

María Arruebo Muño

Identificación de compuestos  
bioactivos dirigidos frente a  
NUPR1, una proteína  
intrínsecamente desordenada  
implicada en el adenocarcinoma  
pancreático

Director/es

Abián Franco, Olga María  
Lanas Arbeloa, Ángel

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

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS  
DIRIGIDOS FRENTE A NUPR1, UNA PROTEÍNA  
INTRÍNSECAMENTE DESORDENADA IMPLICADA  
EN EL ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO

Autor

María Arruebo Muñio

Director/es

Abián Franco, Olga María  
Lanas Arbeloa, Ángel

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Medicina

2023



## Tesis Doctoral

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS  
DIRIGIDOS FRENTE A NUPR1, UNA PROTEÍNA  
INTRÍNSECAMENTE DESORDENADA IMPLICADA EN  
EL ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO

Autora

MARÍA ARRUEBO MUÑO

Director/es

Olga Abian Franco  
Ángel Lanas Arbeloa

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA  
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado de Medicina

Año 2023

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS  
DIRIGIDOS FRENTE A NUPR1, UNA PROTEÍNA  
INTRÍNSECAMENTE DESORDENADA IMPLICADA EN  
EL ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO

Memoria presentada por:

**MARÍA ARRUEBO MUÑO**

Licenciada en Bioquímica

Para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza



**Universidad  
Zaragoza**

D<sup>a</sup>. Olga Abian Franco, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Autónoma de Madrid y Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, y D. Ángel Lanas Arbeola, Jefe del Servicio de Digestivo del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa (Zaragoza) y Catedrático en el Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología en Medicina.

**Certifican:**

Que Doña María Arruebo Muñío, Licenciada en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección la Tesis Doctoral titulada **“Identificación de compuestos bioactivos dirigidos frente a NUPR1, una proteína intrínsecamente desordenada implicada en el adenocarcinoma pancreático”** y que dicho trabajo reúne a nuestro juicio, originalidad, evidencia científica, calidad y méritos académicos suficientes para ser presentado como Memoria para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Y para que conste, firman el presente Certificado en Zaragoza a 13 de Enero de 2023

Fdo.: Olga M<sup>a</sup> Abian Franco

Fdo.: Ángel Lanas Arbeola



A mis peques Naia e Izan

A Iván

¡Y muy especialmente a ti, papá!

## **AGRADECIMIENTOS**

Recuerdo con cariño el tiempo pasado en el laboratorio con la colaboración de mucha gente sin la que este trabajo no hubiera sido posible. Por todo ello y para todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

A mis directores de tesis, el Dr. Ángel Lanas y la Dra. Olga Abian por haber compartido conmigo tanto su conocimiento como su entusiasmo por el trabajo. A Ángel por haber confiado en mi para entrar a formar parte de este maravilloso mundo de la investigación. A Olga por enseñarme con dedicación y el esfuerzo todo lo necesario para trabajar en un laboratorio de investigación y hacerme partícipe de su equipo. También por ese “empuje” y ver siempre posible el que este trabajo de tesis vea finalmente la luz.

Al Dr. Juan Iovanna, por acogerme en su laboratorio de Marsella haciéndome sentir una más del equipo y compartir sus grandes ideas de investigación conmigo. Al Dr. José Luis Neira, por su colaboración con este proyecto, y su interés máximo por cualquier idea nueva que se pudiera expresar. Al Dr. Bruto Rizzuti, por sus interesantes aportaciones a los estudios computacionales.

Al Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), por prestarme sus instalaciones para la realización de este trabajo. A Adrián por sus ingeniosas aportaciones científicas a cualquier cuestión que pudiera surgir, y a Sonia, por enseñarme todos los entresijos del laboratorio. Al resto del equipo “BIFI” con quien tuve la suerte de coincidir, muchas gracias por el buen ambiente de trabajo que viví allí.

A mis compañeros o mejor dicho amigos del HCU Lozano Blesa que, aunque no implicados directamente en esta tesis, han participado dándome ánimos y consejos para su realización.

A todos mis amigos y familiares, que siempre me han apoyado, aunque a veces no lo comprendan muy bien. A mi padre, al que le encantaría estar aquí para darme un fuerte

abrazo, pero que desde donde esté sé que estará orgulloso de mi. Ojalá lo pudiéramos compartir...A mi hermano "mayor", al que recurro siempre porque sé que siempre está y estará ahí, gracias tatuko. A mi madre, por pensar que soy la mejor y ayudarme para conseguir mis metas. A mis pequeños Naia e Izan, por ser la brújula de mi vida y la alegría de mi casa, mil gracias por ese tiempo que os he robado para la realización de este proyecto. Y, por último, pero no menos importante, a Iván, por estar ahí siempre, por su optimismo, comprensión y apoyo incondicional ante cualquier meta que me proponga. Sin su apoyo, ni este trabajo ni otros, habrían llegado nunca a su fin.

A todos, muchas gracias



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>8</b>
<b>1. CÁNCER DE PÁNCREAS: ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS</b> .....	<b>9</b>
1.1. Genética del adenocarcinoma ductal de páncreas.....	11
1.2. Diagnóstico y tratamiento del adenocarcinoma ductal de páncreas: .....	14
<b>2. DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS</b> .....	<b>16</b>
2.2 Búsqueda de dianas terapéuticas .....	16
2.2. Búsqueda de ligandos: High-Throughput Screening (HTS) y métodos computacionales de dinámica molecular.....	17
<b>3. PROTEÍNAS INTRINSECAMENTE DESESTRUCTURADAS (IDPs: <i>Intrinsically Disordered Proteins</i>) COMO POSIBLES DIANAS TERAPÉUTICAS</b> .....	<b>22</b>
<b>4. PROTEÍNA NUPR1 COMO DIANA TERAPEÚTICA</b> .....	<b>28</b>
4.1 Identificación de la proteína NUPR1.....	28
4.2 Estructura y características de la proteína NUPR1:.....	31
4.3 Regulación de la expresión de la proteína NUPR1.....	35
4.3 Funciones de la proteína NUPR1 .....	36
<b>HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
<b>MATERIALES Y METODOS GENERALES</b> .....	<b>46</b>
<b>1. CULTIVOS CELULARES</b> .....	<b>46</b>
1.1 Mantenimiento de los cultivos celulares.....	46
1.2 Tripsinización .....	47
1.3 Determinación del número de células y su viabilidad.....	47
1.4. Congelación/descongelación de las líneas celulares.....	48
1.5 Detección de micoplasmas en los cultivos celulares mediante ensayo enzimático.	48
<b>2. MODELOS ANIMALES</b> .....	<b>49</b>
<b>3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b> .....	<b>49</b>
3.1 Expresión de la proteína y purificación .....	49
3.2 Transfección de las células MiaPaca2 .....	49
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
<b>1 CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO (<i>HIGH-THROUGHPUT SCREENING: HTS</i>)</b> .....	<b>52</b>
<b>2 CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LA INTERACCIÓN NUPR1-COMPUESTO</b> .....	<b>55</b>
2.1 CALORIMETRÍA ISOTERMICA DE TITULACIÓN ( <i>Isothermal Titration Calorimetry: ITC</i> ).....	55
2.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA ( <i>Fluorescence Spectroscopy: FS</i> ). 60	

2.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ( <i>Nuclear Magnetic Resonance: RMN</i> )	62
2.4 MÉTODOS DE SIMULACIÓN COMPUTACIONALES	64
3. ESTUDIOS “IN VITRO” CON CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS HUMANAS	66
3.1 ENSAYO DE LIGACIÓN POR PROXIMIDAD <i>IN SITU</i> (PLA: <i>PROXIMITY LIGATION ASSAY</i> )	66
3.2 ESTUDIOS CELULARES DE LAS CÉLULAS MiaPaca2 TRATADAS CON LOS COMPUESTOS	68
3.2.1 ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR	68
3.2.2 ESTUDIOS CELULARES A TIEMPO REAL: iCELLigence assays	71
3.2.3 ESTUDIOS DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS ( <i>Wound Healing Assay</i> )	71
3.2.4 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE COLONIAS EN SOFT AGAR	72
4. EXPERIMENTOS “IN VIVO” EN ANIMALES MODELO	74
<b>RESULTADOS</b>	<b>75</b>
1 CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO (HTS): IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES LIGANDOS DE LA PROTEÍNA NUPR1	76
2. CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DEL COMPLEJO FORMADO POR LA PROTEÍNA NUPR1 Y LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS	84
2.1 CALORIMETRÍA ISOTÉRMICA DE TITULACIÓN (ITC): CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE LOS COMPLEJOS NUPR1-COMPUESTO	85
2.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA (SF): ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DEL ENTORNO DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS DE NUPR1 TRAS LA INTERACCIÓN CON LOS COMPUESTOS	90
2.3 RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN): ESTUDIO DE LOS RESIDUOS DE NUPR1 IMPLICADOS EN LA INTERACCIÓN CON LOS COMPUESTOS	94
2.4 METODOS COMPUTACIONALES: DINÁMICA MOLECULAR Y ACOPLAMIENTO (DOCKING) MOLECULAR	98
3. ESTUDIOS “ <i>IN VITRO</i> ” CON CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS HUMANAS	108
3.1 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN NUPR1-LIGANDO A NIVEL INTRACELULAR: ENSAYO DE LIGACIÓN POR PROXIMIDAD <i>IN SITU</i> (PLA: <i>PROXIMITY LIGATION ASSAY</i> )	109
3.2 ESTUDIOS CELULARES: EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS TUMORALES CON LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS	113
3.2.1 ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR	114
3.2.2 ESTUDIOS CELULARES A TIEMPO REAL: iCELLigence assays	125
3.2.3 ESTUDIOS DE CICATRIZACIÓN HERIDAS ( <i>Wound Healing Assay</i> )	127
3.2.4 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE COLONIAS EN SOFT AGAR	132

4. EXPERIMENTOS “IN VIVO” EN ANIMALES MODELO .....	135
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>138</b>
1. CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO (HTS) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES LIGANDOS DE LA PROTEÍNA NUPR1.....	139
2. CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DEL COMPLEJO FORMADO POR LA PROTEÍNA NUPR1 Y LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS .....	144
2.1 CALORIMETRÍA ISOTÉRMICA DE TITULACIÓN (ITC): CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE LOS COMPLEJOS NUPR1-COMPUESTO.....	144
2.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA (SF): ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DEL ENTORNO DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS DE NUPR1 TRAS LA INTERACCION CON LOS COMPUESTOS.....	148
2.3 RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN): ESTUDIO DE LOS RESIDUOS DE NUPR1 IMPLICADOS EN LA INTERACCIÓN CON LOS COMPUESTOS.....	151
2.4 METODOS COMPUTACIONALES: DINÁMICA MOLECULAR Y ACOPLAMIENTO (DOCKING) MOLECULAR.....	154
3. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> CON CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS HUMANAS .....	161
3.1 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN NUPR1-LIGANDO A NIVEL INTRACELULAR: ENSAYO DE LIGACIÓN POR PROXIMIDAD <i>IN SITU</i> (PLA: <i>PROXIMITY LIGATION ASSAY</i> ).....	162
3.2 ESTUDIOS CELULARES: EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS TUMORALES CON LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS.....	164
3.2.1 ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR.....	164
3.2.2 ESTUDIOS CELULARES A TIEMPO REAL: iCELLigence assays.....	167
3.2.3 ESTUDIOS DE CICATRIZACIÓN HERIDAS (Wound Healing Assay) .....	168
3.2.4 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE COLONIAS EN SOFT AGAR.....	169
4. EXPERIMENTOS “IN VIVO” EN ANIMALES MODELO .....	170
<b>DISCUSION GENERAL .....</b>	<b>173</b>
1. INTEGRACION DE TODOS LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LOS COMPLEJOS NUPR1-COMPUESTOS: BASES MOLECULARES DE LAS REGIONES DE INTERACCIÓN DE NUPR1 .....	174
2. NUEVA ESTRATEGIA QUE PERMITE DIRIGIR COMPUESTOS CONTRA IDPs QUE PERMANECEN DESORDENADAS TRAS UNIRSE A SUS LIGANDOS BIOLÓGICOS.....	176
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>179</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>182</b>

