26\mu\text{M}$), se deduce que no existe pérdida de proteína, y que por tanto, no se induce la formación de microtúbulos u otros polímeros de mayor tamaño, en las condiciones del ensayo (Matesanz *et al.*, 2011).

Por último, se observa que el compuesto **1**, que absorbe luz a 320nm , se encuentra fundamentalmente unido a los oligómeros formados, independientemente de la concentración en la que se encuentre en la muestra (figura 37, B).

En resumen, se ha comprobado por ultracentrifugación analítica que el compuesto **1** induce la oligomerización de la tubulina y, previamente por HPLC, que el magnesio incrementa la formación de oligómeros con su sitio de unión al completo, lo que provoca que una mayor proporción de ligando se encuentre unido. Así pues, se observa que el proceso de unión de un compuesto en el dominio de vinca y el de ensamblaje de la tubulina están asociados y ocurren de manera vinculada (Na y Timasheff, 1986).

7. Caracterización bioquímica de la unión

Una vez establecida la región interdimérica como el sitio de unión de los ligandos objeto de estudio, se decidió determinar la estequiometría y las constantes de afinidad, parámetros bioquímicos que describen con detalle dicho contacto.

7.1. Determinación de la estequiometría

El estudio de las estequiometrías de unión se realizó por triplicado, para los siete compuestos de la serie, a 37°C , tanto en tampón GAB 1mM GTP y 6mM MgCl_2 , como en tampón PEDTA 1mM GTP y 7mM MgCl_2 .

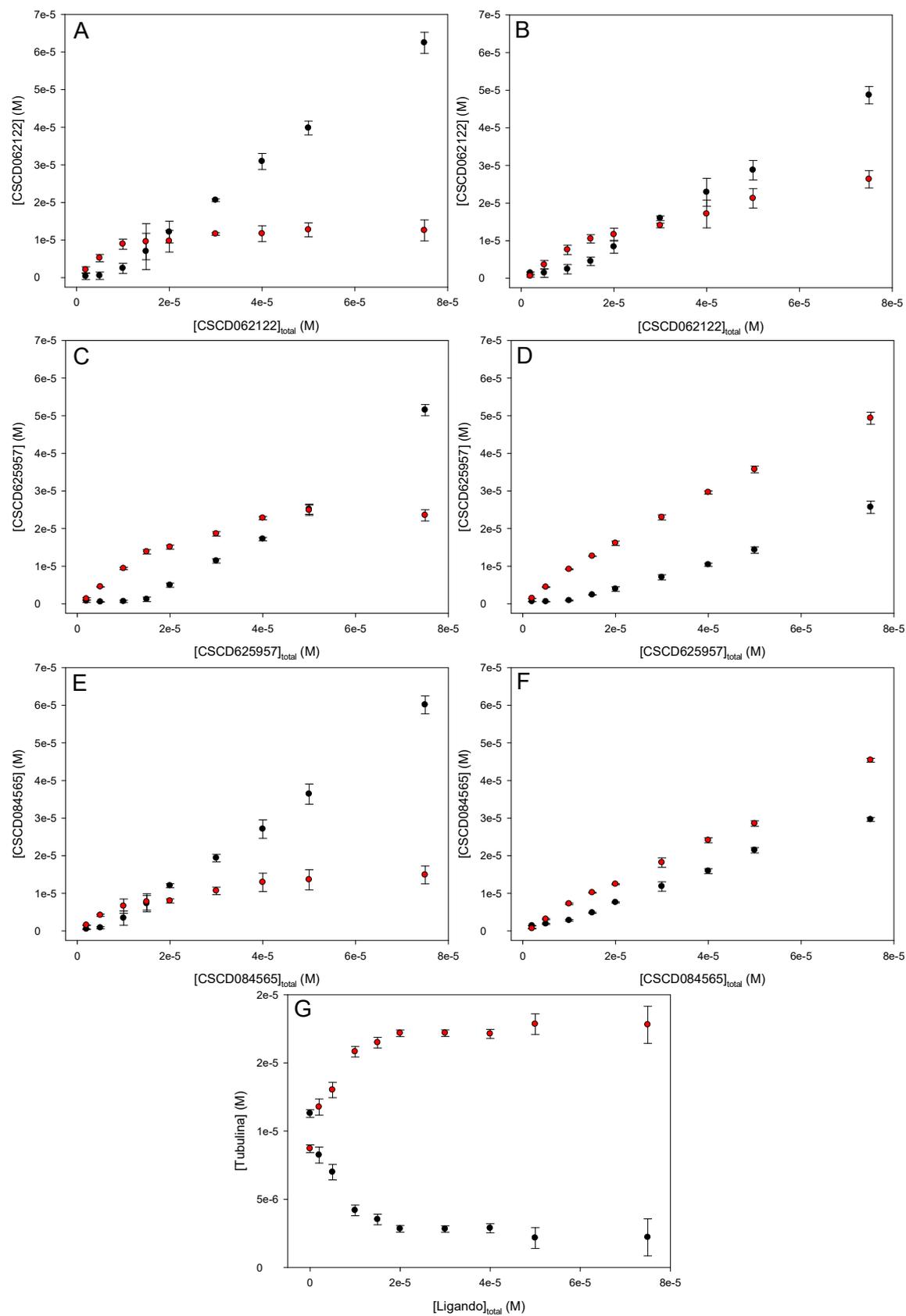


Figura 38: Estequiometrías de unión de los compuestos **1**, **2** y **4** en GAB (A, C y E) y en PEDTA (B, D y F). G: Distribución característica de la tubulina en todas las muestras. En negro se muestra la concentración en el sobrenadante y en rojo la del precipitado.

Se incubaron muestras con 20 μ M de tubulina, en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos (desde 0 hasta 75 μ M). A continuación se centrifugaron y procesaron las muestras tal y como se detalla en el capítulo de Materiales y métodos, detectando en último lugar la concentración de ligando en el sobrenadante y en el precipitado por HPLC y la de tubulina por BCA.

A medida que se aumenta la concentración de ligando total, se detecta una concentración creciente de ligando unido al polímero (señal en el precipitado), hasta el momento en que se supera la estequiometría de unión. De este modo, en todas las muestras cuya concentración de ligando total se encuentra por encima de dicho valor, la concentración de ligando en el precipitado se mantiene constante, observándose entonces una meseta correspondiente a la concentración de ligando que cosedimenta con la proteína. Esto permite determinar la concentración máxima de compuesto que cosedimenta con una concentración fija de proteína.

Por un lado, los precipitados de las muestras incubadas en tampón GAB (figura 38, A, C y E) alcanzan una meseta entre 11 μ M y 23 μ M de ligando total, sobre una concentración total de tubulina igual a 20 μ M. En base a la concentración de polímero en cada muestra, medida por BCA, se concluye que las estequiometrías de unión ligando-proteína oscilan entre 0.56:1 y 1.15:1, siendo los compuestos con estructura química más diferente (**2** y **3**) los únicos que superan la relación equimolar, debido posiblemente a razones de solubilidad (tabla 5).

En la figura 38 se muestran los resultados del compuesto modelo, el **1**, y de **2** y **4**, como ejemplos de compuestos con las estructuras químicas más diferenciadas.

Por otro lado, se observa que en las muestras incubadas en tampón PEDTA (figura 38, B, D y F) no se alcanza en ningún caso una meseta claramente identificable en el precipitado, sino que la señal sigue aumentando progresivamente en relación a la concentración de ligando. Este hecho imposibilita la determinación de la estequiometría en tampón PEDTA.

En cuanto a las medidas de concentración de tubulina, todos los perfiles de BCA resultaron ser idénticos al mostrado (figura 38, G), independientemente del tampón y del compuesto utilizados.

Compuesto	Sitios/heterodímero
1	0.61
2	1.15
3	1.07
4	0.67
5	0.81
6	0.56
7	0.74

Tabla 5: Estequiometrías observadas de todos los compuestos de la serie CSCD, medidas por HPLC en tampón GAB 1mM GTP y 6mM MgCl₂, a 25°C. Los valores representan el número de sitios de unión del ligando por cada heterodímero de tubulina.

7.2. Determinación de las constantes de afinidad

Un aspecto esencial en la caracterización de la unión de un ligando a su diana es la determinación de la constante de afinidad de la reacción. Este valor informa sobre la efectividad y la estabilidad con la que dicha unión tiene lugar y permite conocer, para

cada rango de concentraciones, la fracción de reactivo unido y la de reactivo libre en condiciones de equilibrio químico (Aguilar Peris, 1981). Además la determinación de estas constantes constituye un método cuantitativo útil para comparar jerárquicamente ligandos en función de su actividad.

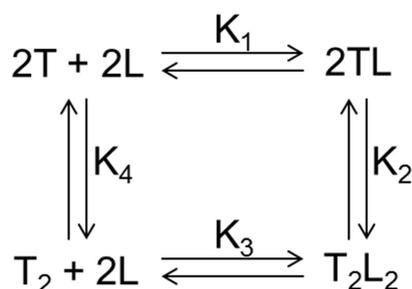


Figura 39: Esquema del sistema isodésmico ligando-tubulina. T representa la proteína, L el ligando, K_1 es la afinidad del ligando por la tubulina, K_2 la afinidad de los heterodímeros unidos entre sí, K_3 la afinidad del ligando por el polímero y K_4 es la constante de autoasociación de los heterodímeros de tubulina libre. En el estado estacionario se cumple que $K_1K_2 = K_3K_4$, siendo K_4 el único valor independiente de la concentración de ligando.

Para calcular constantes de afinidad es necesario poder medir de manera diferencial los estados libres y unidos tanto de ligando como de proteína. En sistemas en los que reaccionan diferentes ligandos con la tubulina se encuentran obstáculos que dificultan el cálculo, como que la tubulina es capaz de autoasociarse isodésmicamente y oligomerizar aunque no haya compuesto presente (figura 39). De esta manera los métodos convencionales de detección de la unión, como por ejemplo la fluorescencia, miden al mismo tiempo los dos procesos que ocurren a la vez: la unión del compuesto y dicha autoasociación. Los valores obtenidos por medio de dichos métodos son, por tanto, aparentes (engloban ambos subprocesos) y dependientes de la relación entre las concentraciones de los dos componentes (Lobert y Correia, 2000).

A pesar de que las constantes de afinidad aparentes permiten comparar jerárquicamente la actividad de los compuestos, con el fin de caracterizar con mayor precisión la unión, se empleó un método que permite diferenciar ambos procesos y cuantificar la contribución de cada uno al proceso global.

7.3.1. Estudios de cinética química por fluorescencia

En primer lugar se determinaron las constantes de unión del ligando **1** por fluorescencia, tanto al heterodímero de tubulina en tampón PEDTA 0.1mM GTP y 1.5mM $MgCl_2$, como al tetrámero estabilizado, T_2R , en tampón DTT 0.1mM GTP y 1.5mM $MgCl_2$, a 25°C. Más tarde, las constantes de unión fueron calculadas a partir de las constantes cinéticas medidas (Díaz *et al.*, 2000).

Tras una excitación a 320nm se realizaron medidas de emisión de fluorescencia a 460nm durante un mínimo de 3200s, de muestras con 2 μ M de proteína incubadas en presencia de 20 μ M (figura 40), 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M ó 60 μ M de **1**, a 25°C. Las curvas obtenidas se ajustan a la ecuación 21 para determinar la constante cinética aparente.

$$F = F_{m\acute{a}x} \left(1 - e^{(-k_{ap}t)} \right) \quad (\text{Ecuación 21})$$

Donde F es la intensidad de fluorescencia, $F_{\text{máx}}$ la intensidad máxima, k_{ap} la constante cinética aparente y t es el tiempo.

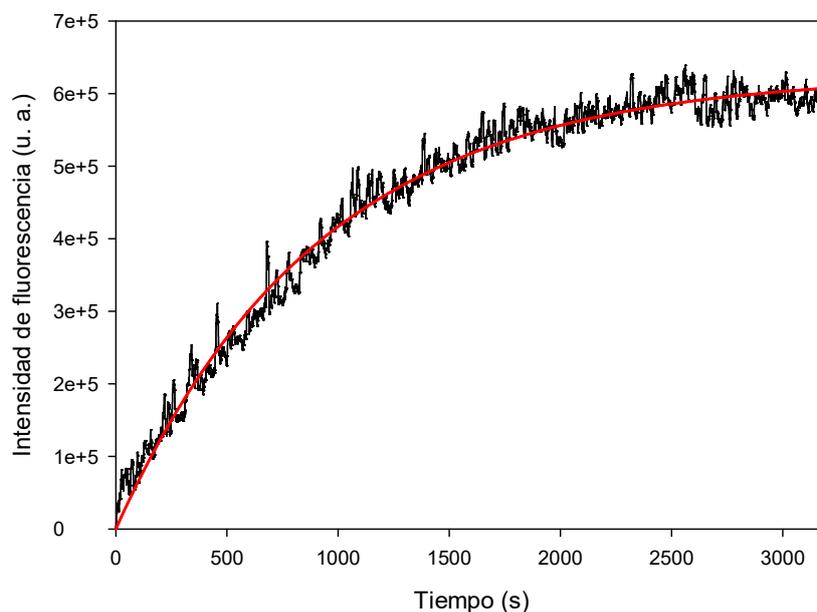


Figura 40: Curso de tiempo de la unión del compuesto **1**, a una concentración igual $20\mu\text{M}$, a la tubulina en solución, a una concentración igual a $2\mu\text{M}$, recogido durante 3200s en tampón PEDTA 0.1mM GTP y 1.5mM MgCl_2 , a 25°C . La línea negra representa el perfil promedio de tres experimentos independientes y la línea roja representa el ajuste matemático, obtenido a partir de la ecuación 21 ($k_{\text{ap}} = 0.0014\text{s}^{-1}$).

Siempre que la concentración de ligando utilizado sea, al menos, diez veces más concentrada que la de proteína, se pueden representar las constantes cinéticas aparentes frente a la concentración libre de ligando (en este caso se considera que la concentración de ligando libre es igual que la concentración total) para obtener las constantes cinéticas reales (figura 41).

Si la reacción de unión entre el ligando y la proteína tiene lugar en un único paso, la representación anteriormente mencionada se ajusta a una recta, en la que el valor de la pendiente es igual a $k_1[\text{ligando}]$ y la intersección con el eje de abscisas es igual a k_{-1} . En cambio, cuando los datos se ajustan a una curva, la reacción puede ser modelizada como un proceso bimolecular que consta de dos pasos, siendo el primero rápido y el segundo lento. En este caso, el ajuste que describe el proceso es el representado en la ecuación 22 (Head *et al.*, 1985; Díaz *et al.*, 2000). En el anexo 1 se detalla el desarrollo matemático que explica la procedencia de dicha ecuación 22.

$$k_{\text{ap}} = \frac{K_{a1} \cdot k_{+2} \cdot [\text{ligando}]}{1 + K_{a1} \cdot [\text{ligando}]} + k_{-2} \quad (\text{Ecuación 22})$$

Donde K_{a1} es la constante de afinidad del primer paso (asumiendo que es rápido), k_{+2} la constante cinética de formación de producto del segundo paso y k_{-2} la del proceso inverso.

Como se observa en la tabla 6, los parámetros calculados para el heterodímero y para el tetrámero son semejantes. Esto es indicativo de que el proceso por el que dos heterodímeros forman un tetrámero sigue una cinética de asociación rápida.

No obstante, se debe tener en cuenta que la constante de afinidad calculada para la unión del compuesto **1** al heterodímero de tubulina mediante este método, describe tanto la autoasociación de la proteína, como la unión del ligando, en conjunto. Así pues, es necesario disponer de un método que pueda discernir entre ambos procesos. En el caso de la determinación sobre el tetrámero estabilizado, el componente de autoasociación es nulo, por lo que el parámetro hallado es real.

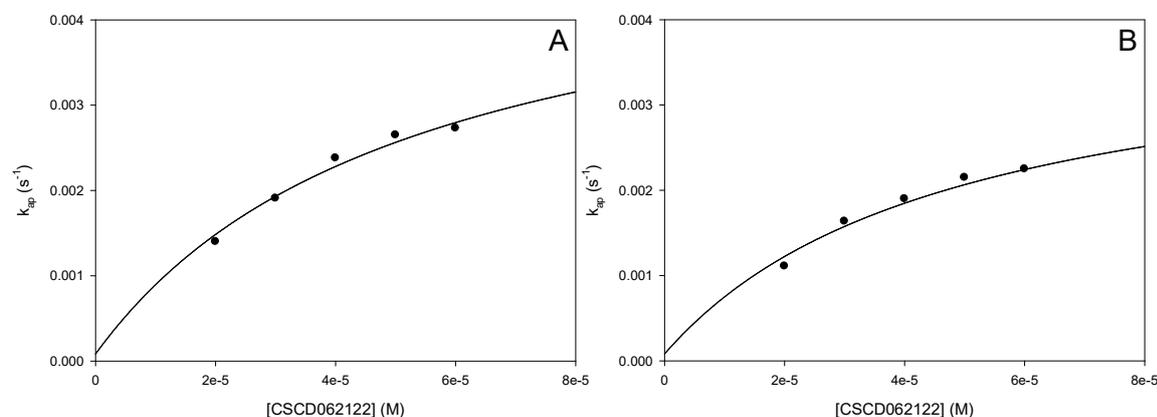


Figura 41: Constantes cinéticas aparentes del compuesto **1** con el heterodímero de tubulina (A) y con T₂R (B) frente a la concentración de ligando, a 25°C. La línea negra representa el ajuste de acuerdo a la ecuación 22.

Debido a que el error registrado en las medidas en los experimentos de fluorescencia es considerable, no se puede considerar el parámetro observado de k_{-2} (el corte con el eje de abscisas), ya que un pequeño error en la determinación afecta en gran medida al cálculo de dicho parámetro.

Así pues, para determinar la constante cinética k_{-2} de un modo más fiable, se analizó la disociación del compuesto **1** promovida por la presencia de un gran exceso de competidor, como por ejemplo, la vinblastina (figura 42). La velocidad a la que la vinblastina se une a la tubulina es igual a la cinética de disociación del compuesto **1** del paso más lento. En este caso, el valor calculado corresponde a k_{-2} (Díaz *et al.*, 2000).

Compuesto 1	Heterodímero de tubulina	T ₂ R
K_{a1}	$(1.9 \pm 0.8) \cdot 10^4$	$(2.3 \pm 0.9) \cdot 10^4$
k_{+2}	$(5 \pm 1) \cdot 10^{-3}$	$(3.8 \pm 0.8) \cdot 10^{-3}$

Tabla 6: Constante de afinidad del primer paso y constante cinética de formación de producto del segundo paso, determinadas para el compuesto **1** unido al heterodímero de tubulina y a T₂R, a 25°C. Los errores se refieren al ajuste del modelo con los datos obtenidos experimentalmente.

La cinética de disociación determinada tal y como se ha detallado, mediante desplazamiento, se comporta de acuerdo a la ecuación 23.

$$F = F_{m\acute{a}x} \cdot e^{(-k_{-2}t)} \quad (\text{Ecuación 23})$$

El valor obtenido para k_{-2} , que es igual a $(3.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$, permite determinar el valor de la constante de equilibrio del segundo paso, la cual equivale al cociente de las dos constantes cinéticas que describen dicha segunda reacción. Asimismo, la

constante del proceso global es igual al producto de las constantes de afinidad de los dos pasos ($K_{a1} \cdot (k_{+2}/k_{-2})$), por lo que el valor obtenido en este caso para K_a es igual a $(3 \pm 2) \cdot 10^5 M^{-1}$.

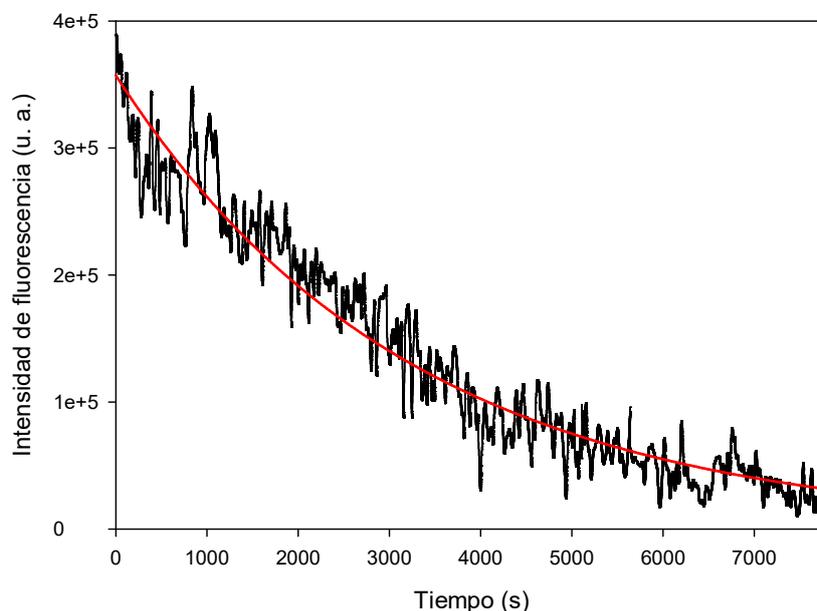


Figura 42: Curso de tiempo de la disociación entre el compuesto **1**, a una concentración igual a $2\mu M$, y el complejo T_2R , a una concentración igual a $2\mu M$, recogido durante 7500s en tampón DTT 0.1mM GTP y 1.5mM $MgCl_2$, a $25^\circ C$. La línea negra representa el perfil promedio de tres experimentos independientes y la línea roja representa el ajuste matemático, obtenido a partir de la ecuación 23 ($k_{-2} = (3.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-4} s^{-1}$).

7.3.2. Estudios de asociación por velocidad de sedimentación

Estudios de unión al heterodímero de tubulina:

Para diferenciar entre la autoasociación de la tubulina y la unión del compuesto, se empleó un método basado en la caracterización del proceso global mediante experimentos de velocidad de sedimentación de ultracentrifugación analítica.

De acuerdo a la bibliografía, la manera en que progresa el frente de sedimentación en los experimentos de velocidad de sedimentación a lo largo del tiempo, permite estimar la concentración de cada especie oligomérica en equilibrio y al mismo tiempo, determinar el coeficiente de sedimentación promedio experimental de la muestra estudiada (Stafford y Sherwood, 2004). A partir de los coeficientes experimentales es posible aproximar la constante de afinidad aparente del ligando estudiado por la tubulina y con dicho valor, calcular luego el coeficiente de sedimentación promedio teórico para cada muestra. Comparando ambos coeficientes de sedimentación promedio (experimental y teórico) se puede afinar la constante calculada (Correia, 2000).

Se realizaron medidas para los siete compuestos estudiados, en tampón PEDTA 0.1mM GTP y 1.5mM $MgCl_2$, a $25^\circ C$. Se incubaron muestras con $5\mu M$ de compuesto, incubadas en presencia de concentraciones crecientes de tubulina (desde 0 hasta $10\mu M$). Como es esperable, en los casos con mayor concentración de proteína se induce la formación de oligómeros más grandes (figura 43). A partir de las distribuciones

de coeficientes de sedimentación, el programa informático *Sedfit* (Schuck y Demeler, 1999) calcula los coeficientes promedio de cada muestra. Este parámetro, junto a la concentración de tubulina, son los requeridos para la determinación de las constantes de equilibrio con el programa informático *SwKey* (desarrollado por Javier Rodríguez-Salarichs del grupo de Agentes Estabilizantes de Microtúbulos del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) de Madrid).