# **ABREVIATURAS**

## ABREVIATURAS

ANS	1-anilino-8-naphthalenesulfonate
ASR	<i>Age-Specific Rate</i> (tasa específica de edad)
CI	Índice Celular
DAPY	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	Dicroísmo Circular
DMEN:	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO:	<i>Dimetil Sulfóxido</i>
DOSY RMN	<i>Difusión-Ordered-Spectroscopy</i> (Espectroscopía Orden Difusional)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ExPASY	<i>Expert Protein Analysis System</i> (Sistema de Análisis de Proteínas)
FBS:	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Suero Fetal Bovino)
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i>
FS:	<i>Fluorescence Spectroscopy</i> (Espectroscopía de fluorescencia)
GAFF:	<i>General AMBER Force Field</i> (Campo de fuerza AMBER)
HSQC:	<i>Heteronuclear Simple Quantum Coherence</i>
HTS:	<i>High-Throughput Screening</i> (Cribado de Alto Rendimiento)
IC:	Índice Celular
IC50	Concentración Inhibitoria Semimáxima
IDP:	<i>Intrinsically Disordered Protein</i> (Proteína Intrínsecamente Desestructurada)
IPMNs	Neoplasias Papilares Mucinosas Intraductales
IPPs	Interacción Proteína-Proteína
ITC:	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i> (Calorimetría Isotérmica de Titulación)
IUPs:	<i>Intrinsically Unstructured Proteins</i> (Proteínas no estructuradas)
Ka	Constante de afinidad
Kd:	Constante de disociación
KO:	<i>Knocked-out</i>
MD	<i>Molecular Dynamics</i> (Dinámica Molecular)
MES	2-(N- morfolino )etanosulfónico
MTS	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

NLS	Señal de Localización Celular
Oxa	Oxaliplatino
PanIN	Neoplasias Intraepiteliales Pancreáticas
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (buffer)
PDCA	Adenocarcinoma Ductal de Páncreas
PLA	<i>Proximity Ligation Assay</i> (ensayo de ligación por proximidad de proteínas)
Rh	Radio hidrodinámico
RMN	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Resonancia Magnética Nuclear)
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SER	Elementos de Respuesta a Smad
TGF $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante $\beta$
TPPI	<i>Time-Proportional Phase Incrementation</i>
TRIS	<i>Trisaminomethane, tromethamine</i> (buffer)
TSP	Trimetilsililpropionato de sodio
Tween	Polisorbato
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
WT	<i>Wild Type</i> (tipo salvaje)

# **INTRODUCCIÓN**

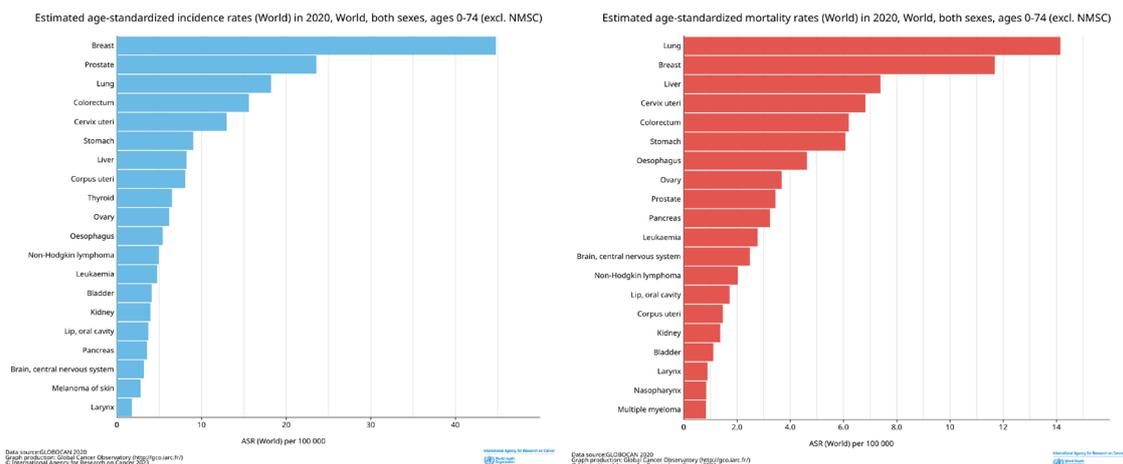
## INTRODUCCIÓN

### 1. CÁNCER DE PÁNCREAS: ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS

El páncreas es una glándula retroperitoneal situada detrás del estómago, histológica y funcionalmente separada en dos partes: el páncreas endocrino, que representa tan solo un 1-2% del total del páncreas, y que está formado por los islotes pancreáticos, responsables de la secreción de hormonas importantes como insulina o glucagón; y el páncreas exocrino, que representa la mayoría del páncreas (86%), que está formado a su vez por conductos y acinos, y que es el responsable de la liberación a la luz duodenal de las enzimas digestivas contenidas en los jugos pancreáticos. Aunque se pueden formar tumores en cada una de las partes del páncreas que darán lugar a los distintos tipos de cánceres de páncreas, la gran mayoría se dan en el páncreas exocrino. Dentro de estos, debido a su alta malignidad e incidencia, cabe señalar a los tumores de tipo adenocarcinoma localizados en los conductos, el denominado adenocarcinoma ductal de páncreas (PDCA: *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*), que es sobre el cual se ha centrado este trabajo. El PCDA, aunque sólo representa el 2.7% de todos los cánceres en España (5,5 casos por 100000 habitantes según la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica), constituye la cuarta causa de muerte por cáncer en los países occidentales (Hidalgo, 2010) con una supervivencia media de 3-6 meses tras el diagnóstico y una tasa de supervivencia a los 5 años del 1-4%, lo que da una idea clara de su agresividad (Jemal et al., 2011). En los Estados Unidos, según el Instituto Nacional del Cáncer, cada año son diagnosticados 46.420 nuevos casos y 39.590 personas morirán a causa de la enfermedad ([www.cancer.net](http://www.cancer.net)).

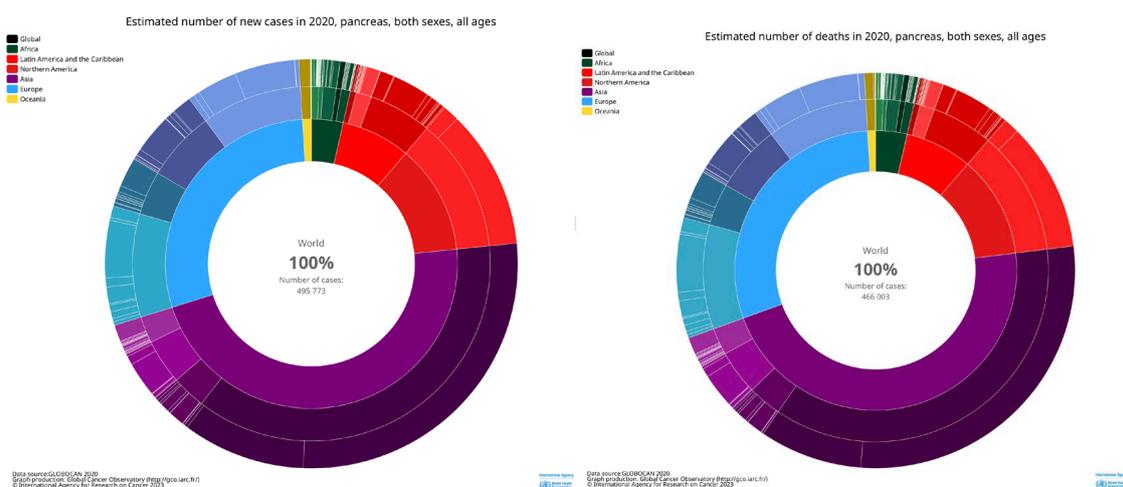
Según los datos extraídos de la página pública del Observatorio Global de Cáncer de la Organización Mundial de la salud (<https://gco.iarc.fr/>), el adenocarcinoma ductal pancreático (PDCA) es un cáncer que se sitúa a nivel mundial entre los 10 tipos de cáncer con una mortalidad más alta (ocupa el puesto número 9 en el número de nuevas muertes anuales cada 100,000 habitantes) aunque su incidencia no es de las más altas (ocupa el puesto número 15 en el número de nuevos casos anuales cada 100,000 habitantes). Según se puede apreciar en la Figura II.1, el cáncer de páncreas tiene unos valores de 3,6 de incidencia y 3,2 de mortalidad.

## INTRODUCCIÓN



**Figura 11.1:** Gráfico extraído del Observatorio Global de Cáncer de la Organización Mundial de la salud (<https://gco.iarc.fr/>). Se representan los datos para el año 2020 de los distintos tipos de cáncer en función del valor ASR (*Age-Specific Rate*), es decir, el número de nuevas muertes/nuevos casos anuales cada 100,000 habitantes. Se ha tomado para esta representación unos valores de edad de la población de 0 a 74 años.

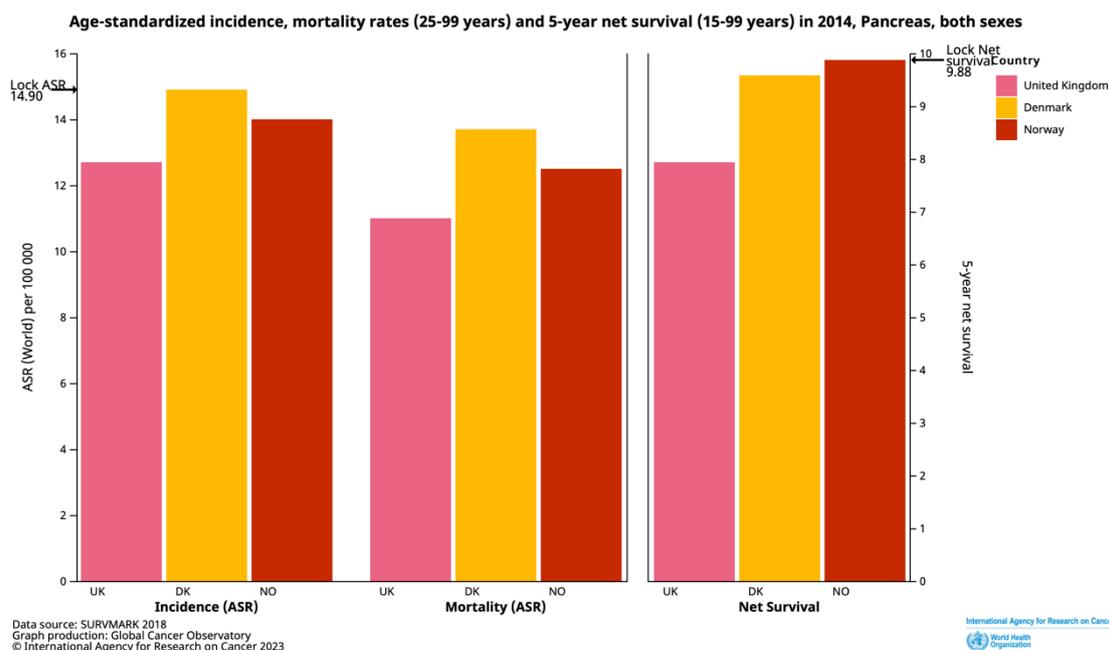
En la Figura 11.2 se puede observar que el número de casos anuales detectados y el número de muertes en 2020 para ambos sexos es prácticamente igual, en torno a 500.000. Si nos fijamos en la página web los datos para dentro de Europa y más específicamente en España, en el año 2020 se detectaron un 1,6% de los casos (282421 de 19292789) y un 1,2% de las muertes (113054 de 9958133) a nivel mundial.



**Figura 11.2:** Gráfico extraído del Observatorio Global de Cáncer de la Organización Mundial de la salud (<https://gco.iarc.fr/>). Se representan los datos para el año 2020 de los casos de cáncer de páncreas, nuevos casos (izquierda) y muertes (derecha) distribuidos por continentes.

## INTRODUCCIÓN

La supervivencia de este tipo de cáncer no supera el 10% a los cinco años en ninguno de los países europeos en los que hay registro de casos dentro el proyecto SURVMARK2 2018 (*Cancer Survival in High-Income Countries*). Son los datos almacenados y mostrados en esta web para el 2014 (último año recogido) Figura I1.3



**Figura I1.3:** Gráfico extraído del Observatorio Global de Cáncer de la Organización Mundial de la salud (<https://gco.iarc.fr/>). La base de datos es la SURVMARK-2 del año 2014. Se muestra el valor del ASR (*Age-Specific Rate*), es decir, el número de nuevas muertes/nuevos casos anuales cada 100,000 habitantes en tres países: Reino Unido (UK en rosa), Dinamarca (Denmark en amarillo) y Noruega (Norway en rojo).

### 1.1. Genética del adenocarcinoma ductal de páncreas

Como todos los tipos de cáncer, el PDCA es una enfermedad de origen genético, causado por la acumulación de mutaciones en el DNA celular que hacen progresar el tumor desde el páncreas sano, pasando por las lesiones premalignas denominadas Neoplasias Intraepiteliales Pancreáticas (PanIN) o Neoplasias Papilares Mucinosas Intraductales (IPMNs), hasta el adenocarcinoma invasivo propiamente dicho. La mayoría de los cánceres de páncreas ocurren de manera esporádica y solo un 10% son debidos a

## INTRODUCCIÓN

mutaciones en la línea germinal, es decir, que la mayoría de los casos de cáncer de páncreas no son hereditarios. Como en todo proceso tumoral, para que se produzca este desarrollo y progresión en el tumor, estas mutaciones se tienen que producir en “genes clave” para procesos celulares importantes, como son la activación de los proto-oncogenes, la inactivación de los genes supresores de tumores, o la desregulación de genes que codifican para factores de crecimiento y sus receptores y que afectarán al crecimiento y la diferenciación celular. En el cáncer de páncreas hay implicadas mutaciones en numerosos genes, hasta 63 mutaciones distintas de media se han encontrado en este tipo de tumores, que afectan a un conjunto de 12 vías de señalización celular (Jones et al., 2008). Pero las principales mutaciones que se encuentran en la mayoría de los cánceres de páncreas son las siguientes (Feldmann *et al.*, 2007):

- La activación del oncogen KRAS, considerado como desencadenante iniciador para el desarrollo del tumor y mutado en más del 90% de los cánceres de páncreas. Este gen codifica para una proteína de membrana involucrada en vías de señalización celular importantes mediadas por factores de crecimiento, como son la proliferación celular y la migración celular.

- La inactivación de los genes supresores de tumores CDKN2A/INK4A, inactivados en más del 95% de los cánceres de páncreas y que codifican para la proteína de control celular p16, que se encarga mediante su unión a ciclinas, de detener el ciclo celular en la transición de la fase G1-S si la célula está dañada (mutada) para impedir su progresión celular.

- Y finalmente la inactivación de los genes supresores de tumores TP53 y DPC4/SMAD4. Las alteraciones en la proteína p53 permiten a la célula escapar de los mecanismos de control del daño en el DNA celular y de las señales de apoptosis, además de contribuir a la inestabilidad genética de la célula. El gen SMAD4, también conocido como DPC4 o MADH4, está relacionado con la transformación del factor de crecimiento TGF- $\beta$  y con la activación del crecimiento celular y la proliferación incontrolada.

Por otro lado, muchos factores de crecimiento y sus receptores van a estar sobreexpresados en este tipo de tumores. Y es precisamente esta abundancia de factores promotores del crecimiento y el defecto de los factores inhibitorios del mismo, lo que va

## INTRODUCCIÓN

a permitir a las células tumorales pancreáticas llevar a cabo procesos propios de las mismas como la angiogénesis, la metástasis o la evasión de la apoptosis (Güngör *et al.*, 2014; Ulrich, 2000; Vincent *et al.*, 2011).

Todas estas alteraciones genéticas van a producir en las células pancreáticas la desregulación de numerosas rutas de señalización importantes como RAS-MAPK, la vía de la ciclooxigenasa, la vía Src, la vía Notch, que va a promover la vascularización del tumor, la vía de la ciclooxigenasa, la vía hedgehog relacionada con las células madre tumorales, la vía Wnt implicada en la homeóstasis de la autorrenovación de las células en distintos tejidos, etc...(Iovanna et al., 2012).

No hay que olvidar otro aspecto importante en el desarrollo de este tipo de tumores como es la epigenética. Este término, definido como la regulación de la expresión génica sin alterar la secuencia en el DNA, comprende importantes procesos celulares como la metilación del DNA, la acetilación de histonas o los RNA de interferencia. En diversos estudios se ha puesto de manifiesto, por ejemplo, que el desarrollo del PCDA se ve condicionado por anomalías en la metilación de los promotores de algunos genes. Comparando la metilación de las islas CpG de distintos genes en tejido tumoral, con la metilación del promotor de tejido pancreático sano, se han encontrado tanto promotores hipermetilados en genes supresores de tumores como p16 o HIN-1, como promotores hipometilados en oncogenes. La hipermetilación de los primeros en su región promotora silencia la expresión del gen supresor de tumores correspondiente, mientras que la hipometilación de los segundos provoca la sobreexpresión de los genes afectados. Ambos fenómenos están directamente relacionados con el desarrollo de los tumores pancreáticos. En estos mismos estudios se ha demostrado también la existencia de otros mecanismos epigenéticos involucrados en el desarrollo del cáncer de páncreas, observándose la regulación o desregulación de la expresión génica tanto por acetilación de histonas en genes clave para el desarrollo de PCDA, como p300, HDACs, Brg1 o PBRM1; como por microRNA como en el caso de la familia de los miR-200, miR10a, miR-34 y miR155 que regulan la expresión de genes asociados a metástasis y a la indiferenciación celular (McCleary-Wheeler et al., 2013) (Neureiter et al., 2014)

### **1.2. Diagnóstico y tratamiento del adenocarcinoma ductal de páncreas:**

El diagnóstico del PCDA, sobre todo en estadios iniciales, es una tarea muy complicada. Uno de los problemas para el diagnóstico de este tipo de tumores es la falta de marcadores tumorales específicos de la enfermedad que permitan su diagnóstico precoz. Se han propuesto numerosos biomarcadores para su diagnóstico temprano, siendo el más importante por su importancia histórica el antígeno carbohidrato CA 19.9 con una sensibilidad del 79-81% y una especificidad del 82-90%. Este marcador tumoral tiene un valor predictivo positivo (PPV) del 72% y un valor predictivo negativo (NPV) del 81-96% en pacientes sintomáticos (Scarà et al., 2015). La limitación de este marcador, al igual que sucede en la mayoría de los marcadores tumorales, es la falta de especificidad para el cáncer páncreas, elevándose también en otras condiciones tanto malignas como benignas. Además, no todos los pacientes con cáncer de páncreas expresan esta proteína, por lo que el marcador no se elevará en estos pacientes. Es por eso que su uso es más eficaz para el seguimiento de la enfermedad que para su diagnóstico. Su uso combinado con el CA125 y el CEA, ha demostrado ser útil en el resultado de la cirugía o el seguimiento de la quimioterapia. Actualmente se están estudiando otros biomarcadores séricos basados en la epigenética, como el estudio de la metilación de los promotores de algunos genes, la detección de nucleosomas libres, la detección de microRNAs, el DNA libre tumoral, o paneles multimarcadores con distintas proteínas, enzimas y moléculas de señalización implicadas en la enfermedad, pero todos ellos se encuentran todavía en fase de investigación (Chang et al., 2017).

Esta falta de biomarcadores tumorales para su detección temprana, junto con la ausencia de síntomas específicos en los estadios iniciales de la enfermedad, hacen del diagnóstico del cáncer de páncreas una tarea complicada, lo que contribuye a su desenlace fatal.

Además, debido a la altísima capacidad de invasión y de formación de metástasis de las células tumorales pancreáticas, en la mayoría de los casos, cuando llega el diagnóstico de la enfermedad, esta ya se encuentra diseminada con metástasis en los ganglios linfáticos, el hígado, los pulmones u otras localizaciones, lo que hace imposible su curación. La única opción real de curación para estos pacientes es la cirugía si el diagnóstico llega a tiempo, es decir, realizar una pancreatectomía ya sea parcial o total, pero menos de un 20% de los pacientes se pueden beneficiar de ella debido al retraso en el diagnóstico y la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico.

## INTRODUCCIÓN

En cuando a los tratamientos en la práctica clínica, hay que destacar otra característica importante de las células tumorales pancreáticas, como es su altísima capacidad de resistencia a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia actuales, de ahí que el tratamiento falle en la mayoría de los casos. Realmente son muy pocos los tratamientos que has demostrado eficacia contra el cáncer de páncreas. Desde los años 90 se ha considerado la Gemcitabina como el tratamiento de referencia para el adenocarcinoma ductal de páncreas, ya sea en monoterapia o combinado con otras moléculas coadyuvantes como el Erlotinib, un inhibidor del EGFR tirosina quinasa. Actualmente su combinación con nab-Paclitaxel, o la administración de FOLFIRINOX (5-fluorouracil, leucovorin, irinotecan, oxaliplatin) han demostrado una mayor supervivencia comparado con la Gemcitabina sola (Conroy et al., 2011)(Mohammed et al., 2014).

La Gemcitabina, un análogo de nucleósido (2'2'-difluorodeoxycitidina), muestra especificidad por la fase S de la división celular, es decir, por las células que están sintetizando DNA. El fármaco se metaboliza en el interior de las células tumorales mediante quinasas celulares generando los nucleósidos difosfato y trifosfato, los metabolitos activos, que se añaden a la hebra de DNA en crecimiento. Estos inhiben la actividad de la enzima ribonucleótido-reductasa, responsable de la generación de los trifosfatos de deoxinucleósidos necesarios para la síntesis del DNA, por lo que la síntesis del DNA se detiene (Mini et al., 2005).

Actualmente existen numerosos estudios, algunos en fase III para tratar (<https://www.clinicaltrials.gov>) de alargar la vida de estos pacientes, pero todavía no hay resultados concluyentes que ayuden al tratamiento de estos pacientes con cáncer de páncreas.

Por lo tanto, y como acabamos de ver, la eficacia de los fármacos descritos hasta el momento para el PDCA es muy limitada, de ahí la necesidad de seguir investigando para el desarrollo tanto de nuevas estrategias preventivas, diagnósticas y terapéuticas, y para el desarrollo de nuevos fármacos contra dianas importantes que consigan frenar la progresión del tumor.

Como conclusión podemos afirmar que la falta de marcadores para un diagnóstico temprano del cáncer de páncreas, la rápida progresión de la enfermedad, la resistencia a

## INTRODUCCIÓN

la quimioterapia y radioterapia actuales, y la baja tasa de supervivencia de estos pacientes, hacen necesario el estudio de nuevas estrategias para el manejo de este tipo de tumores, mediante el desarrollo de drogas específicas que evadan los mecanismos de resistencia celular y bloqueen pasos cruciales para el desarrollo del tumor.

### **2. DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS**

El desarrollo de nuevos principios activos contra una determinada enfermedad es un proceso largo y complejo, que exige un enfoque multidisciplinar, y en el que se utiliza tecnología sofisticada para realizar búsquedas sistemáticas de compuestos activos a gran escala, buscando siempre una mayor efectividad y una menor toxicidad.