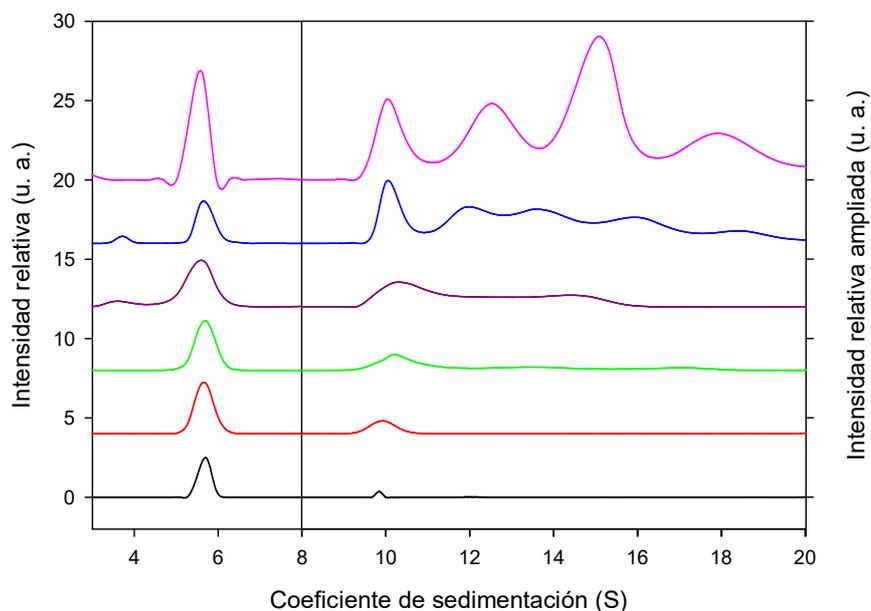


Figura 43: Distribución de coeficientes de sedimentación de muestras con 5 μM del compuesto 1 en tampón PEDTA con 0.1 mM de GTP y 1.5 mM de MgCl₂, a 25°C, en presencia de 0.2 μM (negro), 0.5 μM (rojo), 1 μM (verde), 2 μM (morado), 5 μM (azul) y 10 μM (rosa) de tubulina.

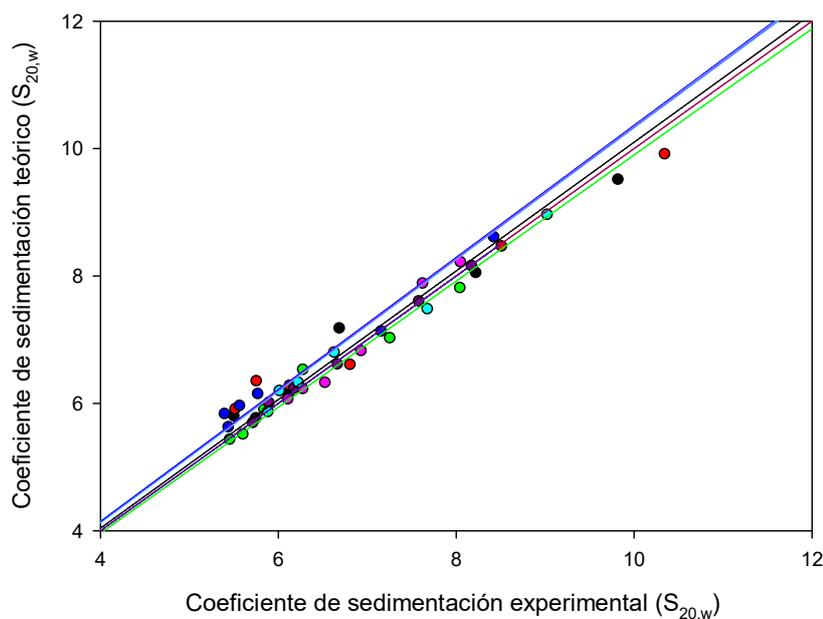


Figura 44: Ajustes lineales entre los coeficientes de sedimentación teóricos y experimentales. Se representan los ajustes obtenidos para los siete compuestos de la serie CSCD: 1 (negro), 2 (rojo), 3 (verde), 4 (morado), 5 (azul), 6 (rosa) y 7 (cian).

En la representación de los coeficientes de sedimentación obtenidos a nivel teórico con el programa informático *SwKeg*, frente a los coeficientes experimentales extraídos de los experimentos de velocidad de sedimentación, la medida en que la distribución de los puntos se ajusta a una línea recta es indicativo de la calidad de la determinación. Los ajustes obtenidos muestran, en todos los casos, coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0.95 (figura 44).

Además, la observación de los ajustes en una representación de los coeficientes de sedimentación experimentales frente a la concentración total de tubulina (figura 45) permite comparar la afinidad de todos los compuestos de la serie CSCD y establecer un orden jerárquico (tabla 7).

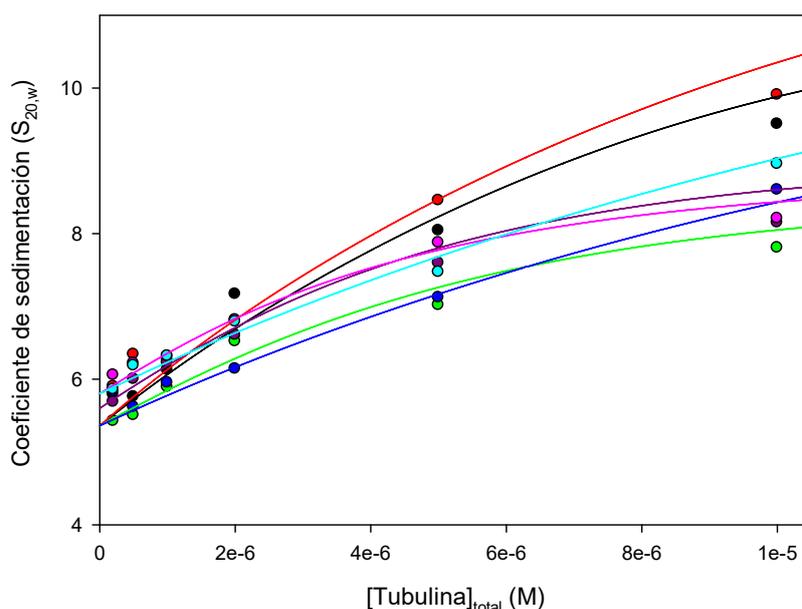


Figura 45: Representación de los coeficientes de sedimentación de los compuestos **1** (negro), **2** (rojo), **3** (verde), **4** (morado), **5** (azul), **6** (rosa) y **7** (cian), frente a la concentración de tubulina total, en tampón PEDTA con 0.1mM de GTP y 1.5mM de $MgCl_2$, a 25°C. Las curvas representan los ajustes obtenidos para cada ligando con el programa informático *SwKeg*, utilizando el modelo helicoidal de 21 bolas.

Compuesto	Constante de afinidad, K_a (M^{-1})
1	175866.3546
2	193354.3901
3	119977.6693
4	139535.7874
5	102654.3797
6	123113.5143
7	98385.3033

Tabla 7: Constantes de afinidad aparentes de los compuestos objeto de estudio en tampón PEDTA con 0.1mM de GTP y 1.5mM de $MgCl_2$, a 25°C, determinadas con el programa informático *SwKeg* con el modelo helicoidal de 21 bolas.

A pesar de encontrar pequeñas diferencias entre los ajustes de los compuestos, los resultados obtenidos revelan que el compuesto con mayor afinidad por la tubulina es

el **2**, seguido del compuesto **1**. De manera opuesta, los ligandos **5** y **7** destacan como los menos afines, siendo el ligando **7** aquel con una constante calculada más pequeña.

No obstante, las constantes de afinidad determinadas hasta este punto son constantes de asociación de tubulina, aparentes ($K_{2,ap}$). Esto es debido a que los experimentos de AUC miden un proceso global de asociación de proteína, sin ser capaces de diferenciar entre las formas libres y unidas a ligando de la tubulina. Así pues, en cada experimento se miden dos procesos que tienen lugar al mismo tiempo (autoasociación de la tubulina y unión del ligando), que tienen que ser identificados.

Las dos constantes que conforman las constantes calculadas por este método, pueden ser determinadas mediante experimentos de AUC, a partir de diferentes concentraciones de ligando. Así pues, se repitió el mismo experimento para el compuesto **1** a diferentes concentraciones iniciales de ligando, siguiendo la reacción, tanto por ultracentrifugación analítica, como por HPLC y fluorescencia como se detalla en la sección 6.2 del capítulo de Materiales y métodos.

En el intervalo de concentraciones estudiado (entre $2.5\mu\text{M}$ y $10\mu\text{M}$ de compuesto), se observa que cuanto mayor es la concentración de ligando inicial utilizada, más grande es la proporción de compuesto unido (figura 46).

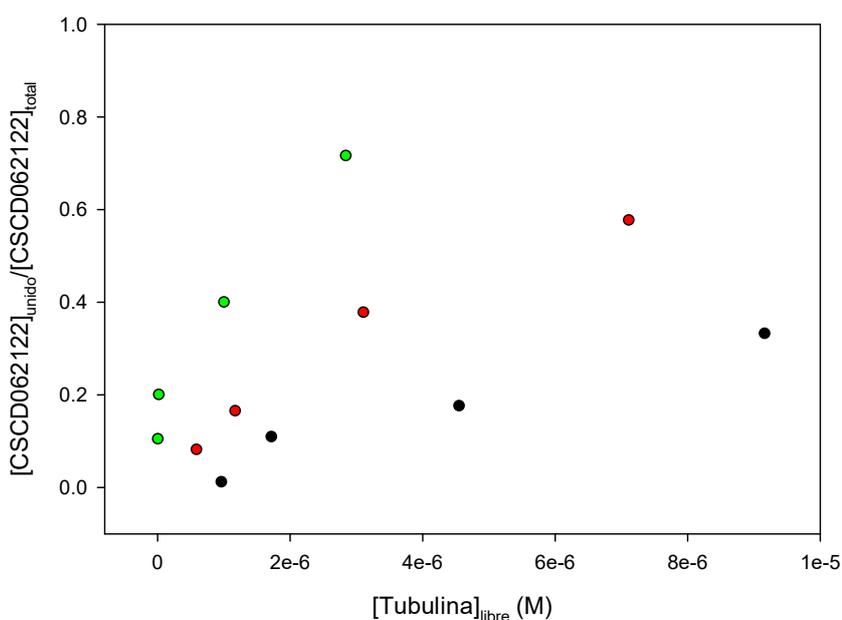


Figura 46: Saturación fraccional del compuesto **1** unido, frente a la concentración de tubulina libre, medida en tampón PEDTA con 0.1mM de GTP y 1.5mM de MgCl_2 , a 25°C . Se representan las medidas tomadas partiendo de $2.5\mu\text{M}$ (negro), $5\mu\text{M}$ (rojo) y $10\mu\text{M}$ (verde) de ligando.

En cuanto a las constantes aparentes halladas, al representarlas frente a la concentración de ligando libre (figura 47), los puntos obtenidos se ajustan a la ecuación 24 (Na y Timasheff, 1980). A partir de este ajuste es posible determinar las constantes reales del sistema; tanto la constante de unión del ligando a la tubulina (K_1) como la de autoasociación de la proteína (K_2). En el anexo 2 se detalla el desarrollo matemático que explica la procedencia de dicha ecuación 24.

$$K_{2,ap} = \frac{K_2}{\left[1 + \left(\frac{1}{K_1 \cdot [\text{ligando}]_{\text{libre}}}\right)\right]^2} \quad (\text{Ecuación 24})$$

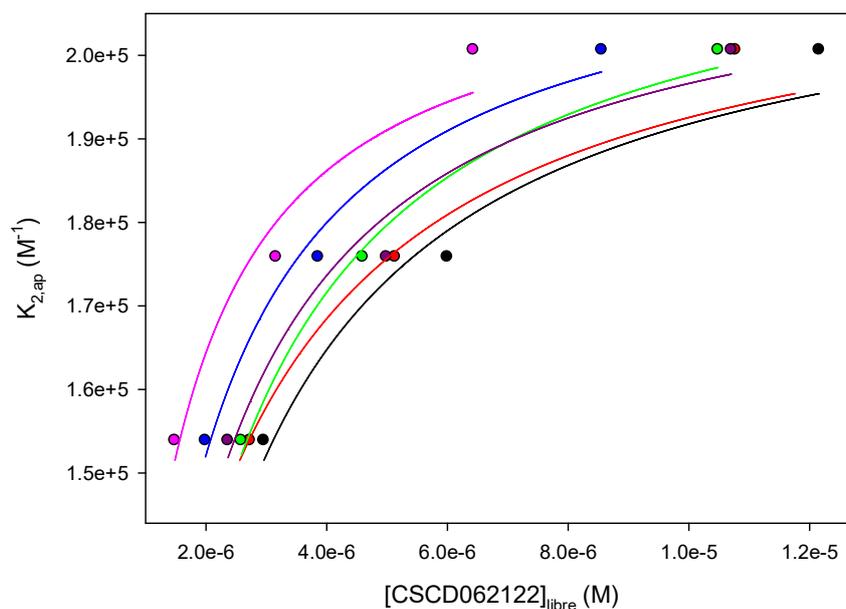


Figura 47: Ajustes de las constantes aparentes de autoasociación de tubulina, obtenidas de tres experimentos independientes con 2.5 μM, 5 μM y 10 μM del compuesto **1**, en función de la concentración de ligando libre. Las curvas representan los ajustes obtenidos para cada concentración de tubulina, de acuerdo al modelo de la ecuación 24: 0.2 μM (negro), 0.5 μM (rojo), 1 μM (verde), 2 μM (morado), 5 μM (azul) y 10 μM (rosa).

Dado que cada experimento de AUC (figura 43) contiene seis concentraciones diferentes de tubulina (más la muestra sin proteína), es posible ajustar la ecuación 24 seis veces, obteniéndose los valores siguientes, a 25°C: $(2.1 \pm 0.2) \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$ para K_1 y $(2.16 \pm 0.04) \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$ para K_2 .

Estudios de unión al tetrámero de tubulina:

En último lugar se determinó, también mediante AUC, la constante real de unión del compuesto **1** al complejo T_2R . Como ya ha sido apuntado, el complejo T_2R no presenta autoasociación ya que no es capaz de ensamblar para formar oligómeros mayores y tampoco puede descomponerse en dos dímeros (Cormier *et al.*, 2010). De esta forma, la determinación directa revela la constante real de unión del compuesto.

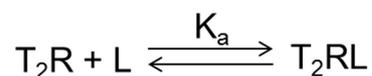


Figura 48: Esquema del sistema reversible de unión ligando- T_2R . T_2R representa el tetrámero libre, L el ligando libre, K_a la constante de asociación del ligando a la proteína y T_2RL representa el complejo T_2R unido al ligando.

Dicha unión tiene lugar mediante el mecanismo reversible descrito en la figura 48, cuya constante de asociación (K_a) viene definida por:

$$K_a = \frac{[T_2R]_{unido}}{[T_2R]_{libre}[L]_{libre}} \quad (\text{Ecuación 25})$$

Los tres parámetros especificados en la ecuación 25, pueden ser obtenidos al seguir la reacción ligando-tetrámero por HPLC tras una centrifugación a altas velocidades y por ultracentrifugación analítica en paralelo.

La concentración del complejo unido es igual que la de ligando unido, que es determinada a partir de las medidas de absorbancia a 320nm (para el compuesto **1**) que corresponden al tetrámero. La concentración de complejo libre se obtiene de la diferencia entre la concentración total y unida, siendo la concentración total calculada a partir de las medidas de interferencia de la AUC (3.2 franjas equivalen a 1mg/mL de proteína según el manual de especificaciones de la centrífuga Optima XL-I de Beckman Coulter). Por último, la concentración de ligando se deduce del experimento de HPLC, realizado tal y como se detalla en la sección 4.1 del presente capítulo.

Para realizar esta determinación, se incubaron muestras con 10 μ M de tubulina y 7.5 μ M de RB3 en presencia de 12 μ M del compuesto **1** en tampón DTT con 0.1mM de GTP y 1.5mM de MgCl₂, a 25°C. El perfil de velocidad de sedimentación (figura 49) confirma que toda la proteína se encuentra en su forma tetramérica. La constante de afinidad calculada de esta manera resultó igual a 179144M⁻¹.

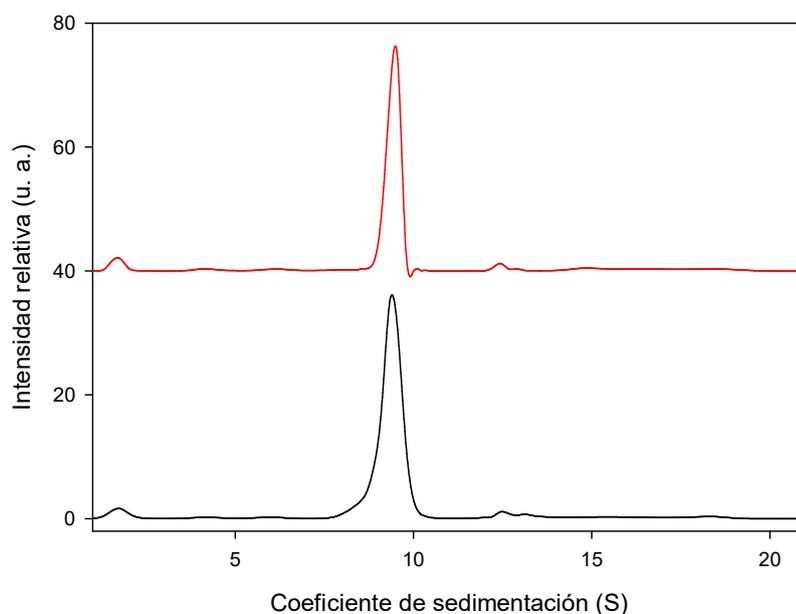


Figura 49: Distribución de coeficientes de sedimentación de unas muestras de 10 μ M de tubulina y 7.5 μ M de RB3, incubadas en ausencia de ligando (negro) o con 12 μ M del compuesto **1** (rojo), en tampón DTT con 0.1mM de GTP y 1.5mM de MgCl₂, a 25°C.

8. Caracterización estructural de la unión

8.1. Ensayos de microscopía electrónica de transmisión

El objetivo principal de este experimento fue comprobar la morfología de los oligómeros inducidos por el compuesto **1**, tanto en condiciones que favorecen la polimerización, como en condiciones que las dificultan. Para el análisis, se incubaron a 25°C, muestras con 10 μ M de tubulina y 25 μ M del compuesto **1** o 25 μ M de docetaxel (control positivo), tanto en tampón GAB 1mM GTP y 6mM MgCl₂, como en tampón

PEDTA 1mM GTP y 7mM MgCl₂. Tras la incubación, se tiñeron con acetato de uranilo y se observaron en el MET.

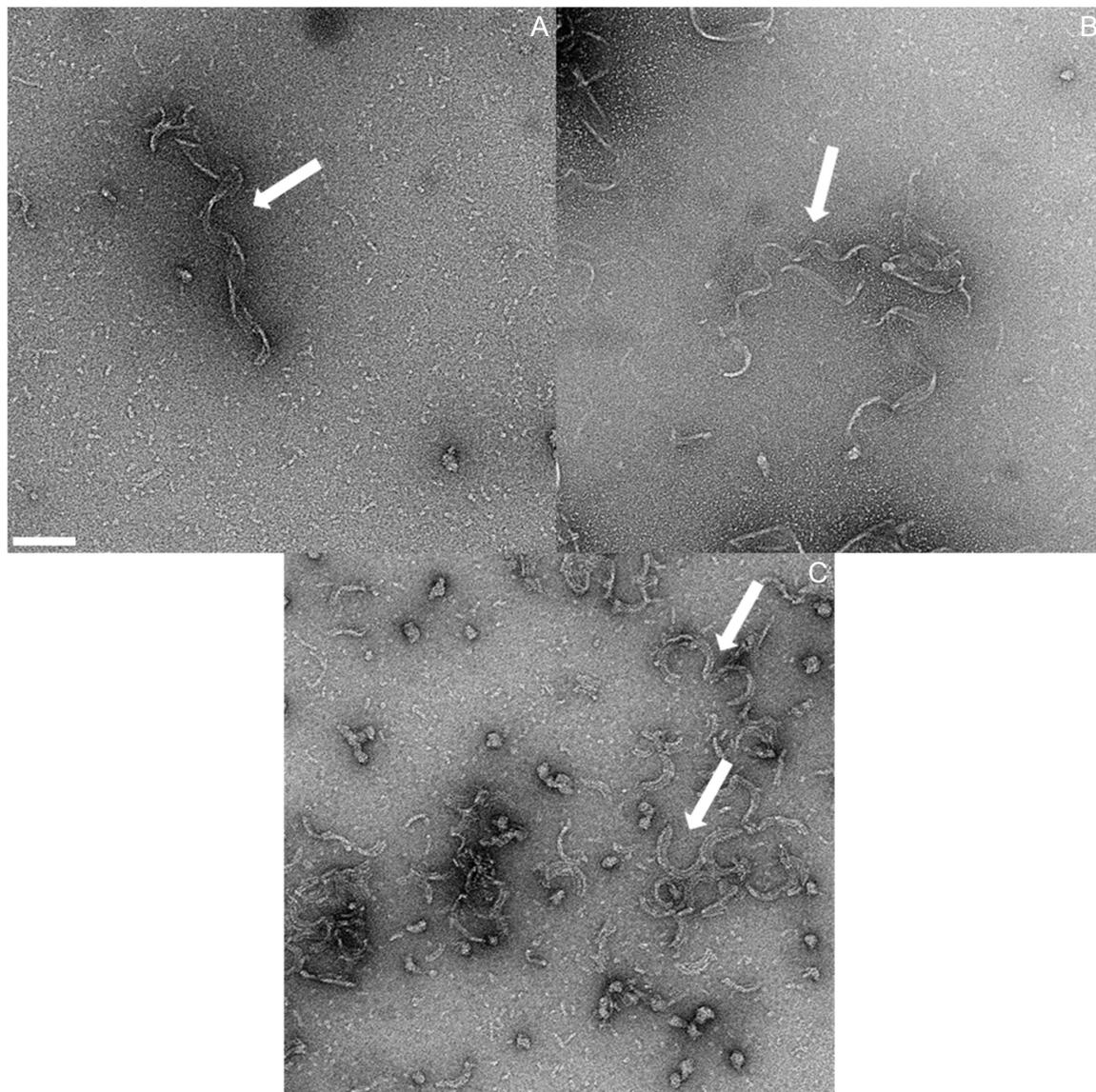


Figura 50: Micrografías electrónicas de muestras con 10 μ M de tubulina y 25 μ M del compuesto **1** en las que se señalan algunas de las estructuras helicoidales formadas, mediante flechas blancas. Los paneles A y B muestran las estructuras formadas con tampón GAB, mientras que el panel C muestra las estructuras formadas con tampón PEDTA. La barra (A) representa 100nm. Todos los paneles mostrados tienen el mismo aumento.

Estos análisis fueron llevados a cabo en colaboración con el grupo del profesor Óscar Llorca del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) de Madrid, siendo el responsable Hugo Muñoz-Hernández.