La primera etapa en el desarrollo de un determinado fármaco consiste en la identificación de una molécula diana sobre la que actuará el nuevo fármaco. Normalmente se tratará de una proteína que resulte clave para el desarrollo de la enfermedad a tratar, como receptores moleculares, enzimas, receptores nucleares, canales iónicos...Y la siguiente etapa en el diseño de los mismos, sería la identificación de ligandos capaces de unirse a la molécula diana, y de mostrar una actividad significativamente alta respecto a la misma, ya sea el bloqueo de la molécula diana, su estimulación o la modificación de su función según nos interese por el tipo de molécula diana en cuestión (Imming et al., 2006). Para ello se han de testar cientos o miles de compuestos distintos (cribado) hasta encontrar los compuestos adecuados.

#### **2.2 Búsqueda de dianas terapéuticas**

Respecto a las posibles dianas terapéuticas, uno de los campos en los que se ha dedicado gran tiempo y esfuerzo en los últimos años es al estudio de las interacciones proteína-proteína (IPPs) como potenciales dianas (McPherson & Korzhnev, 2021). Muchos procesos celulares funcionan gracias a la transducción de señales que se llevan a cabo por interacciones proteína-proteína. A su vez, muchas enfermedades humanas, como por ejemplo el cáncer o algunas enfermedades degenerativas, se pueden asociar a IPPs aberrantes, ya sea por la pérdida de la interacción, o por la sobreinteracción y la formación

## INTRODUCCIÓN

de complejos en concentraciones, tiempo o lugar inadecuado. Así que la modulación de estas interacciones por pequeñas moléculas selectivas es de gran interés para el descubrimiento de nuevos fármacos contra distintas patologías. Además, los moduladores de IPPs presentan algunas ventajas sobre los inhibidores de dianas clásicas. Por un lado, son más selectivos y menos tóxicos al interactuar con una interfaz específica de las proteínas cuya interacción se está inhibiendo; y, por otro lado, ya que dicha interfaz suele estar constituida por aminoácidos conservados, sería muy poco probable el desarrollo de resistencias (Villoutreix *et al.*, 2014).

Este abordaje no es nuevo. Ya hay fármacos en la práctica clínica basados en este principio. Un ejemplo de este tipo de fármacos es el de la familia de los taxanos, derivados del taxol (Paclitaxel), empleados actualmente en el tratamiento de distintos tipos de cáncer. La tubulina, formada por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , polimeriza mediante IPPs formando microtúbulos, los cuales experimentan ciclos de polimerización y despolimerización ligados al ciclo celular y la división celular. El taxol se une a la tubulina, concretamente a la subunidad  $\beta$  de la proteína y fortalece las interacciones IPPs, estabilizando los microtúbulos e impidiendo la despolimerización, lo que inhibe la división celular, conduciendo finalmente a la apoptosis de la célula (Downing, 2000).

El desarrollo de inhibidores de las IPPs sigue siendo un reto. Aunque las interfaces proteicas que intervienen en las interacciones suelen ser de gran tamaño, planas y sin cavidades claramente definidas que predigan un potencial sitio de unión del inhibidor, se sabe que, en muchos casos, únicamente un pequeño segmento de la interfaz, que sí que podría interactuar con pequeñas moléculas, contribuye a la energía de unión con alta afinidad (Schmidtke & Barril, 2010). Son las regiones conocidas como *hot spots* de las interfaces de interacción de las proteínas, y son críticas para la estabilidad de los complejos proteicos (Wells & McClendon, 2007).

### **2.2. Búsqueda de ligandos: High-Throughput Screening (HTS) y métodos computacionales de dinámica molecular**

Como hemos dicho anteriormente, la segunda etapa fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos es la identificación de nuevos ligandos que se unan a la biomolécula

## INTRODUCCIÓN

diana de interés (Imming et al., 2006). Para fármacos basados en pequeños ligandos orgánicos, el cribado de alto rendimiento o HTS (*High-Throughput Screening*) es la aproximación más utilizada, por su simplicidad y su bajo coste. El HTS consiste en la automatización de distintas técnicas que permiten seleccionar las moléculas capaces de reconocer a la molécula diana responsable de una determinada patología entre un conjunto de miles o cientos de miles de candidatos, en un tiempo relativamente pequeño. Estos ensayos masivos pueden ser de dos tipos: ensayos en el laboratorio o ensayos virtuales *in silico* donde una simulación por ordenador es la encargada de llevar a cabo los ensayos a gran escala (Kitchen et al., 2004).

Respecto al primero de ellos, el *High-Throughput Screening* (HTS) en el laboratorio, también conocido como cribado farmacológico de alto rendimiento, es llevado a cabo principalmente en el seno de la industria farmacéutica (Entzeroth et al., 2009). En él, se utilizan grandes librerías de compuestos químicos denominadas “quimiotecas”, ya sea sintetizadas por el propio laboratorio o compradas a una casa comercial, cuyas moléculas son ensayadas una a una para demostrar su interacción con la molécula diana implicada en la patología estudiada y su actividad biológica frente a la misma. La ventaja de utilizar una quimioteca comercial frente a la síntesis de la misma, es que en el primer caso todos los compuestos suelen ser fármacos o profármacos aprobados por algún organismo oficial, por lo que han demostrado ser seguros para su uso humano y el proceso para aprobar el fármaco, llegado el caso, se simplifica. En la mayoría de los casos son necesarias modificaciones químicas posteriores de dichos compuestos primarios para mejorar la especificidad y la afinidad de unión (Carnero, 2006) (Ashenden, 2018).

Para el diseño del experimento propiamente dicho para llevar a cabo el cribado farmacológico de alto rendimiento existen muchas opciones, aunque las podemos agrupar principalmente en dos: ensayos sin células (*cell-free HTS assays*), o ensayos llevados a cabo directamente en células (*cell-based assays*). Respecto a las tecnologías utilizadas en el diseño del experimento son también múltiples, encontrándose entre ellas la fluorescencia, la resonancia magnética nuclear, la cromatografía de afinidad, o los *microarrays* de DNA, u otras técnicas, pudiendo llegar al cribado de más de 100000 moléculas al día (MacArron et al., 2011).

## INTRODUCCIÓN

Hay que tener en cuenta que un resultado positivo para HTS que demuestre la interacción entre una nueva molécula (posible nueva droga) y una proteína diana significa únicamente que bioquímicamente son capaces de interactuar, lo que puede que se aleje mucho de su comportamiento biológico dentro de un organismo vivo. Un organismo vivo es un sistema complejo con miles de proteínas interactuando entre sí, en el que el comportamiento de la nueva molécula puede diferir mucho de los experimentos *in vitro*. Puede ser, por ejemplo, que en un organismo esa nueva molécula interactúe indeseablemente con más proteínas a parte de la proteína diana, o que no interactúe con la proteína diana debido a la presencia de otras enzimas, cofactores, sales..., o puede también que, aunque se una a la proteína diana y realice la acción biológica esperada, esta no sea suficiente para el tratamiento de la enfermedad, ya que estas suelen ser el resultado de múltiples aberraciones moleculares aún por descubrir (Mishra et al., 2008). Por lo que un resultado positivo en el cribado solo es el primero de los muchos pasos necesarios para determinar la actividad biológica real de la nueva molécula.

El segundo tipo de ensayos para llevar a cabo grandes cribados masivos de moléculas candidatas a actuar contra una molécula diana concreta, y que representa un punto intermedio entre la teoría y los experimentos, son los métodos computacionales (Kitchen *et al.*, 2004) (Saldívar-González et al., 2017) (Zoete *et al.*, 2009). Estos métodos computacionales son todo un arsenal de nuevas tecnologías, con un importante componente matemático y computacional que permiten crear modelos teóricos tridimensionales de receptores y ligandos, estudiar preferencias conformacionales, dilucidar la naturaleza y magnitud de las fuerzas interatómicas que gobiernan su interacción y analizar el comportamiento dinámico de cada molécula por separado y de sus correspondientes complejos (Lengauer & Rarey, 1996). Es una técnica muy usada para el diseño de fármacos: una vez conseguido un ligando con alta afinidad para un determinado sitio de unión de la proteína receptora mediante simulación *in silico*, se procede a realizar estudios experimentales para comprobar si realmente funciona.

Los métodos computacionales suelen constar de dos partes.

Una primera parte denominada dinámica molecular (DM) que genera información sobre la posición y la velocidad de cada partícula o átomo del sistema en cada instante de tiempo, generando un conjunto de configuraciones diferentes (búsqueda conformacional) de un sistema de partículas, aplicando el principio de minimización de la energía. Estas

## INTRODUCCIÓN

moléculas que deben ser químicamente viables y poseer alta actividad biológica son caracterizadas estructuralmente y sometidas a un proceso de optimización de su potencia farmacológica. De estas, los que presenten mejores propiedades, serán seleccionados como potenciales candidatos a pasar a la siguiente fase de desarrollo.

Y una segunda parte, también computacional, denominada acoplamiento molecular o *docking* que proporciona información de la interacción proteína diana-ligando. Cuando un ligando se une a una proteína diana, este se mantiene en una posición concreta por muchas interacciones con diferentes grupos del receptor que, en el caso de las proteínas pueden estar ampliamente dispersos en la secuencia primaria de aminoácidos, pero que estarán cerca en la estructura terciaria de la proteína una vez que esta se ha plegado. Las contribuciones de cada grupo a la energía total de unión pueden ser débiles pero la suma de todas puede hacer que el ligando se una muy firmemente. Además, si no tenemos datos cristalográficos sobre el modo preciso de unión del ligando a la macromolécula, es preciso explorar las diversas posibilidades de interacción entre ambas moléculas y la búsqueda del complejo más estable, función principal de la técnica de *docking* o acoplamiento.

Independientemente del método utilizado para hallar un posible ligando con acción biológica que se una a la molécula diana formando un compuesto estable, queda un largo recorrido de entre 10 y 15 años hasta la puesta en el mercado del buscado fármaco, y en este largo proceso muchos son los ligandos que resultarán descartados en algún punto del recorrido (Figura I2.2.1).

## INTRODUCCIÓN



**Figura I2.2.1:** Diagrama adaptado de Elsevier (Rang *et al.*, 2016.)

Este largo recorrido consta de tres fases principales (Rang *et al.*, 2016):

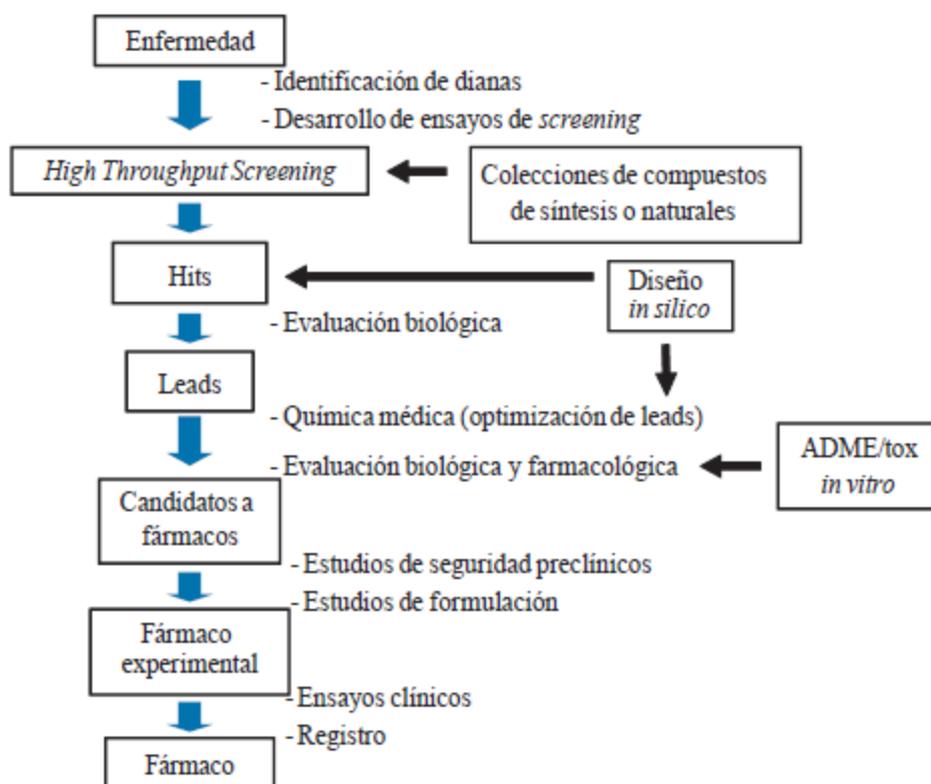
1. Descubrimiento del fármaco, o fase en la que se eligen las moléculas candidatas en función de sus propiedades farmacológicas.
  