Como es esperable de acuerdo a la bibliografía, el docetaxel induce la formación de microtúbulos (Matesanz *et al.*, 2011), mientras que en presencia del compuesto **1**, dichas estructuras regulares no son observadas en ninguna de las dos condiciones estudiadas. En ambos casos se forman polímeros helicoidales de, entre 2 y 6 vueltas, además de oligómeros curvados de un tamaño inferior y agregados de aspecto esférico (figura 50). Además, destaca que las especies formadas en tampón GAB son más

grandes que en tampón PEDTA y que los agregados y las especies pequeñas y curvadas son observadas principalmente en medio sin glicerol.

Las estructuras helicoidales observadas en ambas condiciones son características de muestras incubadas en presencia de compuestos del dominio de vinca (Smith y Zhang, 1996; Gigant *et al.*, 2005).

8.2. Ensayos de dispersión de rayos X a ángulos bajos (SAXS)

Los ensayos de SAXS permiten confirmar tanto el aspecto como el tamaño promedio de las especies oligoméricas que fueron observadas mediante microscopía electrónica de transmisión.

En el experimento realizado, se determinaron los espectros de los compuestos más activos de la serie a estudio (**1** y **2**) y el de la vinblastina, como control, puesto que por microscopía electrónica se observaron conformaciones macromoleculares características de ligandos del dominio de vinca. Se estudió el efecto a 37°C de estos compuestos añadidos en un exceso de concentración del 20%, en tampón GAB 1mM GTP y 6mM MgCl₂ y en tampón PEDTA 1mM GTP y 7mM MgCl₂.

Los máximos de los espectros de SAXS obtenidos muestran valores de vector de dispersión coincidentes con los observados en presencia de vinblastina, lo que indica que en todos los casos se están formando estructuras helicoidales (figura 51) (Hodgkinson *et al.*, 1992).

No obstante, la resolución de los máximos es mejor con vinblastina que con los compuestos **1** y **2**, lo que revela que la homogeneidad con dicha vinblastina es mayor. Esto podría deberse a que la señal procedente de oligómeros lineales formados en presencia de los compuestos objeto de estudio pueden interferir con la señal correspondiente a las hélices, amortiguándolas. Además, los oligómeros helicoidales con un menor número de vueltas generan máximos menos pronunciados, lo que también podría explicar las diferencias observadas entre las señales de los compuestos de la serie CSCD y las de la vinblastina. La función de Bessel permite aproximar el diámetro (D) y la longitud del paso de vuelta de una hélice (P) a partir de los valores del número de onda de los máximos $J_{0,1}$ y $J_{1,1}$ (Stewart, 1988).

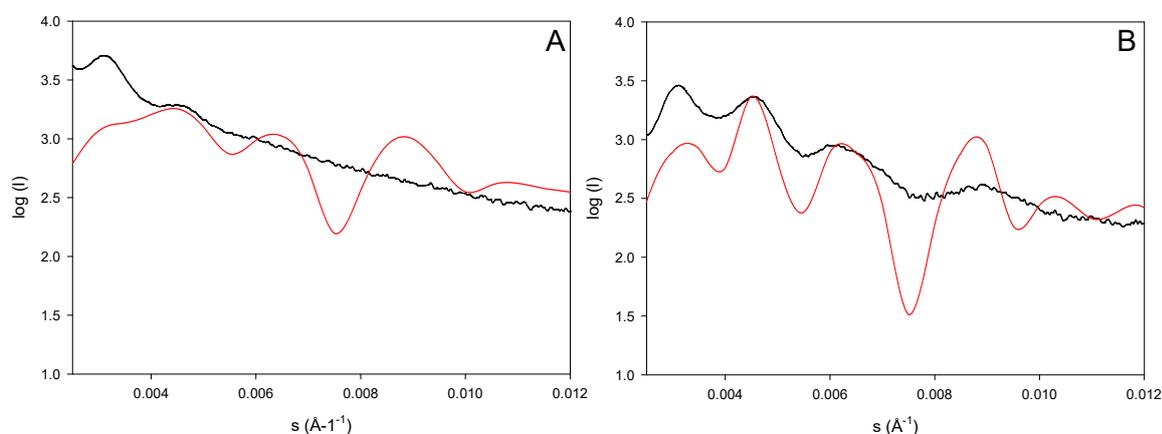


Figura 51: Perfiles de dispersión de rayos X a ángulos bajos (SAXS) del compuesto **1** (A) y de la vinblastina en tampón GAB 1mM GTP y 6mM MgCl₂, a 37°C. Se muestra la comparación entre el perfil experimental (negro) y el teórico (rojo) obtenido con el programa informático DALAI (Chacón *et al.*, 1998).

Tanto el diámetro como el paso de vuelta se calcularon de la siguiente manera:

$$D = \frac{1.22}{J_{0,1}} \quad (\text{Ecuación 26})$$

$$P = \frac{1.08}{J_{1,1}} \quad (\text{Ecuación 27})$$

Siendo $J_{0,1}$ el número de onda del primer máximo y $J_{1,1}$ el número de onda del segundo. Ambos valores se expresan en términos de frecuencia lineal (s).

Se debe tener presente que los parámetros obtenidos mediante este ensayo son valores promedio de todas las hélices diferentes presentes en cada muestra.

Compuesto	Diámetro (Å)	Paso de vuelta (Å)	Tampón
1	360	235	GAB 6mM MgCl ₂
	310	205	PEDTA 7mM MgCl ₂
2	400	250	GAB 6mM MgCl ₂
	320	220	PEDTA 7mM MgCl ₂
Vinblastina	360	240	GAB 6mM MgCl ₂
	310	210	PEDTA 7mM MgCl ₂

Tabla 8: Diámetro y longitud del paso de vuelta de las hélices formadas en presencia de los compuestos **1**, **2** y vinblastina en tampón GAB 1mM GTP y 6mM MgCl₂ y en tampón PEDTA 1mM GTP y 7mM MgCl₂, a 37°C. Valores promedio y optimizados.

A partir de estudios cristalográficos se conocen las dimensiones de los monómeros de tubulina (Nogales *et al.*, 1999). Por tanto, una vez hallados el diámetro y el paso de vuelta para los tres compuestos, en las dos condiciones ensayadas, se construyeron ficheros PDB describiendo la posición en el espacio de cada monómero contenido en cada tipo de hélice formada. A partir de estos ficheros se determinaron los perfiles de SAXS teóricos con dos programas informáticos diferentes, CRY SOL (Svergun *et al.*, 1995) y DALAI (Chacón *et al.*, 1998), siendo el resultado obtenido idéntico en ambos casos.

En último lugar se optimizó tanto el diámetro como el paso de vuelta y el número de vueltas hasta que la diferencia entre las posiciones de los máximos de los perfiles teóricos y experimentales, en cuanto a su número de onda, fueron no significativas (perfiles teóricos mostrados en la figura 51). Las diferencias manifiestas entre el perfil teórico y el perfil experimental son explicadas, como ya se ha detallado anteriormente, por la heterogeneidad de las muestras reales. A pesar de ello, los máximos se alinean entre sí, lo que indica que los parámetros optimizados se adecúan a las características de las hélices reales.

En la tabla 8 se presentan todos los valores optimizados finales. En ella se aprecia que las hélices formadas por el compuesto **2** son ligeramente más grandes que en los otros dos casos. No obstante, el hecho de observar estructuras helicoidales, inducidas en presencia del compuesto **2**, de igual forma que en presencia del compuesto **1**, permite concluir que ambos ligandos comparten sitio de unión.

Asimismo se observa que el tampón PEDTA induce la formación de estructuras helicoidales más pequeñas que el tampón GAB. Comparando, en último lugar, el efecto causado por el ligando **1** respecto al causado por la vinblastina, no se advierten diferencias significativas.

8.3. Estudio de las diferencias en la transferencia de saturación (STD-RMN)

En cualquier molécula analizada por resonancia magnética nuclear, el efecto no llega por igual a todos los núcleos del mismo isótopo. Existen efectos locales, denominados “de apantallamiento”, debidos a la nube de electrones circundante, que provocan que cada núcleo se relaje de manera diferente al resto. El procesamiento de esta información es lo que permite extraer información sobre la estructura molecular.

En una proteína, además de la vecindad de cada núcleo dentro de la misma molécula, la unión de un ligando a su diana es otro factor que altera la manera en que se produce la relajación en la región de contacto. En los experimentos de STD tiene lugar una transferencia de magnetización de una proteína a un ligando, que se registra y permite determinar los epítomos de unión del compuesto.

Los ligandos unidos son los que muestran una señal de STD y, como ocurre en otros experimentos de RMN, la intensidad de la señal va a depender de la afinidad y de la proximidad entre la proteína y los protones del ligando (Canales *et al.*, 2011).

Para la obtención del espectro STD final se requiere la adquisición previa de dos espectros de resonancia y una posterior substracción de uno frente al otro. En el primero, el espectro ON-resonante (STD_{on}), se excitan selectivamente los protones de la proteína con un pulso de RMN tal, que no afecte al ligando. Las moléculas de compuesto en contacto con su receptor van a recibir parte de la relajación de la proteína (figura 52), con lo que se relajarán mucho más deprisa que aquellas moléculas que no se encuentren unidas a su diana.

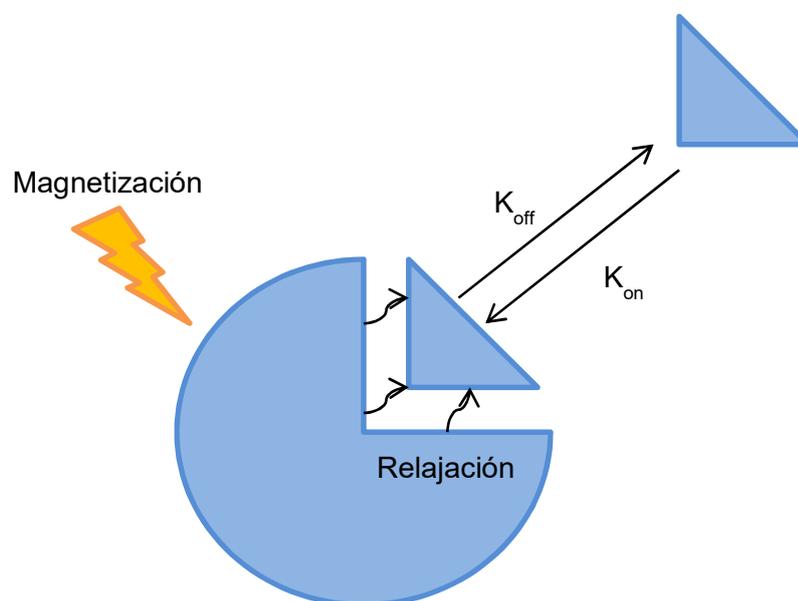


Figura 52: Esquema del método de transferencia de saturación en resonancia magnética nuclear. Se excitan los protones de la proteína y se transfiere la relajación al compuesto unido mediante el proceso de difusión de espín.

El espectro OFF-resonante (STD_{off}), que actúa como control, se obtiene mediante el desplazamiento de la excitación selectiva hacia una región del espectro alejada de la que excita a la proteína. Se emplea un pulso de gran intensidad en dicha región, de modo que todos los protones de la mezcla reciben aproximadamente la

misma magnetización. El espectro resultante es semejante al generado teóricamente por el ligando en solución, libre.

Por último, el espectro de diferencia (STD) se calcula substrayendo el OFF del ON-resonante (ecuación 28). Dicho espectro final recoge exclusivamente la señal del ligando que está en contacto estrecho con la proteína (Wagstaff *et al.*, 2013).

$$\text{STD} = \text{STD}_{\text{on}} - \text{STD}_{\text{off}} \quad (\text{Ecuación 28})$$

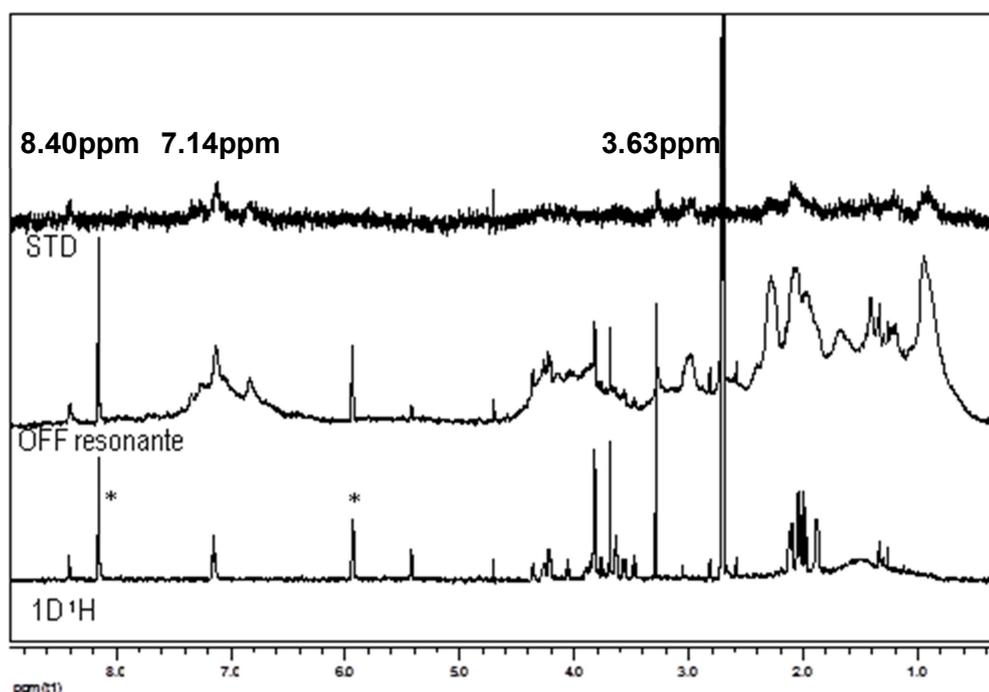
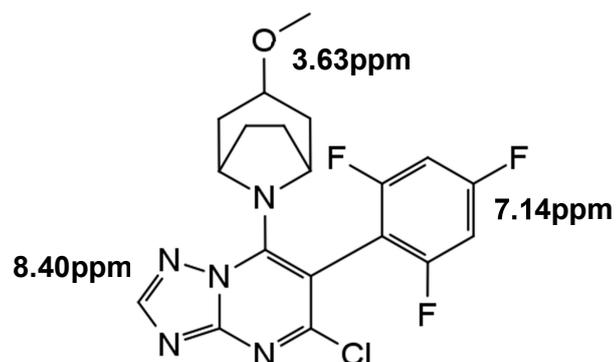


Figura 53: Arriba, la estructura del compuesto **1**, donde se muestran los desplazamientos químicos característicos de los grupos involucrados en el contacto. Abajo, espectros STD calculado (con las señales significativas señaladas) OFF-resonante y protónico 1D de **1**. Los asteriscos corresponden al nucleótido GTP presente en el tampón.

Los ensayos de STD se llevaron a cabo en colaboración con el grupo de resonancia magnética nuclear del profesor Jesús Jiménez-Barbero del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) de Madrid. La doctora Ángeles Canales fue la responsable de la realización del experimento.

Todos los espectros se obtuvieron con tiempos de saturación de 2s, a partir de una muestra con 10 μ M de tubulina y 150 μ M del compuesto **1**. Debido a que la proteína

se relaja rápidamente, en 10^{-3} s, (Canales *et al.*, 2011) toda la señal detectada por el equipo se corresponde al ligando. Así pues, la señal final de STD representa la diferencia entre la señal del ligando en equilibrio químico (unido y libre), procedente del espectro ON-resonante y la del ligando libre, del OFF-resonante. Se deduce así, que el STD informa sobre el compuesto unido, siendo las señales de los epítomos las más intensas al tratarse de las más próximas a la tubulina.

Dado que el ligando no es soluble en tampón NaPi (0.1mM GTP y 1.5mM de $MgCl_2$) a las concentraciones requeridas para que el equipo detecte la señal (300 μ M), el espectro STD del ligando **1** (figura 53) tuvo que obtenerse a la mitad de concentración con un espectrómetro de 600MHz, equipado con una criosonda. De este modo, se mejora la sensibilidad del sistema hasta cuatro veces ya que permite trabajar a menores temperaturas (10K), reduciéndose así el ruido térmico generado por el detector.

Los resultados del estudio de STD revelaron que los residuos más próximos a la tubulina, involucrados en el contacto del ligando son el grupo triazol (que aparece con un desplazamiento químico de 8.4ppm), el trifluorobenceno (7.14ppm) y el grupo metóxido unido al azabicyclo (3.63ppm).

8.4. Estudios de cristalografía

El abordaje cristalográfico se llevó a cabo, con el compuesto **1** en el sistema T₂RT, en colaboración con el grupo del profesor Michel O. Steinmetz del Paul Scherrer Institut de Villigen (Brugg, Suiza), siendo el responsable el doctor Ashwani Sharma. También se trató de obtener una estructura cristalográfica con el compuesto **2** en T₂R aunque, en este caso, no fue posible lograrlo.

El cristal obtenido, con una resolución de 2.40Å, permitió confirmar, tras su análisis por difracción de rayos X, el sitio de unión del ligando (figura 54). Como era esperable, el contacto tiene lugar en el dominio de vinca y en él están implicados aminoácidos de ambos dímeros, sin formar puentes de hidrógeno.

Se observa que el anillo triazol-pirimidina se coordina con la base nitrogenada del nucleótido intercambiable y con la tirosina 224 de la subunidad β formando un apilamiento triple de enlaces π aromáticos que estabiliza la unión. Esta estabilización ocurre porque se produce un solapamiento de los orbitales p de los anillos aromáticos que reduce su región apolar expuesta al solvente. Adicionalmente, se advierte que el mismo anillo triazol-pirimidina del ligando contacta también con la prolina 325 de la hélice H10 de la subunidad α (Nogales *et al.*, 1999).

En la figura 54 también se aprecia un segundo apilamiento de enlaces π , que involucra al anillo trifluorobenceno y a la tirosina 210 de la subunidad β . Por último, destaca que el grupo metóxido del azabicyclo, el cual se posiciona hacia la parte interna y más hidrofóbica del dominio y que conforma la región más variable de la estructura química de los compuestos estudiados, contacta con la serina 178 de la subunidad β .

Al comparar la estructura cristalográfica del tetrámero T₂R sin ligando, con la obtenida en presencia del compuesto **1** (figura 55), se observa que aquella que sí contiene el ligando se encuentra enderezada respecto a la otra, aunque no llega a ser completamente recta. Como consecuencia de la unión del ligando, la posición relativa entre los dos heterodímeros del tetrámero se modifica, pero en cambio, su conformación interna no lo hace. De este modo, se concluye que el compuesto actúa a modo de bisagra, articulando la curvatura del tetrámero.

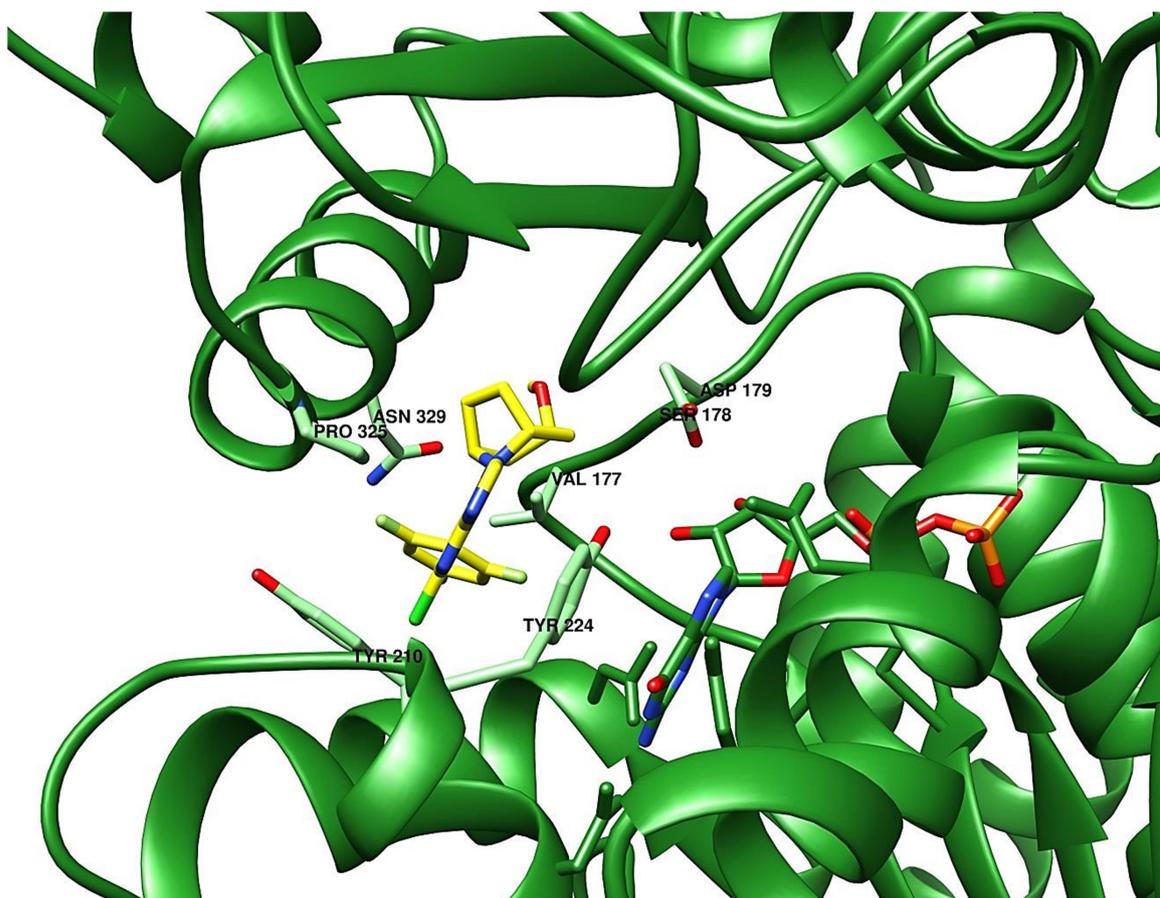


Figura 54: Diagrama de cintas de la estructura cristalográfica del dominio de vinca, resuelta a partir del complejo T_2RT -compuesto **1**. Se representan las cadenas carbonadas del compuesto (amarillo), las del nucleótido (verde intenso) y las cadenas laterales de los aminoácidos implicados en el contacto con dicho compuesto (verde claro).