2. Desarrollo preclínico, o fase en la que se realiza un amplio abanico de estudios en seres no humanos (p. ej., pruebas de toxicidad, análisis farmacocinético/farmacodinámico y formulación).
  
3. Desarrollo clínico, o fase en la que se prueba la eficacia, los efectos secundarios y los peligros potenciales que el fármaco seleccionado provoca en voluntarios sanos y en pacientes.

Estas fases no tienen por qué desarrollarse de una forma estrictamente sucesiva, como se indica en la infografía (Figura I4), sino que generalmente se superponen. En general se puede decir que la fase preclínica sirve sobre todo para demostrar la falta de efectos

## INTRODUCCIÓN

adversos, mientras que la fase clínica sirve para demostrar la eficacia terapéutica del nuevo ligando.

El resumen de todos los pasos involucrados en la búsqueda de un fármaco contra una enfermedad concreta queda reflejado en la siguiente figura (Figura I2.2.2):



**Figura I2.2.2:** Esquema representativo de los pasos seguidos para el descubrimiento de un fármaco, desde el problema o enfermedad en cuestión hasta la puesta en el mercado de dicho fármaco.

### 3. PROTEÍNAS INTRINSECAMENTE DESESTRUCTURADAS (IDPs: *Intrinsically Disordered Proteins*) COMO POSIBLES DIANAS TERAPÉUTICAS

El dogma aceptado universalmente hasta hace unos años por toda la comunidad científica que relacionaba la estructura tridimensional de las proteínas con la funcionalidad de las mismas, fue cuestionado hace unos 15 años con el descubrimiento de un grupo de proteínas a las cuales no se les podía asignar, mediante las técnicas apropiadas para ello

## INTRODUCCIÓN

(cristalografía de rayos X, RMN, dicroísmo circular...) una estructura secundaria estable, es decir, no necesitaban estar plegadas para desarrollar su función en la célula, lo que echaba por tierra la relación estructura-función. Estas proteínas contenían en su estructura unas regiones desestructuradas o regiones con plegamiento incierto (*random coil*), que pueden afectar únicamente a zonas de unión entre dominios funcionales de la proteína dando lugar a las clásicas proteínas plegadas o proteínas globulares, o ser lo predominante a lo largo de toda la proteína, dando lugar al grupo de proteínas denominadas proteínas intrínsecamente desestructuradas o desordenadas (IDPs: *Intrinsically Disordered Proteins*), también conocidas como proteínas no estructuradas (IUPs: *Intrinsically Unstructured Proteins*).

Así se definen las IDPs como un grupo de proteínas dinámicas que existen como un conjunto de estructuras que se intercambian rápidamente entre ellas, es decir, sin estructura secundaria o terciaria estable, ya sea en algunas regiones de la misma (proteínas parcialmente desordenadas), o a lo largo de toda su secuencia (proteínas totalmente desordenadas) (Uversky, 2013), (Tompa, 2012). Esta capacidad de fluctuar entre diferentes estados conformacionales en una escala de tiempo del orden de nano a microsegundos les confiere una flexibilidad y plasticidad que no poseen el resto de proteínas (Uversky, 2011). Las distintas conformaciones que puede adquirir una proteína intrínsecamente desestructurada son resultado de modificaciones postraduccionales, la presencia de agua, o incluso la interacción con otras moléculas como azúcares o iones. Y es precisamente esta flexibilidad estructural lo que les permite adoptar estructuras diferentes, reconocer e interactuar con distintos ligandos en la célula, o incluso interactuar con la misma molécula pero de formas distintas. Toda esta maleabilidad en su estructura provoca que las interacciones que llevan a cabo las IDPs sean uniones con baja afinidad (uniones débiles) pero alta especificidad, lo que constituye una ventaja desde el punto de vista biológico y evolutivo (Wright & Dyson, 2015). Esto nos lleva a otra de las características destacadas de este grupo de proteínas, la multifuncionalidad (*moonlighting*) de estas proteínas, que las hace capaces de participar en multitud de vías metabólicas celulares (Liu & Huang, 2014) (Tompa et al., 2012.)

Por lo tanto, las proteínas intrínsecamente desestructuradas son proteínas que se encuentran desplegadas en condiciones fisiológicas en la célula, y es la unión a sus diferentes ligandos biológicos presentes en la célula lo que produce la estabilización de

## INTRODUCCIÓN

sus estructuras con un cierto grado de plegamiento, y la formación del complejo biológicamente activo.

En términos de energía de la interacción, se puede pensar que el coste de la entropía necesaria para plegar a una proteína desplegada se compensará con la entalpía generada por la unión a su ligando. Cuando una proteína intrínsecamente desestructurada interacciona con otra macromolécula complementaria, otra proteína normalmente, la superficie implicada en la interacción es muy grande, y la entalpía ganada en la unión compensa la entropía perdida en ella. Sin embargo, cuando buscamos una molécula pequeña que obstaculice la interacción PPI, la termodinámica de la interacción ya no está tan clara, ya que la superficie implicada y la entalpía de la interacción ya no son tan grandes. En estos casos es donde entra en juego la contribución de la desolvatación al término termodinámico de la entropía, definida como el aumento de entropía causada por la eliminación de moléculas de agua de la superficie de interacción de la proteína, favorecida por el carácter hidrofóbico de la misma. Por lo que esta interacción de una molécula pequeña con una IDP está termodinámicamente dirigida por esta ganancia de entropía de solvatación, por la pérdida de entropía debida al plegamiento del complejo resultante y por la entalpía de la unión (Santofimia-Castaño et al., 2020)

Además, como hemos dicho antes, las IDPs son capaces de reconocer y unirse a diferentes ligandos desempeñando distinta función según se una a uno u a otro ligando. El tipo de ligandos con los que pueden unirse son muy diversos. Pueden unirse a otras proteínas, RNA, DNA, membranas, o moléculas pequeñas como iones o azúcar, por lo que la actividad de las IDPs es también muy diversa, pudiendo participar en la regulación transcripcional y traduccional, la transducción de señales celulares, la fosforilación de proteínas, el almacenamiento de moléculas pequeñas, como chaperonas de proteínas y de RNA, en la regulación del ensamblaje de grandes complejos multiproteicos y del ribosoma... De hecho, son proteínas que desarrollan funciones clave en importantes rutas reguladoras y de señalización celular, actuando como receptores de membrana, factores transcripcionales, receptores hormonales..., por lo que muy a menudo están implicadas en enfermedades tan graves como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, o las enfermedades cardiovasculares (Dyson & Wright, 2005). De hecho, algunas IDPs tienen la capacidad de funcionar como interruptores de determinadas vías de señalización, de manera que cuando la proteína está en una determinada conformación, se une a la

## INTRODUCCIÓN

molécula blanco y la vía permanece activa, y si cambia su conformación, se inhibe la interacción y la vía se inactiva, lo que nos da una idea de lo que su defecto puede suponer a nivel celular.

Por poner el ejemplo del cáncer, se ha visto que el 79% de las proteínas asociadas con el cáncer contienen regiones desordenadas de más de 30 aminoácidos. Se ha demostrado además que varias proteínas con funciones importantes en la regulación de la división celular, como la alfa-fetoproteína; en la vía de señalización que regula la expresión de genes, como p53; en la respuesta a daños producidos en el DNA, como BRCA1; o en funciones importantes relacionadas con la regulación de la muerte celular programada, como las proteínas de la familia Bcl-2, son total o parcialmente desordenadas. Por ejemplo, la proteína supresora de tumores p53 realiza su función reguladora interaccionando con múltiples proteínas, y la mayoría, aproximadamente un 70% de estas interacciones, las realiza a través de regiones desordenadas de la misma. Si p53 pierde su función debido a mutaciones o cualquier otra causa, la célula se transformará en una célula cancerosa.

Por otro lado, debido a su flexibilidad y multifuncionalidad, las IDPs deben estar sometidas a un riguroso control intracelular, tanto de su concentración, regulada por la transcripción y traducción de sus genes para conseguir una baja expresión, como de su vida media, regulada por una mayor tendencia a la degradación de estas proteínas. Este riguroso control es importante porque, por ejemplo, si encontramos una proteína desordenada a una concentración más alta de la necesaria, debido a su plasticidad, podría unirse a un ligando inadecuado y producir una cadena de señalización no deseada.

Respecto a sus características, las proteínas intrínsecamente desestructuradas poseen alguna característica que las diferencia de las proteínas plegadas o globulares. Son proteínas de baja complejidad, mucha menos complejidad que las segundas, y con una composición de aminoácidos diferente a ellas. Por lo general, son poco abundantes los aminoácidos hidrofóbicos (Ile, Leu y Val) y aromáticos (Trp, Tyr y Phe), que son aminoácidos abundantes en las proteínas globulares ya que estos promueven un plegamiento espontáneo; y poco abundantes también los residuos de Cys y Asn, ya que son residuos conocidos por ser promotores del orden de la proteína. Por otro lado, las IDPs contienen una alta proporción de aminoácidos polares y cargados, como Gln, Ser, Pro, Glu, Lys y Arg, y residuos promotores del desorden como Gly y Pro. Todo esto

## INTRODUCCIÓN

contribuye a esa ausencia de estructura que caracteriza a este grupo de proteínas (Dyson & Wright, 2005) (Uversky, 2011).

En cuanto a su abundancia, se ha descubierto la presencia de proteínas intrínsecamente desestructuradas en todos los reinos animales y su número aumenta con la complejidad del organismo. Se estima que, en eucariotas, más del 40% de las proteínas tienen regiones desordenadas mayores de 50 residuos (Liu & Huang, 2014).

Todo lo anterior, unido a que las proteínas intrínsecamente desestructuradas están implicadas en numerosas patologías, han hecho que las IDPs sean reconocidas desde hace un tiempo como potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades como puede ser el cáncer (Metallo, 2010), y se dediquen importantes esfuerzos para descubrir moléculas que las reconozcan y modifiquen su función (Chen & Tou, 2013). La cuestión es que las estrategias de diseño para drogas que actúan sobre proteínas bien plegadas no son apropiadas para el caso de las IDPs debido a su naturaleza altamente dinámica y la ausencia de una estructura bien definida. Por lo que, aunque ya hay algún avance en este campo, como por ejemplo el descubrimiento de algunas moléculas que inhiben la formación del complejo c-Myc/Max implicado en varios tipos de cánceres humanos, se puede decir que la selección de drogas eficaces para las IDPs como diana terapéutica es un reto y plantea grandes dificultades a nuestro actual conocimiento de las PPIs.

Esto ha llevado en los últimos años al desarrollo de diferentes aproximaciones para tratar de identificar moléculas que interaccionen con las IDPs. Estas aproximaciones son tanto experimentales, mediante el cribado de moléculas con estructura química diversa contenidas en distintas quimiotecas, como computacionales, mediante el estudio de las interfaces de las IDPs que participan en el reconocimiento de sus ligandos biológicos y el diseño de moléculas capaces de unirse a esa interface *in silico*. Esta última aproximación plantea un gran desafío, ya que hacer diseño basado en la estructura de algo que no tiene estructura definida resulta una tarea complicada (Santofimia-Castaño et al., 2020). Así pues, el cribado de fármacos frente a IDPs representa un reto muy importante, pero a la vez abre una gran esperanza para el diseño de nuevos fármacos para enfermedades tan importantes y con tanta incidencia como el cáncer o las enfermedades degenerativas.

## INTRODUCCIÓN

Existen actualmente algunos ejemplos de diseño de drogas que tienen como objetivo una proteína intrínsecamente desestructurada implicada en el desarrollo de tumores.

El primero de ellos demuestra como una pequeña molécula puede bloquear los complejos formados por el factor de transcripción oncogénico c-Myc, una proteína intrínsecamente desestructurada que se une a su ligando biológico Max, para formar el complejo c-Myc/Max. Este complejo se une al DNA y modula la expresión de genes implicados en el crecimiento celular, la apoptosis y otros procesos metabólicos, y su desregulación está asociada a tumores muy agresivos de mama, pulmón o cérvix. Mediante distintas aproximaciones de HTS y métodos computacionales han sido descubiertas varias moléculas orgánicas pequeñas que interaccionaban con la IDP c-Myc, e impiden su unión con Max, haciendo imposible la formación del dímero biológicamente activo c-Myc-Max (Choi et al., 2017; Follis et al., 2008.; Mustata et al., 2009).

Otros ejemplos similares han sido descritos con otras proteínas intrínsecamente desestructuradas como la proteína tirosin fosfatasa 1B, sobreexpresada en los tumores de mama, la proteína FL11 implicada en el sarcoma de Ewing, la proteína p27 implicada en la división celular de las células eucariotas o la proteína p53, regulador clave en funciones celulares esenciales como la senescencia, el ciclo celular y la apoptosis.

Por lo que, a día de hoy, el desarrollo de fármacos cuyas dianas sean proteínas intrínsecamente desestructuradas es una opción real, aunque con las dificultades que ello conlleva y que se han comentado anteriormente.

Por último, hay que señalar también que muchos de estos ejemplos son proteínas intrínsecamente desestructuradas involucradas en mecanismos de estrés celular. Las células cancerígenas crecen en condiciones de estrés celular como hipoxia o falta de nutrientes, que activan la expresión de las proteínas de respuesta a ese estrés celular, cuya función es ayudar a las células tumorales a adaptarse a ese ambiente hostil. Por lo que pensar en estas proteínas intrínsecamente desestructuradas que ayudan a la célula tumoral a sobrevivir, como posibles dianas terapéuticas podría abrir nuevas perspectivas para los tratamientos de diversas enfermedades (C. Cano et al., 2010; Jegu et al., 2013).

### 4. PROTEÍNA NUPR1 COMO DIANA TERAPEÚTICA

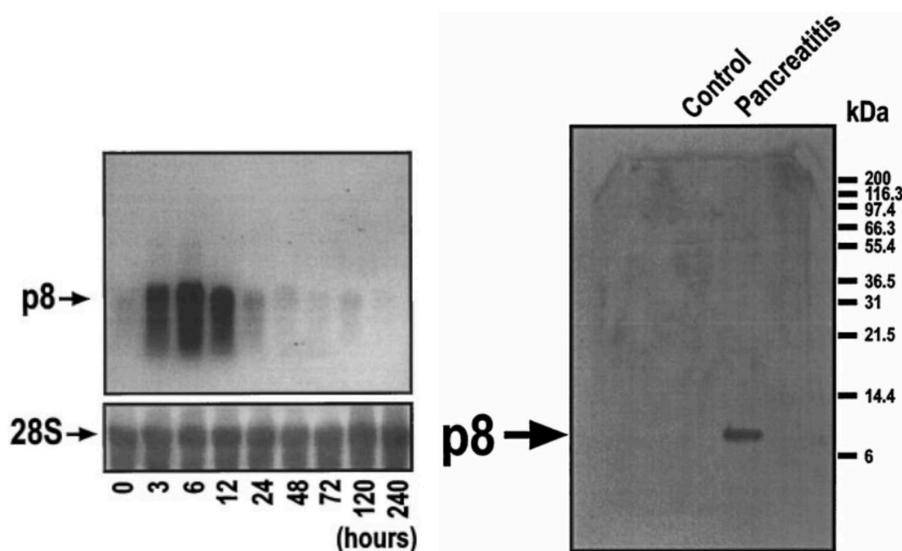
La proteína NUPR1 encaja perfectamente con lo mencionado anteriormente. Se trata de una proteína de estrés celular intrínsecamente desestructurada, sobreexpresada en muchos tipos de tumores, y con evidencia conocida de participar en el desarrollo y progresión de muchos tumores. Uno de los tumores donde más se ha estudiado el papel en la carcinogénesis y el desarrollo de metástasis de la proteína NUPR1 es en el adenocarcinoma ductal de páncreas, por lo que podría resultar útil la investigación de su posible papel como diana terapéutica para el tratamiento de este tipo de tumores.

#### 4.1 Identificación de la proteína NUPR1

El gen que codifica para la proteína NUPR1 (*Nuclear Protein 1*), también conocida como p8 (*molecular mass 8 kDa*) o COM1 (*candidate of metastasis 1*), es el gen NUPR1/p8, que fue aislado por primera vez estudiando la respuesta al estrés en el páncreas al inducir pancreatitis aguda en ratas, enfermedad más frecuente del páncreas exocrino (Mallo et al., 1997). Las células de cualquier organismo responden al estrés causado por una agresión o daño poniendo en marcha un programa de emergencia. En este programa de emergencia se altera el patrón normal o fisiológico de expresión de genes, causando un aumento de la expresión de proteínas de estrés celular y una reducción de la expresión de otras proteínas. Todo ello encaminado a ayudar a las células a sobrevivir en esta situación de estrés celular o ambiente hostil. En el caso de la pancreatitis aguda, esta respuesta es tan rápida y eficaz, que lleva a la autolimitación de la enfermedad. Su programa de emergencia sobreexpresa proteínas codificadas por distintos genes, la mayoría de los cuales actúan para prevenir la evolución y progresión de la pancreatitis, aunque también se sobreexpresan otras proteínas que participan en la regeneración pancreática y la supervivencia de la glándula. Por todo ello resulta interesante estudiar cuál es ese “programa de defensa” de estas células pancreáticas a nivel molecular. Para llevar a cabo este estudio se construyó una librería de cDNA de más de  $4 \times 10^5$  clones a partir del mRNA expresado en ratas a las que se les había inducido pancreatitis aguda. De esta librería de cDNA, más de 280 clones fueron seleccionados y parcialmente secuenciados. Posteriormente, sus secuencias fueron comparadas con la base de datos GenBank y se vio que 59 de las secuencias no estaban relacionadas con ninguna secuencia descrita

## INTRODUCCIÓN

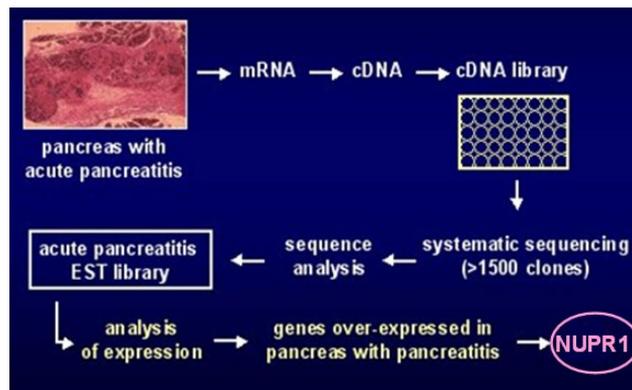
previamente. De estas 59 secuencias, la mayoría solo estaba representada una vez en la librería, sin embargo, uno de estos clones estaba representado varias veces, por lo que se trataba de un gen muy sobreexpresado en la célula ante el estrés causado por la pancreatitis. Así es como se descubrió el nuevo gen p8 que codifica para la proteína NUPR1 en ratas (Mallo et al., 1997). La estructura primaria de la proteína NUPR1 fue deducida simplemente del marco de lectura de la secuencia de nucleótidos. Tal y como se muestra en la Figura I4.1.1.



**Figura I4.1.1:** Imagen extraída de la publicación *Mallo GV et al.* (Mallo et al., 1997) Izquierda: Expresión de RNA mensajero de p8 en páncreas en función de las horas posteriores a la inducción de un proceso de pancreatitis en rata (utilizando ceruleína inyectada intraperitonealmente). Derecha: Confirmación mediante *WesternBlot* de la presencia de la proteína (utilizando un anticuerpo policlonal que reconocía la secuencia de aminoácidos 61-80 de p8 en rata).

Una vez identificado este RNAm se utilizó este cDNA del gen p8 de rata para hacer un cribado de una librería de cDNA de páncreas humano, dando un único clon positivo, que correspondía al equivalente gen p8 en humano, con una homología del 74% con el de rata (Vasseur et al., 1999). El esquema general del proceso de descubrimiento de la proteína NUPR1 se muestra a continuación (Figura I4.1.1)

## INTRODUCCIÓN



**Figura I4.1.1:** Proceso global de la identificación del gen p8 que codifica para la proteína de estrés celular NUPR1

Todo lo posterior a partir de este punto del trabajo hace referencia al gen p8 y la proteína NUPR1 humana.

Estudios posteriores demostraron que, al igual que en la rata, el gen p8 humano es un gen de estrés celular cuya expresión se ve rápidamente inducida en el páncreas durante la pancreatitis aguda, y que codifica la proteína NUPR1 que ayuda al páncreas a protegerse y regenerarse. Además de en páncreas, la proteína NUPR1 se expresa abundantemente en hígado, próstata, ovario, colon, tiroides, tráquea y glándula adrenal; su expresión es moderada en corazón, placenta, pulmón, músculo esquelético, riñón, testículos, intestino delgado, estómago y ganglios linfáticos; y se ha detectado baja expresión de la misma en cerebro, bazo, timo y medula ósea. No se ha encontrado mRNA de NUPR1 en sangre periférica ni leucocitos (Mallo et al., 1997)

Tras el descubrimiento del gen p8 como un gen de respuesta al estrés celular, otros estudios identificaron otro gen, denominado COM1 (Candidato a Metastasis-1) muy sobreexpresado en el cáncer de mama, cuya secuencia era idéntica a la secuencia del gen p8 humano (Ree et al., 2000). Se trata pues de la misma proteína que, aparte de estar muy expresado en la pancreatitis aguda, se expresaba también en el cáncer de mama.

Visto los resultados de la expresión de la proteína NUPR1 no solo en la pancreatitis aguda, sino también en el cáncer de mama, se ampliaron los estudios para analizar la expresión de este gen en otros tipos de tumores y se vio que también su expresión estaba

## INTRODUCCIÓN

alterada (aumentada o disminuida) respecto a sus niveles en tejido sano en muchos tipos de tumores, como los localizados en la glándula pituitaria, páncreas, próstata, tiroides o glioblastomas (Goruppi & Iovanna, 2010).

Concretamente en el caso del adenocarcinoma ductal de páncreas (PDCA), que es el que nos interesa en este trabajo de tesis, se ha demostrado mediante estudios de inmunohistoquímica la sobreexpresión de la proteína NUPR1 tanto en tejido de páncreas canceroso, como en líneas celulares de cáncer de páncreas, siendo sus niveles normales en el cistadenoma mucinoso en el páncreas normal sano (Su et al., 2001). Las células pancreáticas tumorales, y en general todas las células tumorales, tienen que ser capaces de sobrevivir en unas condiciones extremadamente duras (Feig et al., 2012). Por un lado, las condiciones de hipoxia y falta de nutrientes debida a la poca vascularización en los tejidos del tumor, y por otro, a las especies reactivas de oxígeno (ROS) presentes en el microambiente debidas al metabolismo extremadamente alterado de las células transformadas. Todo ello pone en marcha el mecanismo de defensa celular al estrés, en gran parte controlado por la proteína NUPR1, proteína clave en el desarrollo de este tipo de tumores y candidata ideal para el diseño de nuevas drogas (Santofimia-Castaño et al., 2019) (Chen *et al.*, 2018) (Chatterjee & Burns, 2017).