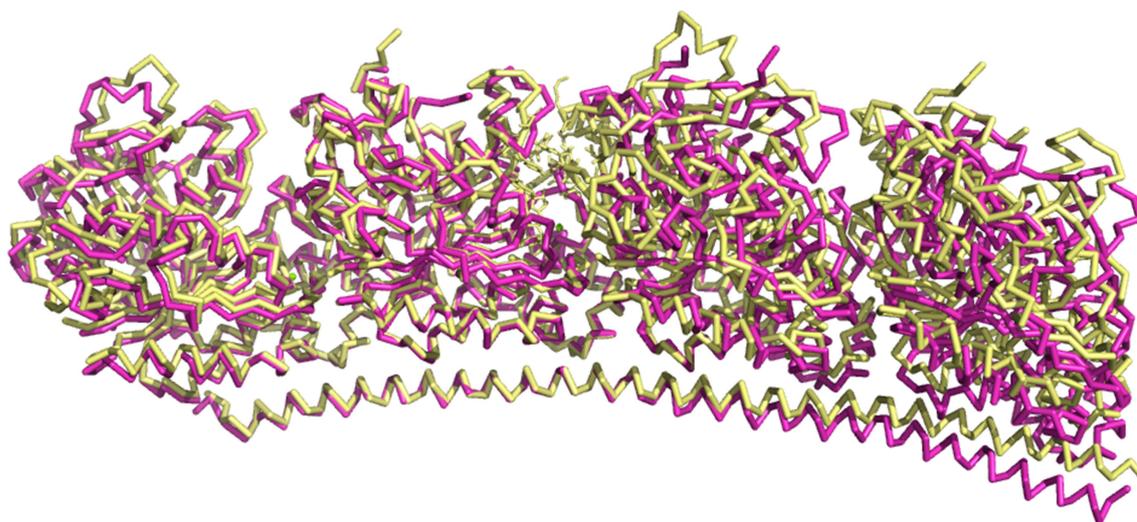


Figura 55: Superposición de la estructura cristalográfica del complejo T_2R libre (estructura extraída del Protein Data Bank; código 3RYF; resolución de 2.52Å) (Nawrotek *et al.*, 2011), con la del complejo T_2RT unido al compuesto **1** (resolución de 2.40Å). El complejo sin ligando está representado en rosa y el complejo con ligando está representado en amarillo. Los heterodímeros de la izquierda se alinean perfectamente entre sí, mientras que los heterodímeros de la derecha se encuentran desplazados.

La orientación relativa adoptada por la estructura cristalográfica del tetrámero sin ligando se corresponde con la orientación de la especie dimérica de la tubulina (Gigant *et al.*, 2000). Así pues, la curvatura adoptada por un heterodímero como consecuencia de la unión del compuesto **1**, se encuentra comprendida entre la curvatura de la estructura recta y la de la estructura curvada, observadas con la tubulina dimérica sin ligando.

8.5. Estudios de bioinformática

Los estudios de modelado molecular permiten obtener información sobre la forma en que los demás compuestos interaccionan con la tubulina, a partir de la estructura cristalográfica resuelta en la sección anterior. Este análisis fue realizado, para los siete compuestos de la serie CSCD, en colaboración con el Servicio de Bioinformática del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) de Madrid, siendo la responsable la doctora Ruth Matesanz.

En primer lugar se comprobó la validez de los modelados moleculares determinados con el programa informático *AutoDock 4.0* (Morris *et al.*, 1998), mediante la comparación entre la estructura resuelta del cristal y el modelado para el compuesto **1** sobre la misma estructura proteica. Ambas determinaciones resultaron prácticamente idénticas, ya que únicamente se observó una pequeña diferencia en cuanto a la rotación del azabicyclo (datos no mostrados). Por ello, el método utilizado para llevar a cabo los modelados moleculares fue considerado apto.

A continuación se analizaron los otros seis compuestos sobre la estructura proteica extraída del cristal (figura 56) y se obtuvieron en todos los casos, dos conjuntos principales de poses en torno al dominio de vinca.

El conjunto de poses mayoritario presenta la misma configuración que en el cristal, mientras que el conjunto minoritario se encuentra en una región más externa del dominio, en contacto con la cadena β . Para los compuestos **4**, **5**, **6** y **7**, la pose más probable representa más del 95% del total, mientras que para **2** y **3** representa el 70% y 60%, respectivamente. Así pues, tomando la pose más probable en cada caso, se comprobó si los factores que contribuyen a la estabilización de la unión del compuesto parental en el cristal, están también presentes en los demás casos (figura 56).

El modelado bioinformático de aquellos compuestos cuya estructura química es más semejante al compuesto parental (figura 56, A) es fundamentalmente la misma, observándose sólo pequeñas diferencias en la rotación del azabicyclo.

Las diferencias entre las estructuras químicas de los compuestos **1**, **4**, **5**, **6** y **7** radican en los grupos unidos al azabicyclo, por lo que resulta esperable que los contactos más relevantes estén presentes en los modelados de estos compuestos, a excepción de aquellos establecidos con dicho azabicyclo. Para la obtención de los contactos se empleó el programa informático *Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004).

Al comparar el modelado obtenido para el compuesto **1** y los obtenidos para los compuestos **2** y **3**, (figura 56, B) destaca la diferencia en cuanto a la posición del radical trifluorobenceno. En presencia del compuesto **1** dicho anillo contacta con la tirosina 210 generando uno de los apilamientos previamente descritos, mientras que en presencia de los otros dos compuestos, el trifluorobenceno rota y contacta con el ácido aspártico 179 en otra región de la subunidad β . Además, como consecuencia de dicha rotación, el anillo trifluorobenceno de los compuestos **2** y **3** no llega a contactar con la valina 328 de la hélice H10 de la subunidad α .

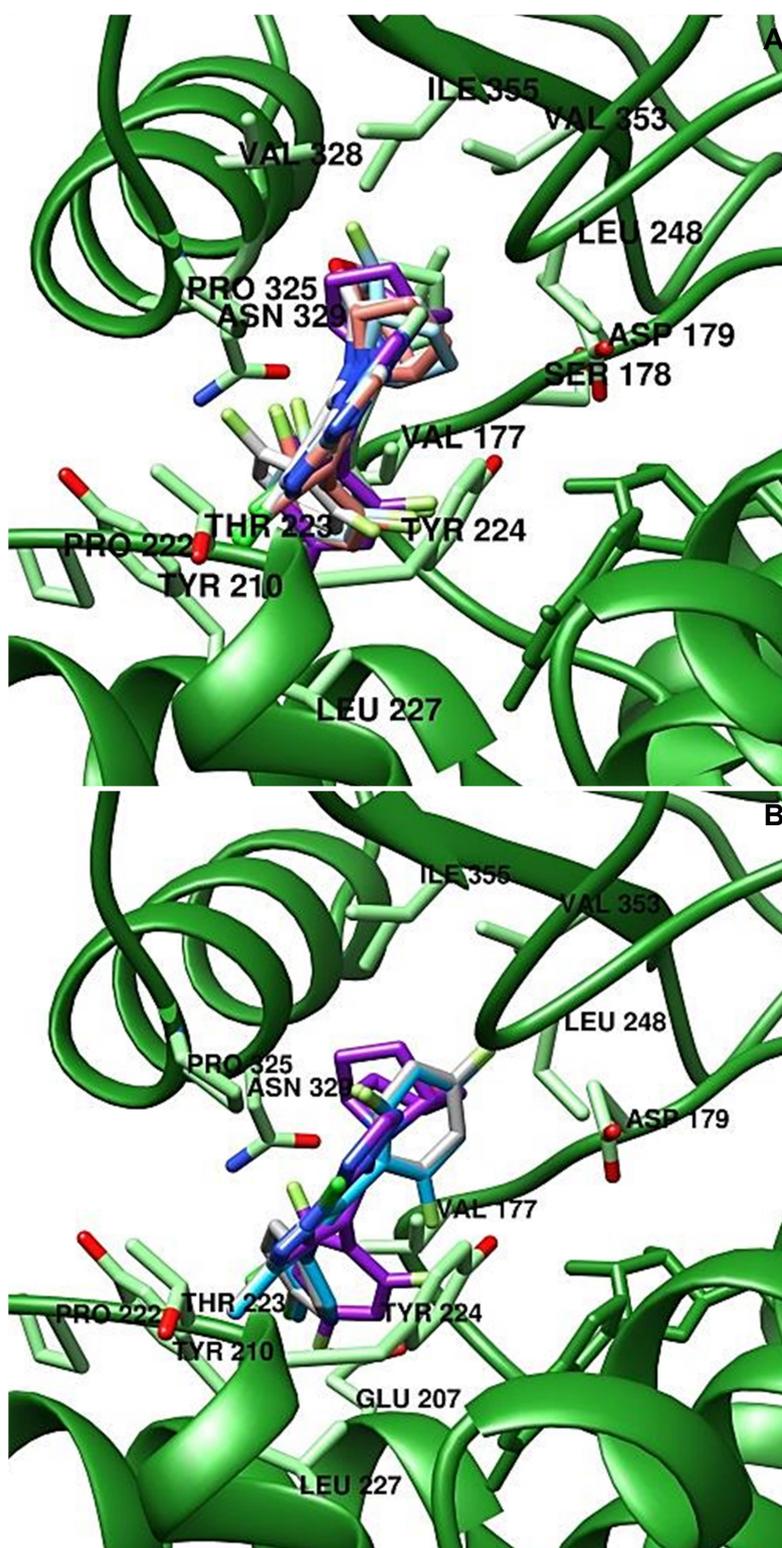


Figura 56: Modelados moleculares de los compuestos de la serie CSCD, realizados sobre la estructura cristalizada de T₂RT. A: Comparativa entre los modelados del ligando 1 (morado) y de 4, 5, 6 y 7; se muestran los contactos del ligando 1. B: Comparativa entre los modelados del ligando 1 (morado) y de 2 y 3; se muestran los contactos de los ligandos 2 y 3.

En la tabla 9 se detallan todos los contactos, calculados mediante modelado molecular por ordenador, para los siete compuestos de la serie CSCD. Los contactos más importantes están presentes en todos los casos: las dos tirosinas en la subunidad β

que forman apilamientos π de anillos aromáticos y la prolina de la hélice H10 de la subunidad α .

Adicionalmente, se observa que el contacto con la leucina 248 del lazo H7-H8 de la subunidad α , lazo a través del cual ambas subunidades contactan entre sí (Nogales *et al.*, 1998; Prota *et al.*, 2014), también está presente en el modelado de todos los compuestos de la serie.

Residuo (cadena)	1 (cristal)	2 y 3	4	5	6	7
VAL 177 (β)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
SER 178 (β)	✓	✗	✗	✓	✓	✗
ASP 179 (β)	✓	✓	✗	✓	✗	✗
ASN 206 (β)	✗	✗	✓	✓	✗	✓
GLU 207 (β)	✗	✓	✓	✓	✗	✓
TYR 210 (β)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PRO 222 (β)	✓	✓	✓	✗	✓	✓
THR 223 (β)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
TYR 224 (β)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
LEU 227 (β)	✓	✓	✓	✗	✓	✓
LEU 248 (α)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
PRO 325 (α)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
VAL 328 (α)	✓	✗	✓	✓	✓	✓
ASN 329 (α)	✓	✓	✓	✓	✓	✓
LYS 336 (α)	✗	✗	✗	✓	✗	✗
VAL 353 (α)	✓	✓	✗	✓	✗	✓
ILE 355 (α)	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Tabla 9: Aminoácidos del dominio de vinca involucrados en el contacto con los siete compuestos objeto de estudio. Los contactos con el compuesto **1** se han extraído de la estructura cristalográfica obtenida en presencia de dicho compuesto (figura 54). Los contactos del resto de compuestos fueron determinados mediante ensayos de modelado molecular con el programa informático *Chimera* (Pettersen *et al.*, 2004). Los compuestos **2** y **3** están representados en una misma columna, ya que los contactos determinados para ellos son coincidentes.

5

Discusión

1. La diana de los compuestos objeto de estudio es el citoesqueleto

En base a los resultados presentados, se observa que los compuestos de la serie CSCD presentan un marcado potencial citotóxico; todos ellos son agentes capaces de detener el proceso de división celular en la fase G₂/M, promoviendo la consiguiente entrada en apoptosis. De este modo, estos compuestos pueden ser definidos como agentes antimitóticos.

Asimismo, los ensayos de inmunofluorescencia realizados sobre la línea celular A549 revelaron que dicha actividad antimitótica viene determinada mediante la interacción de los ligandos con la red de microtúbulos. Estudios bioquímicos posteriores, tanto de fluorescencia como de ultracentrifugación analítica, demuestran que su diana biológica es, en concreto, la tubulina.

La morfología nuclear también se ve alterada dado que la organización de la membrana nuclear también está controlada por la tubulina, siendo el isotipo β II el que se relaciona con esta función específica (Yeh y Ludueña, 2004).

Los valores de concentración a los cuales se observa parada del ciclo celular, inducida por efecto de los ligandos objeto de estudio, se encuentran en el rango entre 0.25 μ M y 1 μ M, mientras que se requieren concentraciones sensiblemente superiores para observar efectos considerables sobre la morfología celular (hasta 5 μ M). De acuerdo a la bibliografía, a esas concentraciones, entre el 2% y el 20% de la tubulina total está unida al ligando, cuando se encuentra en presencia de la menor concentración de ligando a la que se observa efecto celular (Matesanz *et al.*, 2008).

Por lo tanto, se considera que en los ensayos celulares existe una concentración mucho mayor de tubulina que de ligando, con lo que la mayor parte de la tubulina se encuentra libre. Ante esta relación de concentraciones, los compuestos **1**, **4**, **5**, **6** y **7** exhiben un comportamiento celular diferente al de los compuestos **2** y **3**.

A partir de la comparación cualitativa de las estructuras celulares observadas a partir de los ensayos de inmunofluorescencia indirecta, se aprecia que los compuestos **2** y **3** inducen la desorganización de la red de microtúbulos, lo que es una característica propia de los agentes desestabilizantes de microtúbulos. El resto de compuestos de la serie, en cambio, inducen la formación de agregados de tubulina. Estos agregados de tubulina se asemejan a los manojos de microtúbulos que se forman en presencia de agentes estabilizantes clásicos, como el paclitaxel. No obstante, dichos manojos de microtúbulos emiten menos fluorescencia que los agregados observados en presencia de los compuestos objeto de estudio. Dado que el tamaño de las estructuras formadas y la cantidad de fluorescencia emitida son dos propiedades relacionadas entre sí de manera directamente proporcional, se concluye, por tanto, que los manojos de microtúbulos son estructuras menos voluminosas que los agregados de tubulina que aparecen en presencia de los ligandos estudiados.

Así pues, en base a los ensayos de inmunofluorescencia, se puede postular que las diferencias existentes entre las estructuras químicas de los compuestos **2** y **3** y las de los demás ligandos son las responsables de los distintos comportamientos observados sobre los cultivos celulares. Esos ligandos, aquellos estructuralmente más divergentes del compuesto parental (compuesto **1**), substituyen tanto el azabicyclo como la pirimidina central por anillos más sencillos y menos voluminosos, que pueden conllevar una interacción diferente con el sitio de unión.

La comparación entre el efecto inducido por los ligandos modelo (paclitaxel y vinblastina) y el efecto inducido por los ligandos a estudio, permite determinar que en cualquier caso, los compuestos de la serie CSCD no ejercen su función sobre la red de microtúbulos por el mismo mecanismo que dichos compuestos, dado que se observan importantes diferencias en todos los casos.

En cuanto a los ensayos de determinación de la citotoxicidad de todos los compuestos de la serie, puede decirse que los valores de CI_{50} hallados se correlacionan bien con las concentraciones requeridas para detener el ciclo celular. En ambos casos, los compuestos **1** y **2** son los más activos, aunque sus valores son aproximadamente dos órdenes de magnitud más bajos que los de los controles utilizados. En cambio, a diferencia de los resultados observados con dichos controles, las células muestran índices de resistencia mucho más pequeños en presencia de los ligandos estudiados, hecho que indica que son peores substratos de la gp-P.

Se ha propuesto que los compuestos con mayor lipofiliidad, sin carga neta a pH neutro y con el mayor número de anillos aromáticos son los mejores candidatos (Nobili *et al.*, 2012) para ser expulsados del citosol celular. De este modo, la gran cantidad de anillos aromáticos presentes en las estructuras químicas de los compuestos utilizados como controles, explica por qué los índices experimentales de resistencia mostrados por las células en presencia de estos compuestos son mucho mayores. Esta propiedad es de gran interés en el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer, ya que posibilita que las células tumorales no sean capaces de resistir la acción del compuesto mediante la sobreexpresión de la gp-P. Las células que expresan el fenotipo MDR siguen siendo sensibles, tanto al paclitaxel como a la vinblastina, aunque a una concentración mucho mayor de compuesto (600nM y 100nM, respectivamente).

2. Los compuestos investigados alteran el estado de agregación de la tubulina

Los ensayos sobre líneas celulares humanas muestran numerosas diferencias entre los compuestos **2** y **3** y el resto de la serie, mientras que, en cambio, dichas diferencias de comportamiento no se manifiestan en los ensayos bioquímicos realizados sobre el efecto en el estado de agregación. La determinación de la modulación de los valores de concentración crítica, inducida por los compuestos objeto de estudio, reveló que todos actúan incrementando el grado de polimerización de la proteína, en las condiciones del ensayo. El mismo resultado se obtuvo, tanto en condiciones que favorecen la polimerización (tampón GAB), como en condiciones que la dificultan (tampón PEDTA). Este comportamiento es característico de ligandos estabilizantes, como el docetaxel, en cuya presencia la tubulina muestra un valor de concentración crítica semejante al que muestra en presencia de los ligandos estudiados.

Así pues, los ligandos clasificados como desestabilizantes de acuerdo a los experimentos de biología celular, que son realizados en presencia de una pequeña proporción de tubulina unida, no muestran el mismo carácter desestabilizante en las determinaciones llevadas a cabo *in vitro*, que presentan una proporción de ligando respecto a la concentración de tubulina mucho mayor.

Adicionalmente, la determinación del valor de concentración crítica realizada en presencia de vinblastina muestra que el comportamiento de este ligando, un fármaco desestabilizante clásico, es opuesto al de los compuestos objeto de estudio en las condiciones del experimento. A pesar de ello, dicho ligando sí que es capaz de inducir la formación de agregados de tubulina a altas concentraciones, tal y como se observa en los ensayos de biología celular.

Los ensayos de DOSY y de AUC permiten corroborar el efecto promotor de la oligomerización en tampón PEDTA. Además, se observa que a concentraciones subestequiométricas de compuesto **1** frente a la concentración de tubulina, se forman unos agregados de proteína, cuyo tamaño promedio no aumenta con la concentración de compuesto (siendo la concentración máxima de ligando estudiada 1.5 veces la de tubulina). Este resultado es indicativo de una estequiometría menor que 1:1 para el ligando analizado.

La determinación cromatográfica de la estequiometría fue realizada tanto en condiciones que favorecen la polimerización, como en condiciones que la dificultan, y mostró unos valores menores que 1:1 (oscilaban entre 0.6:1 y 1.15:1 para los ligandos CSCD), siendo los compuestos **2** y **3** los únicos que presentan una relación ligeramente por encima de la equimolaridad. No obstante, la determinación cuantitativa sólo fue realizada en condiciones polimerizantes dado que bajo las condiciones opuestas (tampón PEDTA), se observó, de igual modo que por ultracentrifugación analítica, una mayor concentración de ligando unida a medida que se aumentaba la concentración total de ligando ensayada, que impidió determinar dicha estequiometría.

En último lugar, se estudió la unión diferencial del compuesto **1** a dímeros, tetrámeros y microtúbulos estabilizados, observándose unión exclusivamente en la especie tetramérica. Esto puede significar que el sitio de unión se encuentra ocluido en el microtúbulo y además, que se requiere la unión mínima de dos heterodímeros para conseguir la unión de los compuestos. De este modo, se concluye que el sitio de unión se encuentra en la región interdimérica.

3. El dominio de vinca es el sitio de unión de todos los ligandos

La incapacidad de los ligandos de la serie CSCD de unirse a microtúbulos descartó directamente que la región de unión fuese alguna de las que resultan accesibles en estas estructuras, tales como el sitio del paclitaxel o el de la laulimalida. Adicionalmente, los ensayos de competición por fluorescencia permitieron descartar la unión al sitio de la colchicina.

En cuanto a la competición con los sitios de la región interdimerica (sitio del PM060184 y dominio de vinca) no fue posible diferenciar entre ellos ya que ambos comparten una región y por tanto, se afectan mutuamente. Independientemente del sitio donde se unan los ligandos objeto de estudio, la unión de mayor afinidad del competidor del otro sitio bloquea estéricamente la unión de los compuestos de la serie CSCD. Además, la unión de ambos competidores desplaza el equilibrio hacia la forma dimerica, lo que también puede afectar a la unión de los ligandos estudiados, ya que se ha comprobado que éstos no se unen a dicha especie. La posterior resolución de la estructura cristalográfica de un tetrámero de tubulina (T_2R) unido al compuesto **1**, a 2.4Å, permitió determinar que la unión tiene lugar en el dominio de vinca.

Por un lado, todo ligando que se une al dominio de vinca debería mostrar, *a priori*, una estequiometría 1:1 en polímeros grandes. Por otro lado, la estequiometría sería igual a 0:1 si toda la proteína se encontrase en estado dimerico y 0.5:1 si estuviese toda ella formando tetrámeros. Así pues, las estequiometrías reales determinadas dependen del equilibrio entre las diferentes especies oligoméricas de la tubulina. El tamaño promedio de las especies formadas en el equilibrio se encuentra directamente relacionado con dicha estequiometría.

Al analizar la estructura cristalográfica (figura 54) se aprecia que la unión no tiene lugar mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno, sino a través de interacciones hidrofóbicas. Entonces, es esperable que la afinidad de estos compuestos por su diana sea menor que en otros casos donde sí se observan interacciones más fuertes. El componente que mayor estabilidad aporta a la unión es un apilamiento triple de enlaces π aromáticos que se forma entre la base nitrogenada del nucleótido intercambiable, una tirosina perteneciente a la subunidad β de la tubulina y el anillo central del ligando. De aquí se extrae la posibilidad de que los ligandos que comparten dicho anillo (**4**, **5**, **6** y **7**) sean capaces de unirse del mismo modo. Los compuestos **2** y **3** substituyen dicho anillo central por un anillo imidazol, una estructura química que también es capaz de establecer interacciones π . Así pues, es esperable que estos dos ligandos también establezcan la misma interacción.

Pero esta interacción no es la única que tiene lugar en la unión, ya que se forma un segundo apilamiento π aromático entre otra tirosina de la subunidad β y el anillo trifluorobenceno. Finalmente, cabe destacar que la cavidad interna del dominio es suficientemente voluminosa como para albergar el azabicyclo del compuesto.

La determinación de los contactos tubulina-ligando, a partir de la estructura cristalográfica correlaciona muy bien con los resultados de STD, que identifican los epítomos de unión responsables de la unión del compuesto **1** a su diana (figura 57).

Por otro lado, los ensayos de SAXS y de microscopía electrónica revelaron que los compuestos estudiados inducen la formación de polímeros espirales, de igual modo que ocurre en presencia de vinblastina. Así pues cabe destacar que los ligandos objeto de estudio, los cuales muestran valores de C_r comparables al del docetaxel, ni

estabilizan ni inducen la formación de microtúbulos. De esta forma, sería más apropiado considerarlos como agentes agregantes en lugar de agentes estabilizantes.