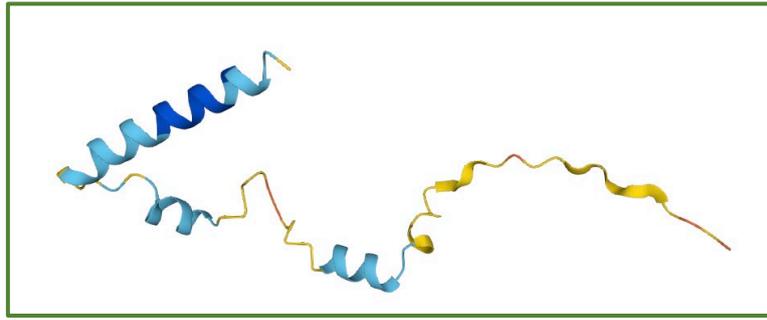
### 4.2 Estructura y características de la proteína NUPR1:

En cuanto a su estructura, la proteína NUPR1 es un polipéptido de 82 aminoácidos, de carácter básico, y una masa molecular teórica de 8.8 kDa (Mallo et al., 1997) cuya secuencia de aminoácidos es:

**MATFPPATSAPQQPPGPEDEDSSLDESDLYSLAHSYLGGGG  
RKGRTKREAAANTNRPSGGHERKLVTKLQNSERKKRGARR**

La representación de su estructura puede verse en la siguiente figura (Figura I4.2.1)

## INTRODUCCIÓN



**Figura I4.2.1:** Imagen extraída de la web: <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/O60356>. En ella se representa a la proteína NUPR1 de 82 aminoácidos (código UniProt 060356) en la que se aprecia su condición de proteína intrínsecamente desestructurada o IDP

Esta proteína humana está codificada por el gen p8, situado en el cromosoma 16, concretamente en la región 16p11.2. Este gen está compuesto por tres exones separados por dos intrones y es un gen muy conservado entre especies, encontrándose homólogos del mismo en mamíferos, *Drosophila* y *Xenopus* (Zinke et al., 2002).

Existe otra isoforma de la proteína denominada isoforma  $\alpha$  que se produce por *splicing* alternativo, y que contiene 18 aminoácidos más, aunque no se le conoce ninguna función. Todos los estudios bioquímicos y moleculares que se han llevado a cabo hasta la fecha de esta proteína se han hecho con isoforma más corta y biológicamente activa  $\beta$ , por lo que todo este trabajo se realizó con esta isoforma (C. E. Cano & Iovanna, 2010).

Tras el descubrimiento de la proteína NUPR1 y, utilizando el programa computacional de predicción de la localización de las proteínas en la célula PSORT ([www.expasy.hcuge.ch](http://www.expasy.hcuge.ch)) se concluyeron varias cosas: en primer lugar, la proteína NUPR1 es una proteína que carece de péptido señal, lo que sugiere que no es una proteína de secreción; tampoco se encuentran en su secuencia regiones transmembrana, por lo que es improbable que se trate de una proteína mitocondrial, lisosomal o anclada al retículo endoplasmático; sin embargo, sí que se aprecia en su extremo COOH-terminal una señal bipartita de localización nuclear. Se trata un dominio canónico bipartito de residuos cargados positivamente, típico de las señales de localización nuclear en humanos (NLS: KLVTKLQNSERKKRGA), lo que sugiere que NUPR1 funciona en el núcleo de la

## INTRODUCCIÓN

célula. De hecho, como se descubrió posteriormente, la proteína NUPR1 se distribuye por toda la célula, núcleo o citoplasma, dependiendo su localización subcelular de las condiciones de crecimiento en la célula (Sandi et al., 2011a) (Valacco *et al.*, 2006). Todos estos datos han sido confirmados posteriormente por inmunofluorescencia en células transfectadas con el gen p8.

También se observó en el extremo N-terminal de la proteína la presencia de una región PEST (Regiones ricas en Pro/Glu/Ser/Thr-rich), que se asocian a proteínas de vida media corta, lo que sugiere una regulación de los niveles de la proteína NUPR1 por el sistema ubiquitina/proteasoma (Goruppi & Kyriakis, 2004).

Otro hecho importante son los datos obtenidos en la predicción de su estructura secundaria. Estos datos muestran que NUPR1 tiene un motivo hélice-bucle-hélice pero que permanece mayoritariamente desplegada, perteneciendo por tanto al grupo de las proteínas intrínsecamente desestructuradas o IDPs (Neira et al., 2011; Santofimia-Castaño et al., 2017). Esta estructura es similar a la de otras proteínas que actúan como proteínas de unión al DNA, por lo que la proteína NUPR1 podría actuar como factor de transcripción uniéndose al DNA. Esta hipótesis está apoyada por la capacidad de la proteína de ser fosforilada/defosforilada, y que podría estar relacionada con la translocación de la proteína al núcleo y su unión al DNA (Mallo et al., 1997) (Vasseur et al., 1999).

En la estructura de NUPR1 también se han identificado dos regiones críticas, identificadas mediante estudios *in silico* y de ingeniería de proteínas (Santofimia-Castaño et al., 2017), que resultan ser las más hidrofóbicas de la cadena proteínica, y que están involucradas en la interacción de la proteína con muchos de sus ligandos naturales (DNA, protimosina- $\alpha$ ...). Estas dos regiones clave para las interacciones de la proteína NUPR1 son: la región de los aminoácidos de las posiciones 30 de la proteína donde se encuentran los únicos dos residuos de tirosina de la proteína; y la región alrededor de la Thr68. Cabe destacar que, en todas estas interacciones, NUPR1 permanece desordenada tras la formación del complejo (Aguado-Llera et al., 2013a)(Aguado-Llera *et al.*, 2013b)(Santofimia-Castaño *et al.*, 2017)

La búsqueda de su homología con otras proteínas humanas en distintas bases de datos no mostró homología de la proteína NUPR1 con otras proteínas humanas de función

## INTRODUCCIÓN

conocida. Sin embargo, estudios bioquímicos de la misma muestran que la proteína tiene algunas propiedades bioquímicas como pueden ser el alto punto isoeléctrico, el peso molecular, los porcentajes de Arg+Lys, Glu+Asp, Ser+Thr, Gly+Pro, la hidrofobicidad, y la separación de las cargas (los residuos cargados negativamente aparecen en el extremo N-terminal y los residuos cargados positivamente en el extremo carboxilo terminal), similares a un grupo de proteínas conocidas. Concretamente NUPR1 muestra cierta similitud con el grupo de proteínas de alta movilidad (HMG), concretamente con las HMG-I/Y. Así pues, aunque no hay una gran homología de secuencia con estas proteínas (solo un 35%), NUPR1 podría ser considerada una HMG-I/Y (Encinar, Mallo, Mizyrycki, Giono, Gonzalez-Ros, et al., 2001). Estas proteínas de alta movilidad son un conjunto de proteínas no histónicas que actúan como elementos arquitectónicos en múltiples procesos dependientes de DNA en el contexto de la cromatina. Se unen al DNA para producir cambios de conformación en la cromatina, e inducen la unión de componentes adicionales necesarios para la activación o inhibición de la transcripción de muchos genes. Junto con las histonas, las proteínas de alta movilidad juegan un papel clave en la regulación de los complejos núcleo-proteicos.

Corroborando lo dicho anteriormente, se descubrió que la proteína NUPR1 se une al DNA independientemente de la secuencia y que es sustrato para la kinasa A, que produce la fosforilación de la misma aumentando el porcentaje de estructura secundaria definida y la unión de la proteína al DNA (aunque tanto las especies fosforiladas como las defosforiladas son capaces de unirse al DNA) (Encinar, Mallo, Mizyrycki, Giono, Gonzalez-Ros, et al., 2001). Además de fosforilada, NUPR1 puede ser acetilada y ubiquitinada, cualidades que, junto con su localización celular apoyan aún más el papel de NUPR1 en la regulación transcripcional de muchos de los genes implicados en importantes procesos celulares (Goruppi et al., 2007b).

Otro hecho interesante que reafirma lo dicho anteriormente, es el hecho de que los análisis de resonancia magnética nuclear (NMR) y dicroísmo circular (CD) de la proteína NUPR1, indican la ausencia de una estructura secundaria estable de la misma en disolución. La forma del espectro obtenido por estas técnicas corresponde a una conformación *random coil*, es decir, una espiral al azar o una cadena aleatoria sin estructura estable. Se trata por lo tanto de una proteína que se encuentra parcialmente desplegada en disolución,

## INTRODUCCIÓN

perteneciendo, al igual que las HMG al grupo de las proteínas intrínsecamente desestructuradas o IDPs, como hemos comentado anteriormente.

Esto está en concordancia con su composición de aminoácidos con alto contenido de Gly y Pro, y bajo contenido de aminoácidos hidrofóbicos, aminoácidos que, como hemos visto, no favorecen una estructura secundaria definida.

Las IDPs se caracterizan por ser proteínas sin estructura secundaria y terciaria estable en disolución, siendo precisamente su unión con otras proteínas lo que promueve la mutua estabilización de sus estructuras en una conformación determinada y la formación del complejo biológicamente activo. Además, las IDPs son proteínas multifuncionales, ya que tienen capacidad de unirse a distintos ligandos, desempeñando distinta función según con cuál de ellos interaccionen.

Todo lo anterior se ve reflejado con nuestra proteína NUPR1 ya que su pequeño tamaño, su falta de estructura tridimensional específica y su localización nuclear-citoplasmática, permite su interacción con varios ligandos distintos y su participación en diferentes vías de señalización celular. Por tanto, la proteína NUPR1, englobada dentro de este grupo de proteínas, desempeña múltiples funciones y está involucrada por tanto en numerosos procesos celulares como veremos a continuación.

### **4.3 Regulación de la expresión de la proteína NUPR1**

Como hemos visto anteriormente, la proteína NUPR1 es una proteína de respuesta al estrés celular que permite a la célula adaptarse a condiciones hostiles para su supervivencia, como son la falta de nutrientes, la hipoxia, los inductores de la apoptosis o los fármacos antineoplásicos.

El promotor de NUPR1 es similar al promotor de otros factores de transcripción implicados en la progresión tumoral, y puede ser activado por numerosas moléculas, ya que NUPR1 está implicada en multitud de rutas de señalización y sus funciones involucran a multitud de señales intracelulares (Shimizu *et al.*, 2007). Unos de los factores de transcripción que regulan la transcripción de NUPR1 con C/EBP $\alpha$  y C/EBP $\beta$ , que están implicados en la supervivencia intravascular de las células tumorales de páncreas. A su

## INTRODUCCIÓN

vez, el promotor de NUPR1 también es activado por NF- $\kappa$ b, el cual posee un papel clave en la supervivencia de las células de cáncer de páncreas.

Además, el promotor de NUPR1 tiene 3 elementos de respuesta a Smad (SRE), condición especialmente interesante en el adenocarcinoma ductal de páncreas, donde se ha demostrado que el complejo supresor de tumores Smad4/DPC4 está mutado en un 50% de los casos. Estos complejos Smad son activados por TGF $\beta$ -1 (García et al., 2001), se acumulan en el núcleo y activan genes con SREs, como el caso de NUPR1, es decir, que TGF $\beta$  activa la expresión de NUPR1 a través de los complejos Smad. Y dado el papel clave que TGF $\beta$  tiene en muchos tipos de cáncer, ya que controla un gran número de procesos incluyendo la proliferación, migración, adhesión, y la diferenciación celular, es posible que realice estos procesos a través de la proteína NUPR1, siendo esta un interruptor de las funciones protumorales que TGF $\beta$  desempeña en las células tumorales.

### 4.3 Funciones de la proteína NUPR1

Como se ha mencionado anteriormente, la proteína NUPR1 es una proteína intrínsecamente desestructurada sin una estructura secundaria definida, y es precisamente esa falta de estructura lo que le dota de la plasticidad necesaria para unirse a distintos ligandos dentro de la célula, lo que dará lugar a múltiples complejos, cada uno con una actividad biológica diferente. Así pues, la proteína NUPR1 es una proteína multifuncional implicada en numerosos procesos celulares, relacionados en su mayoría con el estrés celular por tratarse de una proteína de respuesta al estrés.