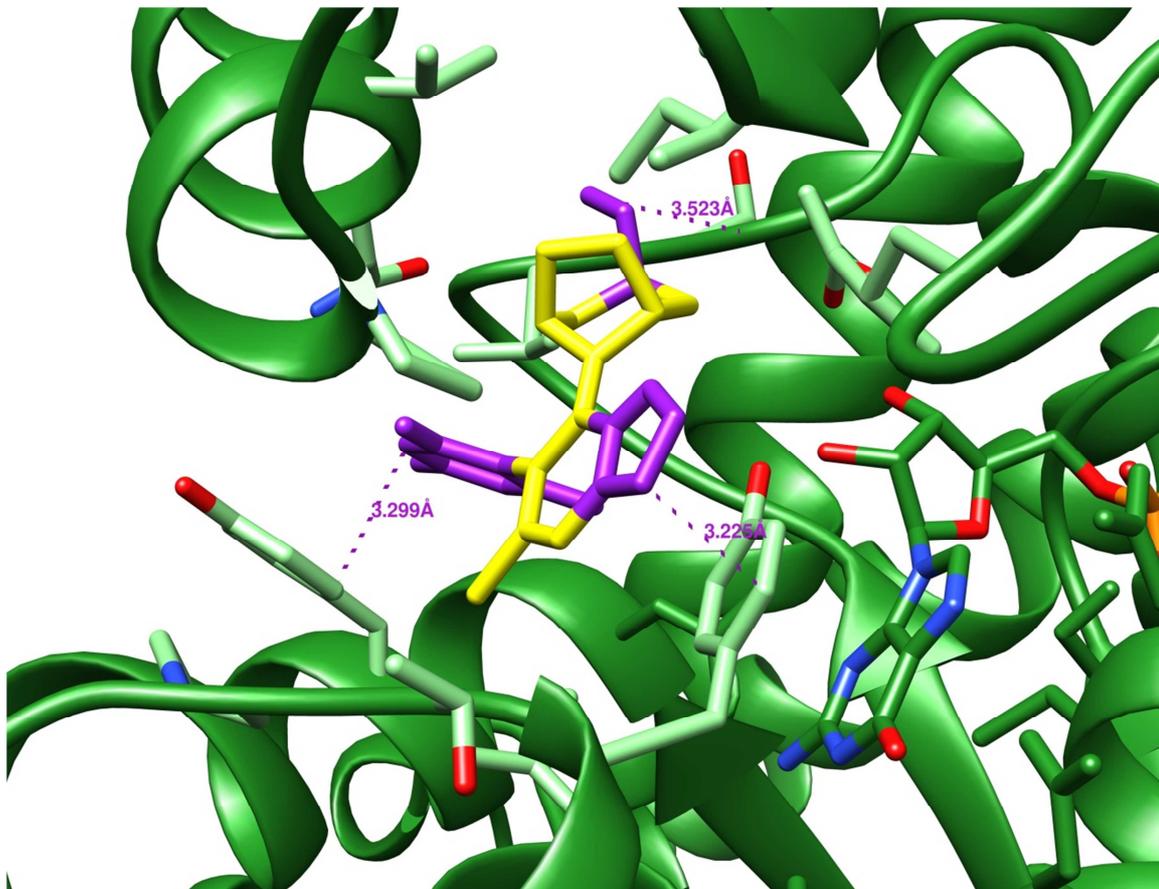


Figura 57: Diagrama de cintas de la estructura cristalográfica del complejo T₂RT-compuesto 1, en el que se representan las distancias de contacto más pequeñas entre la proteína y el ligando y su correlación con los epítopos identificados por STD-RMN (resaltados en morado).

Finalmente, la determinación del efecto de los ligandos sobre la red de microtúbulos de hongos reveló que la unión es reversible, otro resultado comparable al obtenido en presencia de ligandos del dominio de vinca.

4. El mecanismo de acción consiste en la modulación de la interfase entre dímeros consecutivos

Como ya se ha expuesto anteriormente, los estudios bioquímicos realizados sobre el compuesto 1 demuestran que no existe interacción entre el ligando y los microtúbulos organizados, así como tampoco se aprecia unión a dímeros de tubulina. Sin embargo, a través de ensayos de ultracentrifugación analítica sí que fue posible observar unión a oligómeros de diversos tamaños, así como al complejo T₂R. Estos resultados sugieren: que el compuesto se une a especies oligoméricas de tamaños variables, que la unión requiere la formación previa del sitio al completo y que éste no es accesible cuando la tubulina forma parte de un microtúbulo.

Una vez que la unión del ligando tiene lugar, se induce la formación de estructuras helicoidales. Si como consecuencia del efecto agregante del compuesto,

dichas estructuras interactúan con oligómeros de características similares, pueden formarse especies comparables con los agregados de tubulina, observados por inmunofluorescencia indirecta sobre la línea celular A549. La estequiometría de unión de unas estructuras como las descritas estaría comprendida entre 0.5:1 y 1:1, lo que se correlaciona bien con los resultados obtenidos.

Para que la unión del compuesto tenga lugar, es necesario que al menos dos heterodímeros de tubulina se autoasocien entre sí previamente, una autoasociación proteica que es dependiente de la concentración de magnesio (Menéndez *et al.*, 1998). Asimismo, se ha comprobado que la unión del ligando a la tubulina también depende de la concentración de magnesio en el medio, lo que indica que la unión del ligando y la autoasociación de la tubulina son dos procesos ligados entre sí.

En las imágenes de microscopía electrónica mostradas se aprecian dos estructuras claramente diferenciadas: agregados de tubulina y estructuras helicoidales de diferentes tamaños. Por un lado, puede ser que los agregados observados se estén encontrando en todos los experimentos realizados en tampón PEDTA con 7mM MgCl₂, como por ejemplo, los experimentos de SAXS o los de HPLC que permiten determinar la estequiometría. Por otro lado, las hélices observadas con el MET tienen una anchura equivalente a varias subunidades de tubulina, por lo que es posible que los oligómeros unidos sean capaces de presentar cierta asociación lateral.

A nivel estructural, cuando el compuesto **1** se une a su diana, la posición relativa entre dímeros varía, con lo que la estructura curvada del tetrámero se endereza ligeramente (figura 55). El ligando contacta con la hélice H10 de la subunidad α y acerca el dímero al completo hacia sí mismo. La posición global final no está enderezada completamente, como lo están los dímeros que forman parte de los microtúbulos; sin embargo, está suficientemente enderezada, como para que se puedan unir tetrámeros entre sí mediante uniones cabeza-cola. La aparición de los oligómeros de tubulina de diferentes tamaños se puede explicar mediante una unión longitudinal entre tetrámeros unidos, que da lugar a polímeros cortos.

5. Influencia de las modificaciones estructurales en la actividad de los compuestos

El método utilizado en la presente memoria, para el cálculo de las constantes de afinidad es una adaptación del método publicado por el profesor John J. Correia (Correia, 2000), que se basa en la consideración de que el ensamblaje de la tubulina sigue un sistema isodésmico. En este tipo de sistemas todas las etapas de polimerización presentan la misma afinidad, con lo que basta determinar el valor de la constante del primer paso para describir el sistema al completo.

Las constantes de afinidad son determinadas a partir de un ajuste de mínimos cuadrados entre los coeficientes de sedimentación promedio, experimentales y los coeficientes teóricos calculados. Una mayor desviación entre sendos valores, se relaciona de manera directamente proporcional con la existencia de elementos que dificultan la unión, como dímeros de tubulina inactivos o agregados. Se trata de un problema habitual en el estudio de sistemas de proteínas que polimerizan siguiendo un esquema isodésmico (Sontag *et al.*, 2004).

Con el fin de validar la determinación de las constantes mediante ensayos de ultracentrifugación analítica, se determinaron adicionalmente las constantes siguiendo la

cinética de unión por fluorescencia. Mientras que las variaciones en la señal de AUC son debidas a la autoasociación de la proteína, los cambios en la emisión fluorescencia son debidas a la unión del ligando. En ambos casos se obtuvieron valores en el mismo orden de magnitud (intervalo micromolar bajo) y por tanto, compatibles entre sí.

La determinación de los valores aparentes de afinidad de todos los compuestos estudiados, en conjunto, permite establecer un orden jerárquico en el cual, los compuestos **1** y **2** son los más activos.

Durante el ensamblaje de los microtúbulos, en cuanto se forma un núcleo de dos dimensiones, la polimerización isodésmica da paso a una condensación nucleada que sigue una dinámica diferente (Oosawa y Asakura, 1975). No obstante, la relación lineal existente entre las constantes de unión y los valores de concentración crítica (figura 58), convierte a este parámetro en un buen sensor de la actividad de los compuestos, que además es más sencillo de determinar. Adicionalmente, también se observa una relación lineal entre las constantes de afinidad y otro valor de fácil obtención, como es la concentración inhibitoria 50 (figura 59).

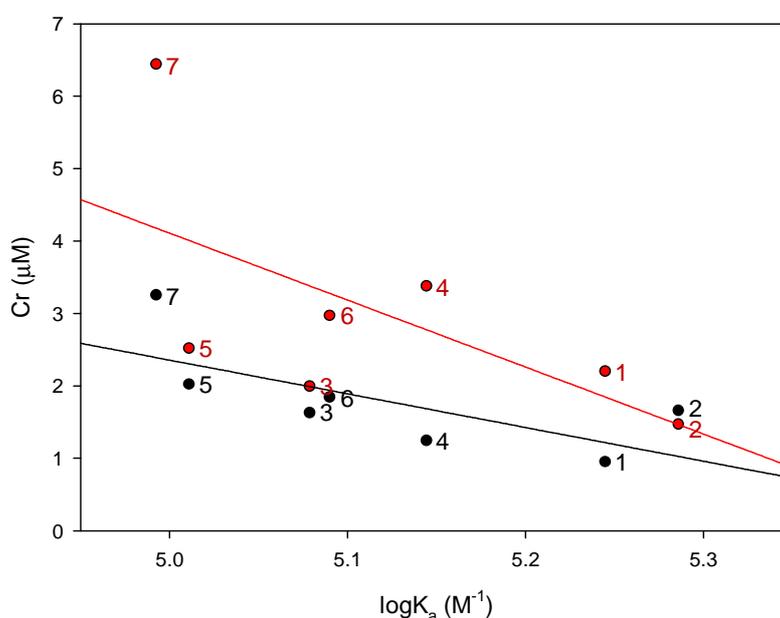


Figura 58: Dependencia de los valores de Cr de los compuestos CSCD en tampón GAB 6mM MgCl₂ (negro) y en tampón PEDTA 7mM MgCl₂ (rojo), con sus constantes de afinidad aparentes. Dichas constantes están representadas en su forma logarítmica.

Se observa que los compuestos con una constante de unión menor, exhiben valores de Cr y de CI₅₀ más grandes que los demás. Con ello se confirma que el efecto de los compuestos implica la alteración del estado de agregación de la tubulina.

La relación lineal observada entre los valores de concentración crítica, medidos en tampón GAB, y las constantes de afinidad, es diferente a la relación lineal obtenida a partir de los valores de concentración crítica, medidos en tampón PEDTA. Dicha diferencia corresponde a la distinta capacidad de agregación de los compuestos en función del tampón en el que se encuentren. La diferencia entre las pendientes ajustadas a partir de los valores de CI₅₀ es debida a la capacidad de la gp-P de expulsar parte del ligando presente en la línea celular resistente, A2780AD, que no es expulsado en la línea sensible, A2780.

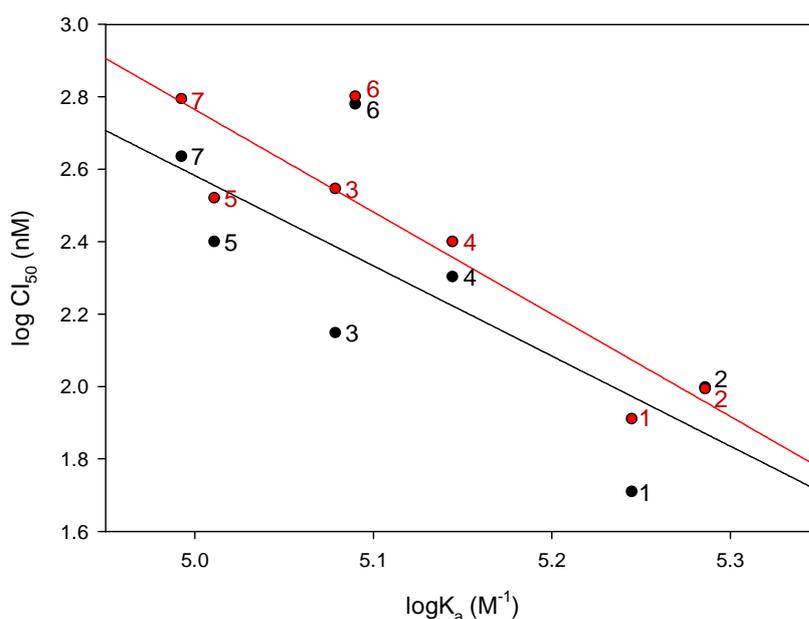


Figura 59: Dependencia de los valores de Cl_{50} de los compuestos objeto de estudio en las líneas celulares A2780 (negro, línea sensible) y A2780AD (rojo, línea resistente), con sus constantes de afinidad aparentes. Los valores de Cl_{50} y de las constantes de afinidad aparentes están representados en su forma logarítmica.

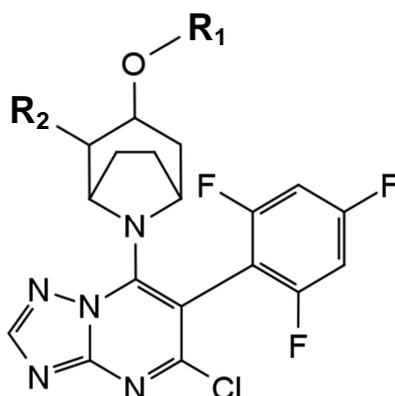
Los valores de afinidad, Cr y Cl_{50} coinciden al señalar a los compuestos **1** y **2** como los más activos y a los compuestos **5** y **7** como los menos activos. Comparando las estructuras químicas de estos ligandos, se observa que los dos últimos presentan sustituyentes más polares que el resto. El compuesto **5** contiene un éster etílico unido en su posición 3 del azabicyclo en lugar del metóxido del compuesto **1**. El **7**, por su parte, es idéntico al compuesto parental (**1**), excepto por la adición de un radical flúor unido al azabicyclo en su posición 2. Esto pone de manifiesto una relación inversa entre la afinidad y la polaridad del grupo dirigido hacia el interior del sitio (tabla 10).

En cuanto a las diferencias observadas mediante modelado molecular, cabe destacar que éstas son demasiado pequeñas como para proponer mecanismos distintos. Únicamente se aprecia que el alineamiento del anillo central con la tirosina 224 y el nucleótido de la subunidad β , condiciona la afinidad de la unión. Los compuestos menos activos presentan dicho anillo ligeramente desplazado respecto a la pose del compuesto **1** en el cristal.

En cuanto a los modelados moleculares de los compuestos **2** y **3**, las poses presentadas poseen una abundancia relativa menor que las del resto de ligandos. Las poses presentadas dirigen el trifluorobenceno hacia dentro del dominio. El apilamiento π establecido mediante este trifluorobenceno en presencia del compuesto **1**, se establece entre la tirosina 210 y la pirimidina que sustituye al azabicyclo en presencia de los compuestos **2** y **3**. Así se concluye que la característica más importante para que la unión tenga lugar es la posibilidad de formar apilamientos π , mientras que aparentemente, la ubicación del trifluorobenceno no afecta de manera apreciable.

Así pues, teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, se puede concluir que los compuestos **2** y **3** presentan un mecanismo de acción diferente al del resto de compuestos objeto de estudio. A concentraciones estequiométricas no se aprecian

diferencias, ya que todos los ligandos de la serie inducen la formación de estructuras helicoidales, pero a concentraciones subestequiométricas (ensayos celulares), sí que se manifiestan diferencias. Los compuestos **2** y **3** podrían formar oligómeros con una mala capacidad de asociarse lateralmente. Este hecho justificaría el aparente efecto despolimerizador en células, ya que dichos oligómeros no podrían interactuar con otros dímeros (ligados o no ligados) con facilidad. Los demás compuestos, en cambio, podrían formar oligómeros enderezados con mejor capacidad de asociarse con otros dímeros de tubulina lateralmente. En condiciones estequiométricas la tubulina unida a los ligandos se une con facilidad a otras tubulinas unidas para originar las espirales observadas por SAXS y por microscopía electrónica, con los compuestos **1** y **2**.



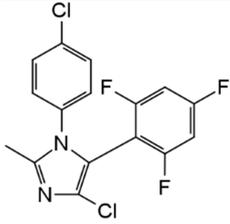
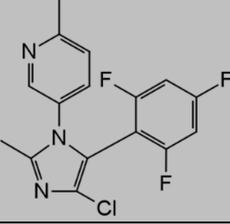
Compuesto	Modificación estructural	Variación de K_a respecto a la del compuesto 1 (M^{-1})
1	$R_1 \rightarrow H$ $R_2 \rightarrow H$	0
2		+17488.0355
3		-55888.6853
4	$R_1 \rightarrow C-C\equiv C$ $R_2 \rightarrow H$	-36330.5672
5	$R_1 \rightarrow CO-C$ $R_2 \rightarrow H$	-73211.9749
6	$R_1 \rightarrow C-C-C$ $R_2 \rightarrow H$	-52752.8403
7	$R_1 \rightarrow H$ $R_2 \rightarrow F$	-77481.0513

Tabla 10: Variación de las constantes de afinidad aparentes de los compuestos objeto de estudio, en función de las modificaciones en su estructura química.

6. Comparativa entre el efecto de la vinblastina y el de los compuestos objeto de estudio

La vinblastina es el fármaco más comúnmente utilizado como modelo para referirse al dominio de vinca. Cuando se une a la interfase dímero-dímero, el fármaco actúa a modo de cuña curvando la estructura del tetrámero (Gigant *et al.*, 2005; Li y Alisaraie, 2015). El ángulo de desplazamiento es tal (figura 60) que no puede interaccionar con otros residuos, con lo que se promueve la despolimerización en presencia de una concentración de ligando suficiente.

Si se comparan los resultados obtenidos para los compuestos de la serie CSCD con la información conocida sobre la vinblastina, se observan varias similitudes y múltiples diferencias en cuanto al mecanismo de acción. Por un lado, los resultados de SAXS y de microscopía electrónica demuestran que todos los compuestos referidos inducen la aparición de estructuras helicoidales. Por otro lado, las diferencias son notables. Los experimentos sobre el efecto en la polimerización revelan que, incluso a concentraciones estequiométricas, el comportamiento observado es opuesto: mientras que la vinblastina actúa como desestabilizante de microtúbulos, los compuestos de la serie CSCD incrementan la masa de polímero. Las imágenes de inmunofluorescencia permiten observar las mismas diferencias. A muy altas concentraciones de vinblastina, los ensayos de inmunofluorescencia muestran que dicho ligando induce la aparición de paracristales, tal y como se describe en la bibliografía (Jordan *et al.*, 1992).

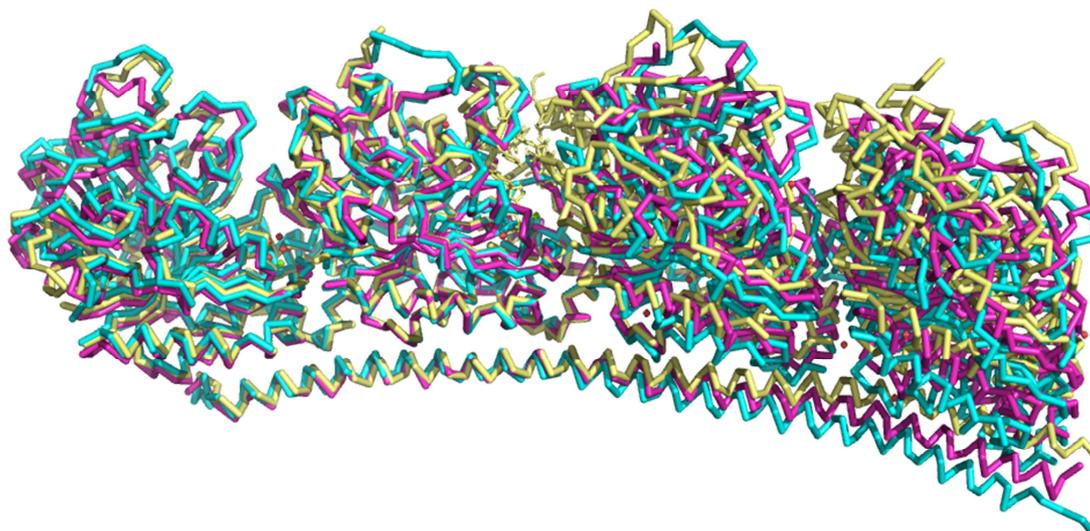


Figura 60: Superposición de la estructura cristalográfica del complejo T_2R libre (estructura extraída del Protein Data Bank; código 3RYF; resolución de 2.52Å) (Nawrotek *et al.*, 2011), con la del complejo T_2R unido a la vinblastina (estructura extraída del Protein Data Bank; código 1Z2B; resolución de 4.10Å) (Gigant 2005), y con la estructura del complejo T_2RT unido al compuesto **1** (resolución de 2.40Å). El complejo sin ligando está representado en rosa, el complejo con vinblastina en azul y el complejo con el compuesto **1**, en amarillo. Los heterodímeros de la izquierda se alinean perfectamente, mientras que los de la derecha se encuentran desplazados.

A concentraciones subestequiométricas, la vinblastina induce la formación de estructuras curvadas que se unen al microtúbulo en crecimiento e impiden la unión de nuevos dímeros, promoviendo por tanto la entrada del polímero en catástrofe. En

cambio, a concentraciones estequiométricas, los dímeros de tubulina unidos se asocian entre sí para formar estructuras helicoidales, que en el contexto de la célula, forman los paracristales observados por inmunofluorescencia.

A nivel estructural, se concluye que el volumen específico ocupado por la vinblastina determina la posición relativa entre dímeros; al tratarse de un fármaco muy voluminoso, el efecto de cuña producido es notable. El pequeño compuesto **1**, en cambio, contacta con la subunidad α atrayéndola hacia sí mismo, lo que resulta en una estructura más enderezada que la del complejo T₂R sin ligando unido.

En cuanto a los parámetros determinados cuantitativamente, la constante de afinidad (K_1) de la vinblastina por el complejo T₂R es igual a $2.5 \cdot 10^6 \text{M}^{-1}$ (Gigant, 2005), mientras que la del compuesto **1** por el mismo complejo se aproxima a $1.8 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$. Este orden de magnitud de diferencia es igualmente observado en las medidas de citotoxicidad y de ciclo celular.

Las distintas afinidades presentadas, así como la pequeña transición diferencial de un heterodímero respecto a su contiguo, parecen ser las responsables de las diferencias observadas entre la vinblastina y el compuesto **1**, a pesar de compartir dominio de unión.

En base a los resultados obtenidos, cabe esperar que el mecanismo de acción presentado por los compuestos **2** y **3** sea distinto que el de la vinblastina y que el del compuesto **1**.

6

Conclusions

1. Investigated compounds show a cytotoxic activity in the middle-high nanomolar range. Besides, it was observed that they are able to overcome the resistance which is caused by P-glycoprotein overexpression, since they are not a substrate for this protein.
2. The biological target, on which these compounds act, is the microtubule network. They show a remarkable *in vitro* effect on tubulin aggregation.
3. The binding site for all the compounds is the vinca domain. The parental compound, coded with number **1**, directly contacts with tubulin through the methoxide radical which is bound to the azabicyclo, through the trifluorobenzene and through the triazole ring. Two aromatic π - π stacks contribute in a critical way to the ligand binding. Once binding happens, synthesis of slightly curved oligomers is induced, which are able to assemble together.
4. The stoichiometry ranges between 0.6:1 and 1.15:1, depending on the oligomerization state of the species that are induced by ligands. Moreover, all the apparent binding constants come within the same order of magnitude: 10^5M^{-1} .
5. Compounds **1** and **2** are the most active ones of the series. Obtained results also suggest that there are an inverse relation between affinity and polarity of the radical bound to the azabicyclo.
6. Despite sharing binding domain, CSCD compounds and vinblastine show many differences. This suggests that the specific volume determines the ligand behavior.

7

Bibliografía

Abal, M., Andreu, J. M., Barasoain, I., 2003. Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. *Curr. Cancer Drug Targets* 3, 193-203.

Adamowicz, K., Marczevska, M., Jassem, J., 2009. Combining systemic therapies with radiation in breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* 35, 409-416.

Aguilar Peris, J., 1981. Curso de termodinámica. Alhambra Universidad, Madrid.

Al-Minawi, A. Z., Lee, Y. F., Hakansson, D., Johansson, F., Lundin, C., Saleh-Gohari, N., Schultz, N., Jenssen, D., Bryant, H. E., Meuth, M., Hinz, J. M., Helleday, T., 2009. The ERCC1/XPF endonuclease is required for completion of homologous recombination at DNA replication forks stalled by inter-strand cross-links. *Nucleic Acids Res.* 37, 6400-6413.

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 1998. Essential cell biology. An introduction to the molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc., New York and London.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2008. Molecular biology of the cell. Garland Science. Taylor and Francis Group, New York and Abingdon.

Alushin, G. M., Lander, G. C., Kellogg, E. H., Zhang, R., Baker, D., Nogales, E., 2014. High-resolution microtubule structures reveal the structural transitions in $\alpha\beta$ -tubulin upon GTP hydrolysis. *Cell* 157, 1117-1129.

Aller, S. G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P. M., Trinh, Y. T., Zhang, Q., Urbatsch, I. L., Chang, G., 2009. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323, 1718-1722.

Andreu, J. M., 2007. Large scale purification of brain tubulin. In: Zhou, J. (Ed.), *Methods in molecular medicine*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 17-28.

Andreu, J. M., Barasoain, I., 2001. The interaction of baccatin III with the taxol binding site of microtubules determined by a homogeneous assay with fluorescent taxoid. *Biochemistry* 40, 11975-11984.

Andreu, J. M., Gorbunoff, M. J., Lee, J. C., Timasheff, S. N., 1984. Interaction of tubulin with bifunctional colchicine analogues: an equilibrium study. *Biochemistry* 23, 1742-1752.

Andreu, J. M., Wagenknecht, T., Timasheff, S. N., 1983. Polymerization of the tubulin-colchicine complex: relation to microtubule assembly. *Biochemistry* 22, 1556-1566.

Aneja, R., Lopus, M., Zhou, J., Vangapandu, S. N., Ghaleb, A., Yao, J., Nettles, J. H., Zhou, B., Gupta, M., Panda, D., Chandra, R., Joshi, H. C., 2006. Rational design of the microtubule-targeting anti-breast cancer drug EM015. *Cancer Res* 66, 3782-3791.

Arai, K., Shibutani, M., Matsuda, H., 2002. Distribution of the class II β -tubulin in developmental and adult rat tissues. *Cell Motil. Cytoskeleton* 52, 174-182.

Au, J. L., Li, D., Gan, Y., Gao, X., Johnson, A. L., Johnston, J., Millenbaugh, N. J., Jang, S. H., Kuh, H. J., Chen, C. T., Wientjes, M. G., 1998. Pharmacodynamics of immediate and delayed effects of paclitaxel: role of slow apoptosis and intracellular drug retention. *Cancer Res* 58, 2141-2148.

Bagnyukova, T. V., Serebriiskii, I. G., Zhou, Y., Hopper-Borge, E. A., Golemis, E. A., Astsaturov, I., 2010. Chemotherapy and signaling: how can targeted therapies supercharge cytotoxic agents? *Cancer Biol Ther* 10, 839-853.

Bai, R. L., Paull, K. D., Herald, C. L., Malspeis, L., Pettit, G. R., Hamel, E., 1991. Halichondrin B and homohalichondrin B, marine natural products binding in the vinca domain of tubulin. Discovery of tubulin-based mechanism of action by analysis of differential cytotoxicity data. *J. Biol. Chem.* 266, 15882-15889.

Baker, K. S., Ness, K. K., Weisdorf, D., Francisco, L., Sun, C. L., Forman, S., Bhatia, S., 2010. Late effects in survivors of acute leukemia treated with hematopoietic cell transplantation: a report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. *Leukemia* 24, 2039-2047.

Baldassarre, G., Belletti, B., Nicoloso, M. S., Schiappacassi, M., Vecchione, A., Spessotto, P., Morrione, A., Canzonieri, V., Colombatti, A., 2005. p27(Kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer Cell* 7, 51-63.

Banerjee, A., Roach, M. C., Wall, K. A., Lopata, M. A., Cleveland, D. W., Luduena, R. F., 1988. A monoclonal antibody against the type II isotype of β -tubulin. Preparation of isotypically altered tubulin. *J. Biol Chem.* 263, 3029-3034.

Barasoain, I., García-Carril, A. M., Matesanz, R., Maccari, G., Trigili, C., Mori, M., Shi, J. Z., Fang, W. S., Andreu, J. M., Botta, M., Díaz, J. F., 2010. Probing the pore drug binding site of microtubules with fluorescent taxanes: evidence of two binding poses. *Chem. Biol.* 17, 243-253.

- Barbier, P., Dorleans, A., Devred, F., Sanz, L., Allegro, D., Alfonso, C., Knossow, M., Peyrot, V., Andreu, J. M., 2010. Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers. *J. Biol. Chem.* 285, 31672-31681.
- Barbier, P., Peyrot, V., Sarrazin, M., Rener, G. A., Briand, C., 1995. Differential effects of ethyl 5-amino-2-methyl-1,2-dihydro-3-phenylpyrido[3,4-b]pyrazin-7-yl carbamate analogs modified at position C2 on tubulin polymerization, binding, and conformational changes. *Biochemistry* 34, 16821-16829.
- Behnke, O., Forer, A., 1967. Evidence for four classes of microtubules in individual cells. *J. Cell Sci.* 2, 169-192.
- Bhattacharya, R., Yang, H., Cabral, F., 2011. Class V β -tubulin alters dynamic instability and stimulates microtubule detachment from centrosomes. *Mol. Biol. Cell* 22, 1025-1034.
- Binkhathlan, Z., Lavasanifar, A., 2013. P-glycoprotein inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* 13, 326-346.
- Blagosklonny, M. V., 2004. Analysis of FDA approved anticancer drugs reveals the future of cancer therapy. *Cell Cycle* 3, 1035-1042.
- Bode, A. M., Dong, Z., 2009. Cancer prevention research - then and now. *Nat. Rev. Cancer* 9, 508-516.
- Boldon, L., Laliberte, F., Liu, L., 2015. Review of the fundamental theories behind small angle X-ray scattering, molecular dynamics simulations, and relevant integrated application. *Nano Rev.* 6, 25661.
- Borisy, G. G., Taylor, E. W., 1967. The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. *J. Cell Biol.* 34, 535-548.
- Bouchet, B. P., Puisieux, A., Galmarini, C. M., 2011. β III-tubulin is required for interphase microtubule dynamics in untransformed human mammary epithelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 872-878.
- Boukari, H., Nossal, R., Sackett, D. L., 2003. Stability of drug-induced tubulin rings by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* 42, 1292-1300.
- Brackovic, A., Harvey, J. E., 2015. Synthetic, semisynthetic and natural analogues of peloruside A. *Chem. Commun. (Camb.)* 51, 4750-4765.
- Brouhard, G. J., Rice, L. M., 2014. The contribution of alphabeta-tubulin curvature to microtubule dynamics. *J. Cell Biol.* 207, 323-334.
- Brown, N. S., Bicknell, R., 2001. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 3, 323-327.
- Brown, P. H., Schuck, P., 2008. A new adaptive grid-size algorithm for the simulation of sedimentation velocity profiles in analytical ultracentrifugation. *Comput. Phys. Commun.* 178, 105-120.
- Buey, R. M., Barasoain, I., Jackson, E., Meyer, A., Giannakakou, P., Paterson, I., Mooberry, S., Andreu, J. M., Díaz, J. F., 2005. Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity. *Chem. Biol.* 12, 1269-1279.

Buey, R. M., Calvo, E., Barasoain, I., Pineda, O., Edler, M. C., Matesanz, R., Cerezo, G., Vanderwal, C. D., Day, B. W., Sorensen, E. J., López, J. A., Andreu, J. M., Hamel, E., Díaz, J. F., 2007. Cyclostreptin binds covalently to microtubule pores and luminal taxoid binding sites. *Nat. Chem. Biol.* 3, 117-125.

Buey, R. M., Díaz, J. F., Andreu, J. M., O'Brate, A., Giannakakou, P., Nicolaou, K. C., Sasmal, P. K., Ritzen, A., Namoto, K., 2004. Interaction of epothilone analogs with the paclitaxel binding site: relationship between binding affinity, microtubule stabilization, and cytotoxicity. *Chem. Biol.* 11, 225-236.

Canales, Á., Rodríguez-Salarichs, J., Trigili, C., Nieto, L., Coderch, C., Andreu, J. M., Paterson, I., Jiménez-Barbero, J., Díaz, J. F., 2011. Insights into the interaction of discodermolide and docetaxel with tubulin. Mapping the binding sites of microtubule-stabilizing agents by using an integrated NMR and computational approach. *ACS Chem. Biol.* 6, 789-799.

Canela, M. D., Pérez-Pérez, M. J., Noppen, S., Sáez-Calvo, G., Díaz, J. F., Camarasa, M. J., Liekens, S., Priego, E. M., 2014. Novel colchicine-site binders with a cyclohexanedione scaffold identified through a ligand-based virtual screening approach. *J. Med. Chem.* 57, 3924-3938.

Claverie, J. M., Dreux, H., Cohen, R., 1975. Sedimentation of generalized systems of interacting particles. I. Solution of systems of complete Lamm equations. *Biopolymers* 14, 1685-1700.

Cole, J. L., Lary, J. W., T, P. M., Laue, T. M., 2008. Analytical ultracentrifugation: sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. *Methods Cell Biol.* 84, 143-179.

Conze, D., Weiss, L., Regen, P. S., Bhushan, A., Weaver, D., Johnson, P., Rincón, M., 2001. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Res* 61, 8851-8858.

Cormier, A., Knossow, M., Wang, C., Gigant, B., 2010. The binding of vinca domain agents to tubulin: structural and biochemical studies. *Methods Cell Biol.* 95, 373-390.

Correia, J. J., 2000. Analysis of weight average sedimentation velocity data. *Methods Enzymol.* 321, 81-100.

Cortese, F., Bhattacharyya, B., Wolff, J., 1977. Podophyllotoxin as a probe for the colchicine binding site of tubulin. *J. Biol. Chem.* 252, 1134-1140.

Cortesina, G., Gabriele, P., Airoldi, M., De Stefani, A., Valente, G., Orecchia, R., Moretti, U., Bussi, M., 1991. Recurrences of epithelial tumors of the head and neck: review of the literature and a critical analysis of the problem. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.* 11 Suppl. 34, 1-66.

Cragg, G. M., Grothaus, P. G., Newman, D. J., 2009. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem. Rev.* 109, 3012-3043.

Chacón, P., Morán, F., Díaz, J. F., Pantos, E., Andreu, J. M., 1998. Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm. *Biophys. J.* 74, 2760-2775.

Chao, S. K., Wang, Y., Verdier-Pinard, P., Yang, C. P., Liu, L., Rodríguez-Gabín, A., McDaid, H. M., Horwitz, S. B., 2012. Characterization of a human β V-tubulin antibody and expression of this isotype in normal and malignant human tissue. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69, 566-576.

- Checchi, P. M., Nettles, J. H., Zhou, J., Snyder, J. P., Joshi, H. C., 2003. Microtubule-interacting drugs for cancer treatment. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 361-365.
- Chen, A. D., Johnson, C. S., Lin, M., Shapiro, M. J., 1998. Chemical exchange in diffusion NMR experiments. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 9094-9095.
- Chen, C. J., Rose, J. P., Newton, M. G., Liu, Z. J., Wang, B. C., 2002. Protein crystallography. In: Howard, G.C., Brown, W.E. (Eds.), *Modern protein chemistry: practical aspects*. CRC Press LLC, Boca Ratón, FL, pp. 7-36.
- Chen, S. M., Meng, L. H., Ding, J., 2010. New microtubule-inhibiting anticancer agents. *Expert Opin. Investig. Drugs* 19, 329-343.
- Chi, S., Xie, W., Zhang, J., Xu, S., 2015. Theoretical insight into the structural mechanism for the binding of vinblastine with tubulin. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1-21.
- Chiang, Y. K., Kuo, C. C., Wu, Y. S., Chen, C. T., Coumar, M. S., Wu, J. S., Hsieh, H. P., Chang, C. Y., Jseng, H. Y., Wu, M. H., Leou, J. S., Song, J. S., Chang, J. Y., Lyu, P. C., Chao, Y. S., Wu, S. Y., 2009. Generation of ligand-based pharmacophore model and virtual screening for identification of novel tubulin inhibitors with potent anticancer activity. *J. Med. Chem.* 52, 4221-4233.
- Churchill, C. D., Klobukowski, M., Tuszynski, J. A., 2014. The unique binding mode of laulimalide to two tubulin protofilaments. *Chem. Biol. Drug Des.*
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D., 1990. *Molecular cell biology*. Scientific American Books, New York, NY.
- de Inés, C., Leynadier, D., Barasoain, I., Peyrot, V., García, P., Briand, C., Renner, G. A., Temple, C., Jr., 1994. Inhibition of microtubules and cell cycle arrest by a new 1-deaza-7,8-dihydropteridine antitumor drug, CI 980, and by its chiral isomer, NSC 613863. *Cancer Res* 54, 75-84.
- Desiderio, D. M., 1993. *Mass Spectrometry: clinical and biomedical applications (modern analytical chemistry)*. Plenum Press, New York, NY.
- DeVita, V. T., Jr., Chu, E., 2008. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* 68, 8643-8653.
- Devred, F., Tsvetkov, P. O., Barbier, P., Allegro, D., Horwitz, S. B., Makarov, A. A., Peyrot, V., 2008. Stathmin/Op18 is a novel mediator of vinblastine activity. *FEBS Lett.* 582, 2484-2488.
- Díaz, J. F., Barasoain, I., Andreu, J. M., 2003. Fast kinetics of Taxol binding to microtubules. Effects of solution variables and microtubule-associated proteins. *J Biol Chem* 278, 8407-8419.
- Díaz, J. F., Menéndez, M., Andreu, J. M., 1993. Thermodynamics of ligand-induced assembly of tubulin. *Biochemistry* 32, 10067-10077.
- Díaz, J. F., Strobe, R., Engelborghs, Y., Souto, A. A., Andreu, J. M., 2000. Molecular recognition of taxol by microtubules. Kinetics and thermodynamics of binding of fluorescent taxol derivatives to an exposed site. *J. Biol. Chem.* 275, 26265-26276.
- Dillman, R. O., 2011. Cancer immunotherapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* 26, 1-64.
- Dranoff, G., 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 4, 11-22.

Dumontet, C., Jordan, M. A., 2010. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 9, 790-803.

El-Kareh, A. W., Labes, R. E., Secomb, T. W., 2008. Cell cycle checkpoint models for cellular pharmacology of paclitaxel and platinum drugs. *AAPS J.* 10, 15-34.

Escors, D., 2014. Tumour immunogenicity, antigen presentation and immunological barriers in cancer immunotherapy. *New J. Sci.* 2014.

Evangelio, J. A., Abal, M., Barasoain, I., Souto, A. A., Lillo, M. P., Acuna, A. U., Amat-Guerri, F., Andreu, J. M., 1998. Fluorescent taxoids as probes of the microtubule cytoskeleton. *Cell Motil. Cytoskeleton* 39, 73-90.

Faguet, G. B., 2015. A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database. *Int. J. Cancer.* 136, 2022-2036.

Fidler, I. J., 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer.* 3, 453-458.

Field, J. J., Díaz, J. F., Miller, J. H., 2013. The binding sites of microtubule-stabilizing agents. *Chem. Biol.* 20, 301-315.

Field, J. J., Kanakkanthara, A., Miller, J. H., 2014. Microtubule-targeting agents are clinically successful due to both mitotic and interphase impairment of microtubule function. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 5050-5059.

Freeman, R., 1997. A handbook of Nuclear Magnetic Resonance. Longman Group United Kingdom.

Fritz, A., Percy, C., Jack, A., Shanmugaratnam, K., Sobin, L., Parkin, D. M., Whelan, S., 2000. International classification of diseases for oncology. World Health Organization, Geneva.

Furdui, C. M., 2014. Ionizing radiation: mechanisms and therapeutics. *Antioxid. Redox Signal.* 21, 218-220.

Gapud, E. J., Bai, R., Ghosh, A. K., Hamel, E., 2004. Laulimalide and paclitaxel: a comparison of their effects on tubulin assembly and their synergistic action when present simultaneously. *Mol. Pharmacol.* 66, 113-121.

García-Segura, J. M., Gavilanes, J. G., Martínez del Pozo, Á., Montero, F., Oñaderra, M., Vivanco, F., 2007. Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica. Editorial Síntesis, Madrid.

Giannakakou, P., Gussio, R., Nogales, E., Downing, K. H., Zaharevitz, D., Bollbuck, B., Poy, G., Sackett, D., Nicolaou, K. C., Fojo, T., 2000. A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2904-2909.

Gibbs, S. J., Johnson, C. S., 1991. A PFG NMR experiment for accurate diffusion and flow studies in the presence of eddy currents. *J. Magn. Reson.* 93, 395-402.

Gigant, B., Curmi, P. A., Martin-Barbey, C., Charbaut, E., Lachkar, S., Lebeau, L., Siavoshian, S., Sobel, A., Knossow, M., 2000. The 4 Å X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex. *Cell* 102, 809-816.

- Gigant, B., Wang, C., Ravelli, R. B., Roussi, F., Steinmetz, M. O., Curmi, P. A., Sobel, A., Knossow, M., 2005. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* 435, 519-522.
- Gottesman, M. M., Pastan, I., Ambudkar, S. V., 1996. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 610-617.
- Grosse, P. Y., Bressolle, F., Pinguet, F., 1998. *In vitro* modulation of doxorubicin and docetaxel antitumoral activity by methyl- β -cyclodextrin. *Eur. J. Cancer* 34, 168-174.
- Gunning, P. W., Ghoshdastider, U., Whitaker, S., Popp, D., Robinson, R. C., 2015. The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J. Cell Sci.*
- Gurjar, M. K., Henri, J. T., Bose, D. S., Rao, A. V. R., 1996. Total synthesis of a potent immunosuppressant pironetin. *Tetrahedron Letters* 37, 6615-6618.
- Hadfield, J. A., Ducki, S., Hirst, N., McGown, A. T., 2003. Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs. *Prog. Cell Cycle Res.* 5, 309-325.
- Hajdu, S. I., 2011. A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer* 117, 1097-1102.
- Hajdu, S. I., 2012. A note from history: landmarks in history of cancer, part 4. *Cancer* 118, 4914-4928.
- Hajdu, S. I., Darvishian, F., 2013. A note from history: landmarks in history of cancer, part 5. *Cancer* 119, 1450-1466.
- Hajdu, S. I., Vadmal, M., Tang, P., 2015. A note from history: landmarks in history of cancer, part 7. *Cancer*.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Havercroft, J. C., Cleveland, D. W., 1984. Programmed expression of β -tubulin genes during development and differentiation of the chicken. *J. Cell Biol.* 99, 1927-1935.
- Head, J., Lee, L. L., Field, D. J., Lee, J. C., 1985. Equilibrium and rapid kinetic studies on nocodazole-tubulin interaction. *J. Biol. Chem.* 260, 11060-11066.
- Hernández-González, M., Peñalva, M. Á., Pantazopoulou, A., 2015. Conditional inactivation of *Aspergillus nidulans* sarA(SAR1) uncovers the morphogenetic potential of regulating endoplasmic reticulum (ER) exit. *Mol. Microbiol.* 95, 491-508.
- Himes, R. H., 1991. Interactions of the catharanthus (vinca) alkaloids with tubulin and microtubules. *Pharmacol. Ther.* 51, 257-267.
- Himes, R. H., Burton, P. R., Gaito, J. M., 1977. Dimethyl sulfoxide-induced self-assembly of tubulin lacking associated proteins. *J. Biol. Chem.* 252, 6222-6228.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., Niwa, S., 2009. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 682-696.
- Hodgkinson, J. L., Hutton, T., Medrano, F. J., Bordas, J., 1992. X-ray solution scattering studies on vinblastine-induced polymers of microtubule protein: structural characterisation and effects of temperature. *J. Struct. Biol.* 109, 28-38.

- Hoelder, S., Clarke, P. A., Workman, P., 2012. Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities. *Mol. Oncol.* 6, 155-176.
- Honnappa, S., Cutting, B., Jahnke, W., Seelig, J., Steinmetz, M. O., 2003. Thermodynamics of the Op18/stathmin-tubulin interaction. *J. Biol. Chem.* 278, 38926-38934.
- Hussar, D. A., 1994. New therapeutic agents marketed in 1993. *Pa Med* 97, 12-16.
- Janke, C., 2014. The tubulin code: molecular components, readout mechanisms, and functions. *J. Cell Biol.* 206, 461-472.
- Jensen-Smith, H. C., Ludueña, R. F., Hallworth, R., 2003. Requirement for the β I and β IV tubulin isoforms in mammalian cilia. *Cell Motil. Cytoskeleton* 55, 213-220.
- Joensuu, H., Kellokumpu-Lehtinen, P. L., Bono, P., Alanko, T., Kataja, V., Asola, R., Utriainen, T., Kokko, R., Hemminki, A., Tarkkanen, M., Turpeenniemi-Hujanen, T., Jyrkkio, S., Flander, M., Helle, L., Ingalsuo, S., Johansson, K., Jaaskelainen, A. S., Pajunen, M., Rauhala, M., Kaleva-Kerola, J., Salminen, T., Leinonen, M., Elomaa, I., Isola, J., 2006. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 354, 809-820.
- Johnson, C. S., 1999. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 34, 203-256.
- Jordan, C., 2002. Historical perspective on hormonal therapy of advanced breast cancer. *Clin. Ther.* 24 Suppl A, A3-16.
- Jordan, M. A., Thrower, D., Wilson, L., 1992. Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles - implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J. Cell Sci.* 102, 401-416.
- Jordan, M. A., Wilson, L., 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* 4, 253-265.
- Jourdain, L., Curmi, P., Sobel, A., Pantaloni, D., Carlier, M. F., 1997. Stathmin: a tubulin-sequestering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules. *Biochemistry* 36, 10817-10821.
- Juliano, R. L., Ling, V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455, 152-162.
- Kabsch, W., 2010. XDS. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 66, 125-132.
- Katsetos, C. D., Dráber, P., 2012. Tubulins as therapeutic targets in cancer: from bench to bedside. *Curr. Pharm. Des.* 18, 2778-2792.
- Katsetos, C. D., Legido, A., Perentes, E., Mörk, S. J., 2003. Class III β -tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. *J. Child Neurol.* 18, 851-866; discussion 867.
- Kavallaris, M., 2010. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat. Rev. Cancer* 10, 194-204.
- Kelland, L., 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 7, 573-584.

- Kesselheim, A. S., Solomon, D. H., 2010. Incentives for drug development. The curious case of colchicine. *N. Engl. J. Med.* 362, 2045-2047.
- Klute, K., Nackos, E., Tasaki, S., Nguyen, D. P., Bander, N. H., Tagawa, S. T., 2014. Microtubule inhibitor-based antibody-drug conjugates for cancer therapy. *Onco. Targets Ther.* 7, 2227-2236.
- Koç, A., Wheeler, L. J., Mathews, C. K., Merrill, G. F., 2004. Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J. Biol. Chem.* 279, 223-230.
- Köhler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., Svergun, D. I., 2003. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* 36, 1277-1282.
- Kovalchuk, I. P., Golubov, A., Koturbash, I. V., Kutanzi, K., Martin, O. A., Kovalchuk, O., 2014. Age-dependent changes in DNA repair in radiation-exposed mice. *Radiat. Res.* 182, 683-694.
- Lai, D., Visser-Grieve, S., Yang, X., 2012. Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. *Biosci. Rep.* 32, 361-374.
- Lakowicz, J. R., 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer US, New York, NY.
- Langley, R. R., Fidler, I. J., 2007. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr. Rev.* 28, 297-321.
- Laue, T. M., Shah, B. D., Ridgeway, T. M., Pelletier, S. L., 1992. Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In: Harding, S.E., Rowe, A.J. and Horton, J.C. (Ed.), Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 90-125.
- Leighton, J. C., Jr., Goldstein, L. J., 1995. P-glycoprotein in adult solid tumors. Expression and prognostic significance. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 9, 251-273.
- Lezama, R., Castillo, A., Ludueña, R. F., Meza, I., 2001. Over-expression of β I tubulin in MDCK cells and incorporation of exogenous β I tubulin into microtubules interferes with adhesion and spreading. *Cell Motil. Cytoskeleton* 50, 147-160.
- Li, Z., Alisaraie, L., 2015. Microtubules dual chemo and thermo-responsive depolymerization. *Proteins* 83, 970-981.
- Lobert, S., Correia, J. J., 2000. Energetics of vinca alkaloid interactions with tubulin. *Methods Enzymol.* 323, 77-103.
- Long, C. W., 1849. An account of the first use of sulphuric ether. *Southern Med. Surg. J.* 5, 705-713.
- Lowe, J., Li, H., Downing, K. H., Nogales, E., 2001. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 313, 1045-1057.
- Lowery, J., Kuczmarski, E. R., Herrmann, H., Goldman, R. D., 2015. Intermediate filaments play a pivotal role in regulating cell architecture and function. *J. Biol. Chem.*

- Lu, Y., Chen, J., Xiao, M., Li, W., Miller, D. D., 2012. An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharm. Res.* 29, 2943-2971.
- Ludueña, R. F., 2013. A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 302, 41-185.
- Ludueña, R. F., Banerjee, A., 2008. The isotypes of tubulin: distribution and functional significance. In: Fojo, A.T. (Ed.), *Cancer drug discovery and development: the role of microtubules in cell biology, neurobiology and oncology*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Luqmani, Y. A., 2005. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med. Princ. Pract.* 14 Suppl 1, 35-48.
- Macarron, R., Banks, M. N., Bojanic, D., Burns, D. J., Cirovic, D. A., Garyantes, T., Green, D. V., Hertzberg, R. P., Janzen, W. P., Paslay, J. W., Schopfer, U., Sittampalam, G. S., 2011. Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 188-195.
- Magnani, M., Maccari, G., Andreu, J. M., Díaz, J. F., Botta, M., 2009. Possible binding site for paclitaxel at microtubule pores. *FEBS J.* 276, 2701-2712.
- Manchukonda, N. K., Naik, P. K., Santoshi, S., Lopus, M., Joseph, S., Sridhar, B., Kantevari, S., 2013. Rational design, synthesis, and biological evaluation of third generation α -noscapine analogues as potent tubulin binding anti-cancer agents. *PLoS One* 8, e77970.
- Manetti, F., Forli, S., Maccari, L., Corelli, F., Botta, M., 2003. 3D QSAR studies of the interaction between β -tubulin and microtubule stabilizing antimitotic agents (MSAA). A combined pharmacophore generation and pseudoreceptor modeling approach applied to taxanes and epothilones. *Farmaco* 58, 357-361.
- Marco-Contelles, J., Soriano, E., 2011. The medicinal chemistry of hybrid-based drugs targeting multiple sites of action. *Curr. Top. Med. Chem.* 11, 2714-2715.
- Marco, J. A., Garcia-Pla, J., Carda, M., Murga, J., Falomir, E., Trigili, C., Notararigo, S., Diaz, J. F., Barasoain, I., 2011. Design and synthesis of pironetin analogues with simplified structure and study of their interactions with microtubules. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 1630-1637.
- Mariani, M., Karki, R., Spennato, M., Pandya, D., He, S., Andreoli, M., Fiedler, P., Ferlini, C., 2015. Class III beta-tubulin in normal and cancer tissues. *Gene* 563, 109-114.
- Markman, M., 2003. Managing taxane toxicities. *Support. Care Cancer* 11, 144-147.
- Matesanz, R., Barasoain, I., Yang, C., Wang, L., Li, X., de Inés, C., Coderch, C., Gago, F., Jiménez-Barbero, J., Andreu, J. M., Fang, W., Díaz, J. F., 2008. Optimization of taxane binding to microtubules. Binding affinity decomposition and incremental construction of a high-affinity analogue of paclitaxel. *Chem. Biol.* 15, 573-585.
- Matesanz, R., Rodríguez-Salarichs, J., Pera, B., Canales, Á., Andreu, J. M., Jiménez-Barbero, J., Bras, W., Nogales, A., Fang, W. S., Díaz, J. F., 2011. Modulation of microtubule interprotofilament interactions by modified taxanes. *Biophys. J.* 101, 2970-2980.
- Matesanz, R., Trigili, C., Rodríguez-Salarichs, J., Zanardi, I., Pera, B., Nogales, A., Fang, W. S., Jiménez-Barbero, J., Canales, Á., Barasoain, I., Ojima, I., Díaz, J. F., 2014. Taxanes with high potency inducing tubulin assembly overcome tumoural cell resistances. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 5078-5090.

- Mazaris, E., Tsiotras, A., 2013. Molecular pathways in prostate cancer. *Nephrourol. Mon.* 5, 792-800.
- McKean, P. G., Vaughan, S., Gull, K., 2001. The extended tubulin superfamily. *J. Cell Sci.* 114, 2723-2733.
- Menéndez, M., Rivas, G., Díaz, J. F., Andreu, J. M., 1998. Control of the structural stability of the tubulin dimer by one high affinity bound magnesium ion at nucleotide N-site. *J. Biol. Chem.* 273, 167-176.
- Mierzwa, B., Gerlich, D. W., 2014. Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control. *Dev. Cell* 31, 525-538.
- Miki, H., Okada, Y., Hirokawa, N., 2005. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol.* 15, 467-476.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J., 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* 19, 1639-1662.
- Morris, P. G., Fournier, M. N., 2008. Microtubule active agents: beyond the taxane frontier. *Clinical Cancer Research* 14, 7167-7172.
- Moudi, M., Go, R., Yien, C. Y., Nazre, M., 2013. Vinca alkaloids. *Int. J. Prev. Med.* 4, 1231-1235.
- Mukhtar, E., Adhami, V. M., Mukhtar, H., 2014. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* 13, 275-284.
- Na, G. C., Timasheff, S. N., 1980a. Stoichiometry of the vinblastine-induced self-association of calf brain tubulin. *Biochemistry* 19, 1347-1354.
- Na, G. C., Timasheff, S. N., 1980b. Thermodynamic linkage between tubulin self-association and the binding of vinblastine. *Biochemistry* 19, 1355-1365.
- Na, G. C., Timasheff, S. N., 1981. Interaction of calf brain tubulin with glycerol. *J. Mol. Biol.* 151, 165-178.
- Na, G. C., Timasheff, S. N., 1982. *In vitro* vinblastine-induced tubulin paracrystals. *J. Biol. Chem.* 257, 387-391.
- Na, G. C., Timasheff, S. N., 1986. Interaction of vinblastine with calf brain tubulin: Effects of magnesium ions. *Biochemistry* 25, 6222-6228.
- Nagle, A., Hur, W., Gray, N. S., 2006. Antimitotic agents of natural origin. *Curr. Drug Targets* 7, 305-326.
- Narishige, T., Blade, K. L., Ishibashi, Y., Nagai, T., Hamawaki, M., Menick, D. R., Kuppuswamy, D., Cooper, G., 1999. Cardiac hypertrophic and developmental regulation of the beta-tubulin multigene family. *J. Biol. Chem.* 274, 9692-9697.
- Nawrotek, A., Knossow, M., Gigant, B., 2011. The determinants that govern microtubule assembly from the atomic structure of GTP-tubulin. *J Mol Biol* 412, 35-42.
- Nepali, K., Sharma, S., Sharma, M., Bedi, P. M., Dhar, K. L., 2014. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *Eur. J. Med. Chem.* 77, 422-487.

Ngan, V. K., Bellman, K., Panda, D., Hill, B. T., Jordan, M. A., Wilson, L., 2000. Novel actions of the antitumor drugs vinflunine and vinorelbine on microtubules. *Cancer Res* 60, 5045-5051.

Ngwenya, L. B., Peters, A., Rosene, D. L., 2005. Light and electron microscopic immunohistochemical detection of bromodeoxyuridine-labeled cells in the brain: different fixation and processing protocols. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 821-832.

Nobili, S., Landini, I., Mazzei, T., Mini, E., 2012. Overcoming tumor multidrug resistance using drugs able to evade P-glycoprotein or to exploit its expression. *Med. Res. Rev.* 32, 1220-1262.

Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A., Downing, K. H., 1999. High-resolution model of the microtubule. *Cell* 96, 79-88.

Nogales, E., Wolf, S. G., Downing, K. H., 1998. Structure of the $\alpha\beta$ -tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199-203.

Oosawa, F., Asakura, S., 1975. Thermodynamics of the polymerization of protein. Academic Press, London.

Panda, D., Jordan, M. A., Chu, K. C., Wilson, L., 1996. Differential effects of vinblastine on polymerization and dynamics at opposite microtubule ends. *J. Biol. Chem.* 271, 29807-29812.

Parker, A. L., Kavallaris, M., McCarroll, J. A., 2014. Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Front. Oncol.* 4, 153.

Pauw, B. R., 2013. Everything SAXS: small-angle scattering pattern collection and correction. *J. Phys. Condens. Matter* 25, 383201.

Peñalva, M. Á., 2005. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet. Biol.* 42, 963-975.

Pera, B., Barasoain, I., Pantazopoulou, A., Canales, Á., Matesanz, R., Rodríguez-Salarichs, J., García-Fernández, L. F., Moneo, V., Jiménez-Barbero, J., Galmarini, C. M., Cuevas, C., Peñalva, M. Á., Díaz, J. F., Andreu, J. M., 2013. New interfacial microtubule inhibitors of marine origin, PM050489/PM060184, with potent antitumor activity and a distinct mechanism. *ACS Chem. Biol.* 8, 2084-2094.

Pera, B., Razzak, M., Trigili, C., Pineda, O., Canales, Á., Buey, R. M., Jiménez-Barbero, J., Northcote, P. T., Paterson, I., Barasoain, I., Díaz, J. F., 2010. Molecular recognition of peloruside A by microtubules. The C24 primary alcohol is essential for biological activity. *ChemBiochem.* 11, 1669-1678.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., Ferrin, T. E., 2004. UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 13, 1605-1612.

Philo, J. S., 2009. A critical review of methods for size characterization of non-particulate protein aggregates. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 10, 359-372.

Prakash, V., Timasheff, S. N., 1992. Aging of tubulin at neutral pH: stabilization by colchicine and its analogues. *Arch. Biochem. Biophys.* 295, 146-152.

Pratt, L. F., Cleveland, D. W., 1988. A survey of the α -tubulin gene family in chicken: unexpected sequence heterogeneity in the polypeptides encoded by five expressed genes. *EMBO J.* 7, 931-940.

- Prota, A. E., Bargsten, K., Díaz, J. F., Marsh, M., Cuevas, C., Liniger, M., Neuhaus, C., Andreu, J. M., Altmann, K. H., Steinmetz, M. O., 2014a. A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 13817-13821.
- Prota, A. E., Bargsten, K., Northcote, P. T., Marsh, M., Altmann, K. H., Miller, J. H., Díaz, J. F., Steinmetz, M. O., 2014b. Structural basis of microtubule stabilization by laulimalide and peloruside A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53, 1621-1625.
- Prota, A. E., Magiera, M. M., Kuijpers, M., Bargsten, K., Frey, D., Wieser, M., Jaussi, R., Hoogenraad, C. C., Kammerer, R. A., Janke, C., Steinmetz, M. O., 2013. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *J. Cell Biol.* 200, 259-270.
- Pryor, D. E., O'Brate, A., Bilcer, G., Díaz, J. F., Wang, Y., Kabaki, M., Jung, M. K., Andreu, J. M., Ghosh, A. K., Giannakakou, P., Hamel, E., 2002. The microtubule stabilizing agent laulimalide does not bind in the taxoid site, kills cells resistant to paclitaxel and epothilones, and may not require its epoxide moiety for activity. *Biochemistry* 41, 9109-9115.
- Quiñoá, E., Kakou, Y., Crews, P., 1988. Fijianolides, polyketide heterocycles from marine sponge. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 196, 3642-3644.
- Ralston, G., 1993. Introduction to Analytical Ultracentrifugation. Beckman Instruments, Inc, Palo Alto, CA.
- Ravelli, R. B., Gigant, B., Curmi, P. A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A., Knossow, M., 2004. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* 428, 198-202.
- Risinger, A. L., Giles, F. J., Mooberry, S. L., 2009. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat. Rev.* 35, 255-261.
- Romaniello, R., Arrigoni, F., Bassi, M. T., Borgatti, R., 2015. Mutations in α - and β -tubulin encoding genes: implications in brain malformations. *Brain Dev.* 37, 273-280.
- Rosenberg, S. M., Stanton, A. L., Petrie, K. J., Partridge, A. H., 2015. Symptoms and symptom attribution among women on endocrine therapy for breast cancer. *Oncologist*.
- Roukos, D. H., 2009. Genome-wide association studies: how predictable is a person's cancer risk? *Expert Rev Anticancer Ther* 9, 389-392.
- Roychowdhury, S., Panda, D., Wilson, L., Rasenick, M. M., 1999. G-protein α subunits activate tubulin GTPase and modulate microtubule polymerization dynamics. *J. Biol. Chem.* 274, 13485-13490.
- Sackett, D., 2008. Antimicrotubule agents that bind covalently to tubulin. In: Fojo, T. (Ed.), *The role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology*. Humana Press, pp. 281-306.
- Sakorafas, G. H., Safioleas, M., 2009. Breast cancer surgery: an historical narrative. Part I. From prehistoric times to Renaissance. *Eur. J. Cancer Care* 18, 530-544.
- Sanguineti, G., Agostinelli, S., Foppiano, F., Franzone, P., Garelli, S., Marcenaro, M., Orsatti, M., Vitale, V., 2002. Adjuvant androgen deprivation impacts late rectal toxicity after conformal radiotherapy of prostate carcinoma. *Br. J. Cancer* 86, 1843-1847.
- Schiff, P. B., Fant, J., Horwitz, S. B., 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277, 665-667.

- Schuck, P., 1998. Sedimentation analysis of noninteracting and self-associating solutes using numerical solutions to the Lamm equation. *Biophys. J.* 75, 1503-1512.
- Schuck, P., 2000. Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modeling. *Biophys. J.* 78, 1606-1619.
- Schuck, P., Demeler, B., 1999. Direct sedimentation analysis of interference optical data in analytical ultracentrifugation. *Biophys. J.* 76, 2288-2296.
- Schultz, M., Parzinger, H., Posdnjakov, D. V., Chikisheva, T. A., Schmidt-Schultz, T. H., 2007. Oldest known case of metastasizing prostate carcinoma diagnosed in the skeleton of a 2,700-year-old Scythian king from Arzhan (Siberia, Russia). *Int. J. Cancer.* 121, 2591-2595.
- Schultz, R. M., Papamatheakis, J. D., Chirigos, M. A., 1977. Interferon: an inducer of macrophage activation by polyanions. *Science* 197, 674-676.
- Schwartz, E. L., 2009. Antivasular actions of microtubule-binding drugs. *Clinical Cancer Research* 15, 2594-2601.
- Seelig, A., Landwojtowicz, E., 2000. Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers. *Eur. J. Pharm. Sci.* 12, 31-40.
- Selivanova, G., Wiman, K. G., 2007. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene* 26, 2243-2254.
- Sever, R., Brugge, J. S., 2015. Signal Transduction in Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5.
- Sharma, S., Poliks, B., Chiauzzi, C., Ravindra, R., Blanden, A. R., Bane, S., 2010. Characterization of the colchicine binding site on avian tubulin isotype β VI. *Biochemistry* 49, 2932-2942.
- Smith, C. D., Zhang, X., 1996. Mechanism of action cryptophycin. Interaction with the Vinca alkaloid domain of tubulin. *J. Biol. Chem.* 271, 6192-6198.
- Smith, G. F., Neubauer, B. L., Sundboom, J. L., Best, K. L., Goode, R. L., Tanzer, L. R., Merriman, R. L., Frank, J. D., Herrmann, R. G., 1988. Correlation of the *in vivo* anticoagulant, antithrombotic and antimetastatic efficacy of warfarin in the rat. *Thromb. Res.* 50, 163-174.
- Smith, J. A., Jordan, M. A., 2010. Determination of drug binding to microtubules *in vitro*. *Methods Cell Biol.* 95, 289-299.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Snyder, J. P., Nettles, J. H., Cornett, B., Downing, K. H., Nogales, E., 2001. The binding conformation of Taxol in β -tubulin: a model based on electron crystallographic density. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5312-5316.
- Sobell, H. M., 1985. Actinomycin and DNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 5328-5331.
- Sontag, C. A., Stafford, W. F., Correia, J. J., 2004. A comparison of weight average and direct boundary fitting of sedimentation velocity data for indefinite polymerizing systems. *Biophys. Chem.* 108, 215-230.

- Stafford, S. J., Schwimer, J., Anthony, C. T., Thomson, J. L., Wang, Y. Z., Woltering, E. A., 2005. Colchicine and 2-methoxyestradiol inhibit human angiogenesis. *J. Surg. Res.* 125, 104-108.
- Stafford, W. F., Sherwood, P. J., 2004. Analysis of heterologous interacting systems by sedimentation velocity: curve fitting algorithms for estimation of sedimentation coefficients, equilibrium and kinetic constants. *Biophys. Chem.* 108, 231-243.
- Stanchi, F., Corso, V., Scannapieco, P., Ievolella, C., Negrisolo, E., Tiso, N., Lanfranchi, G., Valle, G., 2000. TUBA8: a new tissue-specific isoform of α -tubulin that is highly conserved in human and mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 1111-1118.
- Stanton, R. A., Gernert, K. M., Nettles, J. H., Aneja, R., 2011. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med. Res. Rev.* 31, 443-481.
- Steinmetz, M. O., 2007. Structure and thermodynamics of the tubulin-stathmin interaction. *J. Struct. Biol.* 158, 137-147.
- Steinmetz, M. O., Kammerer, R. A., Jahnke, W., Goldie, K. N., Lustig, A., van Oostrum, J., 2000. Op18/stathmin caps a kinked protofilament-like tubulin tetramer. *EMBO J.* 19, 572-580.
- Stevenson, H. C., Green, I., Hamilton, J. M., Calabro, B. A., Parkinson, D. R., 1991. Levamisole: known effects on the immune system, clinical results, and future applications to the treatment of cancer. *J. Clin. Oncol.* 9, 2052-2066.
- Stewart, M., 1988. Computer image processing of electron micrographs of biological structures with helical symmetry. *J. Electron. Microsc. Tech.* 9, 325-358.
- Sutlief, S. G., 2015. Protection and measurement in radiation therapy. *Health Phys.* 108, 224-241.
- Svergun, D., Barberato, C., Koch, M. H. J., 1995. CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J. Appl. Crystallogr.* 28, 768-773.
- Szymanski, P., Markowicz, M., Mikiciuk-Olasik, E., 2012. Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 427-452.
- Takahashi, S., Ito, Y., Hatake, K., Sugimoto, Y., 2006. Gene therapy for breast cancer. - Review of clinical gene therapy trials for breast cancer and MDR1 gene therapy trial in Cancer Institute Hospital. *Breast Cancer* 13, 8-15.
- Tang, C., Wang, X., Soh, H., Seyedin, S., Cortez, M. A., Krishnan, S., Massarelli, E., Hong, D., Naing, A., Diab, A., Gómez, D., Ye, H., Heymach, J., Komaki, R., Allison, J. P., Sharma, P., Welsh, J. W., 2014. Combining radiation and immunotherapy: a new systemic therapy for solid tumors? *Cancer Immunol. Res.* 2, 831-838.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A., 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* 65, 87-108.
- Uppuluri, S., Knipling, L., Sackett, D. L., Wolff, J., 1993. Localization of the colchicine-binding site of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 11598-11602.
- Usui, T., Watanabe, H., Nakayama, H., Tada, Y., Kanoh, N., Kondoh, M., Asao, T., Takio, K., Nishikawa, K., Kitahara, T., Osada, H., 2004. The anticancer natural product pironetin selectively targets Lys352 of α -tubulin. *Chem. Biol.* 11, 799-806.

Uzdensky, A., Kristiansen, B., Moan, J., Juzeniene, A., 2012. Dynamics of signaling, cytoskeleton and cell cycle regulation proteins in glioblastoma cells after sub-lethal photodynamic treatment: antibody microarray study. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 795-803.

Valero, T., 2014. Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches. *Curr. Pharm. Des.* 20, 5507-5509.

Venghateri, J. B., Jindal, B., Panda, D., 2015. The centrosome: a prospective entrant in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets*, 1-16.

Vindya, N. G., Sharma, N., Yadav, M., Ethiraj, K. R., 2015. Tubulins - the target for anticancer therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 15, 73-82.

Vosika, G. J., 1983. Clinical immunotherapy trials of bacterial components derived from *Mycobacteria* and *Nocardia*. *J. Biol. Response Mod.* 2, 321-342.

Wade, R. H., Hyman, A. A., 1997. Microtubule structure and dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 12-17.

Wagstaff, J. L., Taylor, S. L., Howard, M. J., 2013. Recent developments and applications of saturation transfer difference nuclear magnetic resonance (STD NMR) spectroscopy. *Mol. Biosyst.* 9, 571-577.

Walss, C., Kreisberg, J. I., Ludueña, R. F., 1999. Presence of the β II isotype of tubulin in the nuclei of cultured mesangial cells from rat kidney. *Cell Motil. Cytoskeleton* 42, 274-284.

Wilkins, D. K., Mayer, A., 2006. Development of antibodies for cancer therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 6, 787-796.

Wilson, L., Panda, D., Jordan, M. A., 1999. Modulation of microtubule dynamics by drugs: a paradigm for the actions of cellular regulators. *Cell Struct. Funct.* 24, 329-335.

Wolf, C., Koumanov, K., Tenchov, B., Quinn, P. J., 2001. Cholesterol favors phase separation of sphingomyelin. *Biophys. Chem.* 89, 163-172.

Wolff, J., 1989. The science of cancerous disease from earliest times to the present (resources in medical history). Science History Pubns, Canton, MA.

Wolff, J. M., Mason, M., 2012. Drivers for change in the management of prostate cancer: guidelines and new treatment techniques. *BJU Int.* 109 Suppl 6, 33-41.

Yeh, I. T., Ludueña, R. F., 2004. The β II isotype of tubulin is present in the cell nuclei of a variety of cancers. *Cell Motil. Cytoskeleton* 57, 96-106.

Yi, J. M., Kim, T. O., 2015. Epigenetic alterations in inflammatory bowel disease and cancer. *Intest. Res.* 13, 112-121.

Yoshida, M., Matsui, Y., Ikarashi, Y., Usui, T., Osada, H., Wakasugi, H., 2007. Antiproliferating activity of the mitotic inhibitor pironetin against vindesine- and paclitaxel-resistant human small cell lung cancer H69 cells. *Anticancer Res.* 27, 729-736.

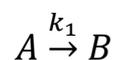
Zona, S., Bella, L., Burton, M. J., Nestal de Moraes, G., Lam, E. W., 2014. FOXM1: an emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 1316-1322.

Anexo 1

Estudios de cinética química

El curso de tiempo de unión de un ligando a su diana puede ser ajustado de acuerdo a la ecuación 21, para obtener una constante cinética que describe el proceso de unión. Al determinar una serie de constantes cinéticas de este modo, a partir de diferentes concentraciones de ligando, y representarlas frente a la concentración de ligando libre, se obtiene un conjunto de puntos. Dichos puntos pueden ser ajustados, entonces, de acuerdo a diferentes modelos matemáticos, en función del sistema considerado.

Sistema de orden 1:

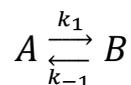


$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A]; \quad \int_{A_0}^A \frac{d[A]}{[A]} = - \int_{t_0}^t k_1 dt; \quad \ln[A] - \ln[A]_0 = -k_1 t$$

$$\ln \frac{[A]}{[A]_0} = -k_1 t; \quad \frac{[A]}{[A]_0} = e^{-k_1 t}; \quad [A] = [A]_0 e^{-k_1 t}$$

En este caso, todas las constantes cinéticas calculadas a diferentes concentraciones de ligando son idénticas entre sí e iguales a la real.

Sistema de orden 1 reversible:



$$\frac{d[A]}{dt} = -k_1[A] + k_{-1}[B]; \quad [A] = [A]_{ss} + \Delta[A]; \quad [B] = [B]_{ss} + \Delta[B]$$

Siendo $[A]_{ss}$ y $[B]_{ss}$ las concentraciones en el **estado estacionario** (estado de equilibrio en el que la velocidad de formación de reactivo es idéntica a la velocidad de formación de producto) y $\Delta[A]$ y $\Delta[B]$ la variación de la concentración en un diferencial de tiempo.

$$\frac{d(\Delta[A])}{dt} = -k_1([A]_{ss} + \Delta[A]) + k_{-1}([B]_{ss} + \Delta[B])$$

$$\frac{d(\Delta[A])}{dt} = -k_1[A]_{ss} - k_1\Delta[A] + k_{-1}[B]_{ss} + k_{-1}\Delta[B]$$

- De acuerdo al balance de masas de la reacción: $\Delta[A] = -\Delta[B]$.
- En el estado de equilibrio: $k_1[A]_{ss} = k_{-1}[B]_{ss}$.

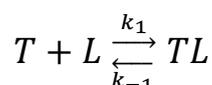
$$\frac{d(\Delta[A])}{dt} = -k_1[A]_{ss} - k_1\Delta[A] + k_{-1}[B]_{ss} - k_{-1}\Delta[A]$$

$$\frac{d(\Delta[A])}{dt} = -k_1\Delta[A] - k_{-1}\Delta[A]; \quad \frac{d(\Delta[A])}{dt} = -\Delta[A](k_1 + k_{-1})$$

$$\int_{A_0}^A \frac{d(\Delta[A])}{\Delta[A]} = \int_{t_0}^t -(k_1 + k_{-1})dt; \quad [A] = [A]_0 e^{-(k_1+k_{-1})t}$$

En este caso, todas las constantes cinéticas calculadas a diferentes concentraciones de ligando son idénticas entre sí e iguales a: $(k_1 + k_{-1})$.

Reacción entre la tubulina (T) y un ligando (L) en un paso, para formar un complejo (TL):



$$\frac{d[T]}{dt} = -k_1[T][L] + k_{-1}[TL]$$

$$\frac{d(\Delta[T])}{dt} = -k_1([T]_{ss} + \Delta[T])([L]_{ss} + \Delta[L]) + k_{-1}([TL]_{ss} + \Delta[TL])$$

$$\frac{d(\Delta[T])}{dt} = -k_1[T]_{ss}[L]_{ss} - k_1[T]_{ss}\Delta[L] - k_1\Delta[T][L]_{ss} - k_1\Delta[T]\Delta[L] + k_{-1}[TL]_{ss} + k_{-1}\Delta[TL]$$

- Dos diferenciales multiplicados se cancelan.
- De acuerdo al balance de masas de la reacción: $\Delta[T] = \Delta[L] = -\Delta[TL]$.
- En el estado de equilibrio: $k_1[T]_{ss}[L]_{ss} = k_{-1}[TL]_{ss}$.

$$\frac{d(\Delta[T])}{dt} = -k_1[T]_{ss}[L]_{ss} - k_1[T]_{ss}\Delta[L] - k_1\Delta[T][L]_{ss} + k_{-1}[TL]_{ss} + k_{-1}\Delta[TL]$$

A continuación, se expresan todos los diferenciales en función de $\Delta[TL]$.

$$\frac{d(\Delta[TL])}{dt} = k_1[T]_{ss}[L]_{ss} + k_1[T]_{ss}\Delta[L] + k_1\Delta[T][L]_{ss} - k_{-1}[TL]_{ss} - k_{-1}\Delta[TL]$$

$$\frac{d(\Delta[TL])}{dt} = k_1[T]_{ss}[L]_{ss} - k_1[T]_{ss}\Delta[TL] - k_1\Delta[TL][L]_{ss} - k_{-1}[TL]_{ss} - k_{-1}\Delta[TL]$$

El primer término y el cuarto a la derecha de la igualdad son iguales en el equilibrio.

$$\frac{d(\Delta[TL])}{dt} = -k_1[T]_{ss}\Delta[TL] - k_1\Delta[TL][L]_{ss} - k_{-1}\Delta[TL]$$

$$\frac{d(\Delta[TL])}{dt} = -k_1([T]_{ss}\Delta[TL] + \Delta[TL][L]_{ss}) - k_{-1}\Delta[TL]$$

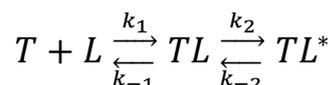
$$\frac{d(\Delta[TL])}{dt} = -\Delta[TL][k_1([T]_{ss} + [L]_{ss}) + k_{-1}]$$

$$\frac{d(\Delta[TL])}{\Delta[TL]} = -[k_1([T]_{ss} + [L]_{ss}) + k_{-1}]dt$$

En este caso, cada uno de los cursos de tiempo obtenidos a partir de diferentes concentraciones de ligando, se ajustan a un modelo matemático, cuya constante es igual a $[k_1([T]_{ss} + [L]_{ss}) + k_{-1}]$. Al representar todas las constantes observadas frente a la concentración de ligando libre, el conjunto de puntos obtenido se ajusta a una recta, cuya pendiente es igual a $k_1([T]_{ss} + [L]_{ss})$ y la intersección con el eje de abscisas, igual a k_{-1} . En aquellos casos en los que la concentración de ligando es mucho más grande que la concentración de tubulina ($[L]_{ss} \gg [T]_{ss}$), se considera que la concentración de

ligando libre es constante ($[T]_{ss} + [L]_{ss} = [L]_{ss}$) e igual a la concentración de ligando total. De este modo, el sistema bimolecular descrito en este apartado es clasificado como un sistema de pseudo-primer orden, en el que la constante cinética determinada a partir de cada curso de tiempo es igual a: $(k_1[L]_{ss} + k_{-1})$.

Reacción entre la tubulina y un ligando en dos pasos:



$$\frac{d[T]}{dt} = -k_1[T][L] + k_{-1}[TL]$$

$$\frac{d[TL]}{dt} = k_1[T][L] + k_{-2}[TL^*] - k_{-1}[TL] - k_2[TL]$$

$$\frac{d[TL^*]}{dt} = k_2[TL] - k_{-2}[TL^*]$$

Al sumar $\frac{d[T]}{dt} + \frac{d[TL]}{dt}$, se observa que el resultado es igual a $-\frac{d[TL^*]}{dt}$. De este modo, se puede concluir que, en el equilibrio: $\Delta[T] + \Delta[TL] = -\Delta[TL^*]$.

$$\frac{d(\Delta[TL^*])}{dt} = k_2([TL]_{ss} + \Delta[TL]) - k_{-2}([TL^*]_{ss} + \Delta[TL^*])$$

$$\frac{d(\Delta[TL^*])}{dt} = k_2[TL]_{ss} + k_2\Delta[TL] - k_{-2}[TL^*]_{ss} - k_{-2}\Delta[TL^*]$$

- En el estado de equilibrio: $k_2[TL]_{ss} = k_{-2}[TL^*]_{ss}$, por lo que el primer término y el tercero a la derecha de la igualdad son idénticos y se cancelan mutuamente.

$$\frac{d(\Delta[TL^*])}{dt} = k_2\Delta[TL] - k_{-2}\Delta[TL^*]$$

A continuación, se vuelve al primer equilibrio.

$$K_1 = \frac{[TL]}{[T][L]} = \frac{[TL]_{ss}}{[T]_{ss}[L]_{ss}} = \frac{([TL]_{ss} + \Delta[TL])}{([T]_{ss} + \Delta[T])([L]_{ss} + \Delta[L])}$$

$$K_1([T]_{ss} + \Delta[T])([L]_{ss} + \Delta[L]) = ([TL]_{ss} + \Delta[TL])$$

$$K_1[T]_{ss}[L]_{ss} + K_1[T]_{ss}\Delta[L] + K_1\Delta[T][L]_{ss} + K_1\Delta[T]\Delta[L] = [TL]_{ss} + \Delta[TL]$$

- Dos diferenciales multiplicados se cancelan.
- A partir de la expresión inicial de K_1 , se obtiene que: $[TL]_{ss} = K_1[T]_{ss}[L]_{ss}$.

$$[TL]_{ss} + K_1[T]_{ss}\Delta[L] + K_1\Delta[T][L]_{ss} = [TL]_{ss} + \Delta[TL]$$

El primer término en cada lado de la igualdad es igual, por lo que se cancelan.

$$K_1[T]_{ss}\Delta[L] + K_1\Delta[T][L]_{ss} = \Delta[TL]; \quad K_1([T]_{ss}\Delta[L] + \Delta[T][L]_{ss}) = \Delta[TL]$$

- Del mismo modo que en el caso anterior: $\Delta[L] = \Delta[T]$.

$$K_1\Delta[T]([T]_{ss} + [L]_{ss}) = \Delta[TL]$$

Dado que $\Delta[T] + \Delta[TL] = -\Delta[TL^*]$, se concluye que $\Delta[T] = -\Delta[TL] - \Delta[TL^*]$.

$$K_1(-\Delta[TL] - \Delta[TL^*])([T]_{ss} + [L]_{ss}) = \Delta[TL]$$

$$-K_1\Delta[TL]([T]_{ss} + [L]_{ss}) - K_1\Delta[TL^*]([T]_{ss} + [L]_{ss}) = \Delta[TL]$$

$$-K_1\Delta[TL^*]([T]_{ss} + [L]_{ss}) = \Delta[TL] + K_1\Delta[TL]([T]_{ss} + [L]_{ss})$$

$$-K_1\Delta[TL^*]([T]_{ss} + [L]_{ss}) = \Delta[TL](1 + K_1([T]_{ss} + [L]_{ss}))$$

$$\left[\frac{-K_1\Delta[TL^*]([T]_{ss} + [L]_{ss})}{(1 + K_1([T]_{ss} + [L]_{ss}))} \right] = \Delta[TL]$$

Como anteriormente se dedujo que $\frac{d(\Delta[TL^*])}{dt} = k_2\Delta[TL] - k_{-2}\Delta[TL^*]$:

$$\frac{d(\Delta[TL^*])}{dt} = k_2 \left[\frac{-K_1\Delta[TL^*]([T]_{ss} + [L]_{ss})}{(1 + K_1([T]_{ss} + [L]_{ss}))} \right] - k_{-2}\Delta[TL^*]$$

$$\frac{d(\Delta[TL^*])}{dt} = -\Delta[TL^*] \left(k_2 \left[\frac{-K_1([T]_{ss} + [L]_{ss})}{(1 + K_1([T]_{ss} + [L]_{ss}))} \right] + k_{-2} \right)$$

$$\frac{d(\Delta[TL^*])}{\Delta[TL^*]} = - \left(\frac{K_1 k_2 ([T]_{ss} + [L]_{ss})}{1 + K_1 ([T]_{ss} + [L]_{ss})} + k_{-2} \right) dt$$

La constante cinética observada en este sistema es igual a: $\left(\frac{K_1 k_2 ([T]_{ss} + [L]_{ss})}{1 + K_1 ([T]_{ss} + [L]_{ss})} + k_{-2} \right)$.

Si $[L]_{ss} \gg [T]_{ss}$, la constante cinética observada es igual a: $\left(\frac{K_1 k_2 [L]_{ss}}{1 + K_1 [L]_{ss}} + k_{-2} \right)$.

Anexo 2

Estudios de asociación por velocidad de sedimentación

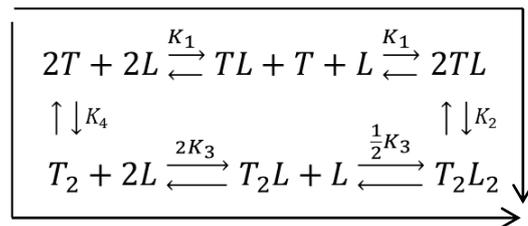
A partir de una serie de experimentos de velocidad de sedimentación es posible determinar las constantes de unión de un ligando a su proteína diana, siempre que se cumplan dos condiciones: que el compuesto estudiado induzca la oligomerización de su proteína diana y que dicha oligomerización presente un **carácter isodésmico** (en el que la constante de autoasociación de la proteína, en un paso de oligomerización, es igual a la de cualquier otro paso).

La distribución de coeficientes de sedimentación obtenida para cada muestra permite estimar la concentración de cada especie oligomérica, en el equilibrio, y el coeficiente de sedimentación promedio. Dado que dicho coeficiente de sedimentación promedio es dependiente de la constante de afinidad global del sistema, es posible obtener el coeficiente promedio teórico para cada constante considerada. El valor empírico de la constante puede ser aproximado, si se compara el coeficiente promedio teórico con el coeficiente promedio experimental.

La constante de afinidad obtenida de esta manera es un valor aparente, dado que es dependiente de la concentración de ligando empleada. No obstante, al determinar dicha constante de afinidad aparente para diversas concentraciones de ligando y representarlas frente a la concentración de ligando libre, el conjunto de puntos obtenidos puede ser ajustado para calcular la constante real. Existen tres modelos matemáticos que se ajustan y la elección del apropiado depende del camino de reacción considerado.

Sistema general:

Camino de reacción mediado por ligando



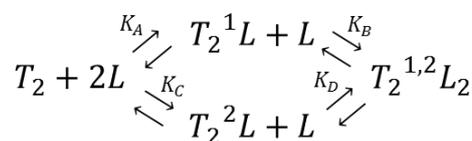
Camino de reacción facilitado por ligando

Siendo K_1 la constante de unión del ligando (L) a la tubulina (T) libre, K_2 la constante de asociación de la tubulina unida al ligando, K_3 la constante de unión del ligando a la tubulina ensamblada y K_4 la constante de asociación de la tubulina libre.

En el sistema general, se representa un solo paso de polimerización en el que dos dímeros de tubulina se unen para formar un tetrámero, en presencia de un ligando. Al tratarse de un sistema isodésmico, todos los demás pasos de polimerización que tengan lugar, ocurren con la misma afinidad que el primero, por lo que al describir uno, se describe el sistema completo.

No obstante, dado que en las condiciones reales los oligómeros formados son más grandes que un tetrámero, el número de sitios completos del dominio de vinca por dímero tiende a uno (tiende a dos por cada tetrámero). Por este motivo, se considera que en el sistema representado, la unión del ligando a la tubulina ensamblada puede ocurrir en cualquiera de los dos sitios de unión disponibles en el tetrámero considerado, con la misma afinidad. Así pues, es necesario distinguir entre los dos sitios.

Unión detallada del ligando a la tubulina ensamblada:

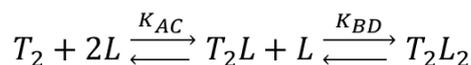


$$K_A = \frac{[T_2^1L]}{[T_2][L]}, \quad K_B = \frac{[T_2^{1,2}L_2]}{[T_2^1L][L]}, \quad K_C = \frac{[T_2^2L]}{[T_2][L]}, \quad K_D = \frac{[T_2^{1,2}L_2]}{[T_2^2L][L]}$$

Se considera que el sistema estudiado es invariable, por lo que la unión en un sitio no afecta a la unión en el otro. De este modo: $K_A = K_D$ y $K_B = K_C$.

Además, como los dos sitios son idénticos, se concluye que: $K_A = K_C$ y $K_B = K_D$.

Así pues, las cuatro constantes son iguales entre sí y equivalentes a K_3 .



$$[T_2L] = [T_2^1L] + [T_2^2L]$$

$$K_{AC} = \frac{[T_2L]}{[T_2][L]} = \frac{([T_2^1L] + [T_2^2L])}{[T_2][L]} = \frac{[T_2^1L]}{[T_2][L]} + \frac{[T_2^2L]}{[T_2][L]} = K_A + K_C = 2K_3$$

$$K_{BD} = \frac{[T_2L_2]}{[T_2L][L]} = \frac{[T_2L_2]}{([T_2^1L] + [T_2^2L])[L]}$$

$$K_{AC}K_{BD} = \frac{([T_2^1L] + [T_2^2L])}{[T_2][L]} \cdot \frac{[T_2L_2]}{([T_2^1L] + [T_2^2L])[L]} = \frac{[T_2L_2]}{[T_2][L]^2}$$

$$K_AK_B = \frac{[T_2^1L]}{[T_2][L]} \cdot \frac{[T_2L_2]}{[T_2^1L][L]} = \frac{[T_2L_2]}{[T_2][L]^2} = K_{AC}K_{BD}$$

$$K_CK_D = \frac{[T_2^2L]}{[T_2][L]} \cdot \frac{[T_2L_2]}{[T_2^2L][L]} = \frac{[T_2L_2]}{[T_2][L]^2} = K_{AC}K_{BD}$$

Como $K_A = K_B = K_C = K_D = K_3$, se concluye que: $K_{AC}K_{BD} = K_3K_3 = K_3^2$.

$$K_3^2 = K_{AC}K_{BD} = (2K_3)K_{BD}; \quad K_{BD} = \frac{K_3^2}{2K_3} = \frac{1}{2}K_3$$

A continuación, se vuelve al sistema general, en el que se representan K_1 , K_2 , K_3 y K_4 .

$$K_1 = \frac{[TL]}{[T][L]}; \quad [TL] = K_1[T][L]$$

$$K_2 = \frac{[T_2L_2]}{[TL]^2}; \quad [T_2L_2] = K_2[TL]^2$$

$$2K_3 = \frac{[T_2L]}{[T_2][L]}; \quad [T_2L] = 2K_3[T_2][L]$$

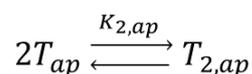
$$\frac{1}{2}K_3 = \frac{[T_2L_2]}{[T_2L][L]}; \quad [T_2L_2] = \frac{K_3[T_2L][L]}{2} = \frac{K_3(2K_3[T_2][L])[L]}{2} = K_3^2[T_2][L]^2$$

$$K_4 = \frac{[T_2]}{[T]^2}; \quad [T_2] = K_4[T]^2$$

A partir del valor de $[T_2]$ determinado en función de K_4 , es posible desarrollar el término anterior de $[T_2L_2]$ y expresarlo en función de $[T]$ y $[L]$.

$$[T_2L_2] = K_3^2[T_2][L]^2 = K_3^2(K_4[T]^2)[L]^2$$

Estos ensayos de velocidad de sedimentación informan sobre cómo varía la abundancia de cada especie oligomérica, en función de la concentración de tubulina. Es decir, dichos experimentos miden el ensamblaje de la tubulina y cómo dicho proceso se ve alterado por la unión de un ligando, K_2 , pero en cambio, no se aprecia la unión del ligando en sí misma. Por este motivo, el valor obtenido equivale a una constante de autoasociación de tubulina aparente, que es igual al cociente entre la concentración de tubulina ensamblada y el cuadrado de la concentración de tubulina libre, de acuerdo al sistema simplificado siguiente.



Camino de reacción mediado por ligando:

Si se considera que el ligando objeto de estudio sólo es capaz de unirse al dímero de tubulina, la constante aparente calculada se ve modulada únicamente por K_1 y K_2 .

$$K_{2,ap} = \frac{[Tubulina\ ensamblada]}{[Tubulina\ libre]^2} = \frac{[T_2L_2]}{[T] + [TL]}^2$$

$$K_{2,ap} = \frac{(K_2[TL]^2)}{[T] + [TL]}^2 = \frac{K_2(K_1[T][L])^2}{[T] + (K_1[T][L])^2} = \frac{K_2(K_1[T][L])^2}{\left[\left(\frac{1}{K_1[L]}\right) + 1\right]^2 (K_1[T][L])^2}$$

$$K_{2,ap} = \frac{K_2}{\left[1 + \left(\frac{1}{K_1[L]}\right)\right]^2}$$

Camino de reacción facilitado por ligando:

Si se considera que el ligando objeto de estudio sólo es capaz de unirse a la tubulina ensamblada, la constante aparente calculada se ve modulada únicamente por K_3 y K_4 .

$$K_{2,ap} = \frac{[Tubulina\ ensamblada]}{[Tubulina\ libre]^2} = \frac{[T_2] + [T_2L] + [T_2L_2]}{[T]^2}$$

$$K_{2,ap} = \frac{(K_4[T]^2) + (2K_3(K_4[T]^2)[L]) + (K_3^2(K_4[T]^2)[L]^2)}{[T]^2}$$

$$K_{2,ap} = \frac{(K_4[T]^2)(1 + 2K_3[L] + K_3^2[L]^2)}{[T]^2}$$

$$K_{2,ap} = K_4(1 + 2K_3[L] + K_3^2[L]^2)$$

Camino de reacción mixto:

Si se contempla al mismo tiempo, el aporte del camino mediado y el del camino facilitado, la constante aparente calculada es expresada en función de K_1 , K_2 , K_3 y K_4 .

$$K_{2,ap} = \frac{[Tubulina\ ensamblada]}{[Tubulina\ libre]^2} = \frac{[T_2] + [T_2L] + [T_2L_2]}{[T] + [TL]}^2$$

$$K_{2,ap} = \frac{(K_4[T]^2) + (2K_3(K_4[T]^2)[L]) + (K_3^2(K_4[T]^2)[L]^2)}{[T] + (K_1[T][L])}^2$$

$$K_{2,ap} = \frac{(K_4[T]^2)(1 + 2K_3[L] + K_3^2[L]^2)}{[T]^2[1 + (K_1[L])]^2}$$

$$K_{2,ap} = \frac{K_4(1 + 2K_3[L] + K_3^2[L]^2)}{[1 + (K_1[L])]^2}$$