La expresión de la proteína NUPR1 está asociada a muchos procesos relacionados con el cáncer, pero también está relacionada con condiciones no tumorales, como veremos a continuación.

Hay que recordar, que la estructura de la proteína y las distintas localizaciones que esta puede tener en la célula dependiendo de las condiciones, la dotan de capacidad para desarrollar muchas funciones distintas.

Por un lado, NUPR1, gracias a su secuencia canónica bipartita, puede estar localizada en el núcleo de la célula, pudiendo comportarse como una proteína de unión al DNA y

## INTRODUCCIÓN

actuando como factor de transcripción de numerosos genes (Hoffmeister et al., 2002) (Malicet, Giroux, et al., 2006a). Esa característica de unión al DNA le hace también participar en otras funciones como el remodelado y la relajación de la cromatina facilitando el acceso de la maquinaria de transcripción celular. Es capaz de unirse a la proteína MSL1 (proteína asociada a la acetiltransferasa de las histonas) en respuesta al daño del DNA en el núcleo de la célula y participar en el proceso de reparación celular, siendo esencial para la supervivencia celular en respuesta al cisplatino. Por esta razón también, NUPR1 podría participar en el mecanismo de reparación del DNA tras la radiación (Gironella et al., 2009).

Por otro lado, NUPR1 puede localizarse en el citoplasma celular pudiendo interactuar allí con diversas proteínas desempeñando las funciones que se enumeran a continuación:

### 1- Apoptosis:

La capacidad de la proteína NUPR1 para regular la apoptosis de células tumorales, por medio del complejo formado por la NUPR1 y la proteína Protimosina- $\alpha$  (complejo NUPR1/Protimosina- $\alpha$ ), ha sido descrita en trabajos previos (Malicet *et al.*, 2006b). La protimosina- $\alpha$  es, al igual que la proteína NUPR1, una pequeña molécula de respuesta al estrés y sin estructura secundaria definida, que forma parte del grupo de las proteínas intrínsecamente desestructuradas o IDPs. Se trata de una proteína ampliamente localizada y bien conservada entre los mamíferos, relacionada con la proliferación celular y la carcinogénesis, la transcripción y el remodelado de la cromatina. Esta proteína, capaz de inhibir la formación del apoptosoma inhibiendo la activación de la caspasa 9, necesita la interacción con la proteína NUPR1 para llevar a cabo su función antiapoptótica (Malicet, Dagorn, et al., 2006). Ambas IDPs interactúan entre sí, estabilizando sus estructuras al formarse el complejo para poder llevar a cabo su función biológica. Ha sido demostrado también que la sobreexpresión de ambas proteínas con la consiguiente sobreexpresión del complejo NUPR1/Protimosina- $\alpha$ , incrementa las propiedades antiapoptóticas de la célula, lo que podría estar relacionado con la resistencia a la apoptosis de las células tumorales pancreáticas debido a un aumento de la expresión de NUPR1 (junto con protimosina- $\alpha$ ). Esto sugiere que el complejo NUPR1/Protimosina- $\alpha$  podría ser una diana interesante para el tratamiento del cáncer de páncreas, ya que cualquier molécula que lo bloqueara, provocaría un aumento en la apoptosis de las células tumorales.

## INTRODUCCIÓN

Por lo dicho anteriormente, hay que destacar otra función importante de la proteína NUPR1: su relación con la resistencia de las células pancreáticas tumorales a los fármacos antineoplásicos utilizados habitualmente. Se ha determinado que, en el mecanismo de resistencia a drogas de este tipo de tumores, entran en juego varios aspectos como son la concentración de droga intracelular, la inactivación rápida de la droga, la tasa aumentada de reparación de DNA en las células tumorales... Aunque el mecanismo preciso de resistencia a la quimioterapia en el cáncer de páncreas no está del todo claro, si han sido demostrados algunos aspectos importantes sobre este mecanismo. Ha sido demostrado, por ejemplo, que la anulación de la expresión de NUPR1 en células tumorales pancreáticas resistentes a la Gemcitabina, promueven la apoptosis de las mismas tras el tratamiento con el fármaco, aumentando pues la sensibilidad al mismo; a la vez que ha sido demostrado también que la sobreexpresión de la proteína aumentaba su resistencia a la Gemcitabina (Giroux et al., 2006)(Tang et al., 2011). Esta podría ser una vía de estudio interesante como tratamiento coadyudante para mejorar la sensibilidad a la Gemcitabina en los pacientes con adenocarcinoma ductal de páncreas.

### 2- Senescencia:

La relación de la proteína NUPR1 con la senescencia celular ha sido estudiada en varios trabajos previos.

Está bien documentado que el paso previo al adenocarcinoma ductal de páncreas es la formación de unas lesiones precursoras denominadas neoplasias intraepiteliales de páncreas (PanINs), cuyo estímulo para su formación son principalmente mutaciones activadoras en el oncogén KRAS. Estas lesiones sufrirán posteriormente diversas mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores hasta que progresen al tumor propiamente dicho. Por lo tanto, es necesaria una mutación iniciadora activadora en KRAS para el desarrollo del cáncer de páncreas, pero esto a su vez, induce en las células un efecto supresor de tumores iniciando procesos de senescencia celular, en un proceso que se conoce como “senescencia inducida por oncogenes”. Aunque a veces, por mecanismos moleculares aún no conocidos del todo, la célula escapa a este control anti-tumoral de la senescencia, produciéndose las lesiones premalignas. En relación con esto, ha sido demostrado en experimentos celulares que la inactivación de NUPR1 induce

## INTRODUCCIÓN

procesos de protección contra el cáncer como son la senescencia en células pancreáticas y la reducción de lesiones PanINs inducidas por la activación de KRAS, mediante la activación de genes implicados en la regulación de la transición G1/S (Hamidi et al., 2012) Por lo que se puede afirmar que NUPR1 coopera con Kras para promover el desarrollo de lesiones pancreáticas preneoplásicas modulando la expresión de genes necesarios para puentear la prevención de la formación del tumor que supone el mecanismo de la senescencia (Hamidi et al., 2012) (Grasso et al., 2014).

Esto confirma el papel de la proteína NUPR1 en la regulación de la senescencia celular inducida por oncogenes en el cáncer de páncreas, pero este mecanismo podría producirse también en otros órganos, con el impacto en el conocimiento del desarrollo del cáncer que esto supondría. También deja abierta la posibilidad de que la intervención temprana en las moléculas inducidas por el estrés celular pudiera ser beneficioso para el manejo de los pacientes con cáncer.

### 3- Adhesión y tumorigénesis:

La adquisición de propiedades como la migración y la invasión de tejidos alejados del tejido original por las células transformadas, es un evento clave en el desarrollo y la diseminación del tumor, de ahí que se hayan llevado a cabo varios estudios sobre la implicación de la proteína NUPR1 en fenómenos como la invasión, la migración e invasión, la adhesión y la tumorigénesis, que forman parte de la invasión de las células tumorales a otros tejidos (Sandi et al., 2011b).

Previamente a este trabajo, fue demostrado que la expresión de NUPR1 es indispensable para el desarrollo del tumor, ya que los fibroblastos transformados deficientes en NUPR1 son incapaces de formar tumores en ratones inmunodeficientes, de lo que se deduce que la expresión de la proteína es necesaria para la implantación de las células tumorales en un tejido extraño (Vasseur et al., 2002).

En el trabajo de Sandi et al. (Sandi et al., 2011b) quedó demostrado además como la expresión de NUPR1 controla la migración celular, la invasión, y la adhesión en las células de cáncer de páncreas, procesos clave para la diseminación celular y las

## INTRODUCCIÓN

metástasis, tan significativas en este tipo de tumores. Este control es debido a que la proteína NUPR1 inhibe la expresión de CDC42, un regulador de la polimerización de actina en el citoesqueleto y responsable directo de esos procesos.

Esto vuelve a poner de manifiesto el importante papel de NUPR1 en la tumorigénesis, y su potencial interés en la terapia del cáncer de páncreas.

### 4- Metástasis:

Es bien conocido que las células tumorales de un tumor sólido que pasan a circulación son incapaces de formar metástasis distantes a menos que estas sean capaces de responder a las condiciones de crecimiento y microambiente ofrecidas por los órganos secundarios.

La proteína NUPR1, se llamó inicialmente factor com-1 o factor candidato a metástasis 1, por haber sido detectado experimentalmente en células de cáncer de mama que tenían la capacidad de metastatizar y estar ausente en las células incapaces de hacerlo (Ree *et al.*, 1999), por lo que NUPR1 fue propuesta como mediadora de la respuesta de las células tumorales para establecerse en un órgano secundario.

Para establecer la implicación de la proteína NUPR1 en la implantación de células tumorales en tejidos extraños, es decir, para dilucidar su papel en las metástasis Cano et al. (C. Cano et al., 2010) desarrollaron un ratón *knock out* para la proteína NUPR1. Cuando se obtenían los fibroblastos transformados del ratón *wild type* para la proteína NUPR1 y se inoculaban en un ratón inmunodeficiente, estas eran capaces de producir tumores en el mismo, mientras que cuando las células inoculadas eran los fibroblastos transformados de los ratones *KO* para la proteína NUPR1 eran incapaces de formar los tumores. Lo mismo demostraron con células MiaPaca2 *ko* y *wil type* para la proteína NUPR1.

Todo esto puso de manifiesto el papel de NUPR1 en la formación de metástasis, siendo la expresión de NUPR1 necesaria para la implantación de las células tumorales en un tejido extraño.(C. Cano et al., 2010)

## INTRODUCCIÓN

### 5- Funciones biológicas no tumorales:

Las funciones biológicas de NUPR1 no están limitadas a la formación y diseminación de tumores, ya que se ha visto que esta proteína está también involucrada en varias funciones relacionadas con la respuesta celular al estrés. A) Se ha visto que NUPR1 está expresada en las islas pancreáticas y en algunas células  $\beta$  pancreáticas, y ha sido definido como mediador fisiológico del crecimiento de las células  $\beta$  inducido por glucosa (Path et al., 2004). B) Además, como hemos explicado anteriormente, NUPR1 se haya sobreexpresada en los procesos de pancreatitis, donde está relacionado con la capacidad de la célula de inducir la expresión de genes antiinflamatorios (Vasseur et al., 2004). C) Ha sido descrito también su papel en patologías cardíacas, siendo la proteína NUPR1 necesaria para la inducción de MMP9 y MMP13 inducida por  $\text{TNF}\alpha$  en los fibroblastos cardíacos. Esto está sustentado por el hecho de haberse encontrado niveles de NUPR1 significativamente incrementados en pacientes con fallo cardíaco, que disminuían con las intervenciones terapéuticas (Goruppi et al., 2007a). D) Se ha detectado también una mayor expresión de la proteína NUPR1 en la hipertrofia de las células mesangiales renales, un evento clave en la enfermedad diabética renal (Courjal et al., 1997).

Todo lo explicado anteriormente indica que NUPR1 es una proteína pequeña intrínsecamente desestructurada implicada en numerosas rutas celulares relacionados con el cáncer, por lo que puede ser considerada una buena diana terapéutica para la investigación de nuevos fármacos antitumorales. El descubrimiento de pequeñas moléculas que interaccionaran con NUPR1 impidiendo la unión a sus ligandos biológicos, conseguiría bloquear muchas de las funciones protumorales de la proteína en la célula. Por ejemplo, una pequeña molécula que evitara la formación del complejo NUPR1/Protimosina  $\alpha$  aumentaría las tasas de apoptosis de las células tumorales pancreáticas; o si esta molécula inhibiera la formación del complejo NUPR1/MSL1, se modularía la reparación del DNA de esas células tumorales.

Aunque la búsqueda de estas moléculas que bloqueen la interacción proteína-proteína de una proteína intrínsecamente desestructurada es un reto, no hay que olvidar que la descripción de una estrategia para llevarla a cabo abriría un gran campo en el desarrollo de fármacos antineoplásicos, ya que gran parte de las proteínas implicadas en cáncer son proteínas intrínsecamente desestructuradas.

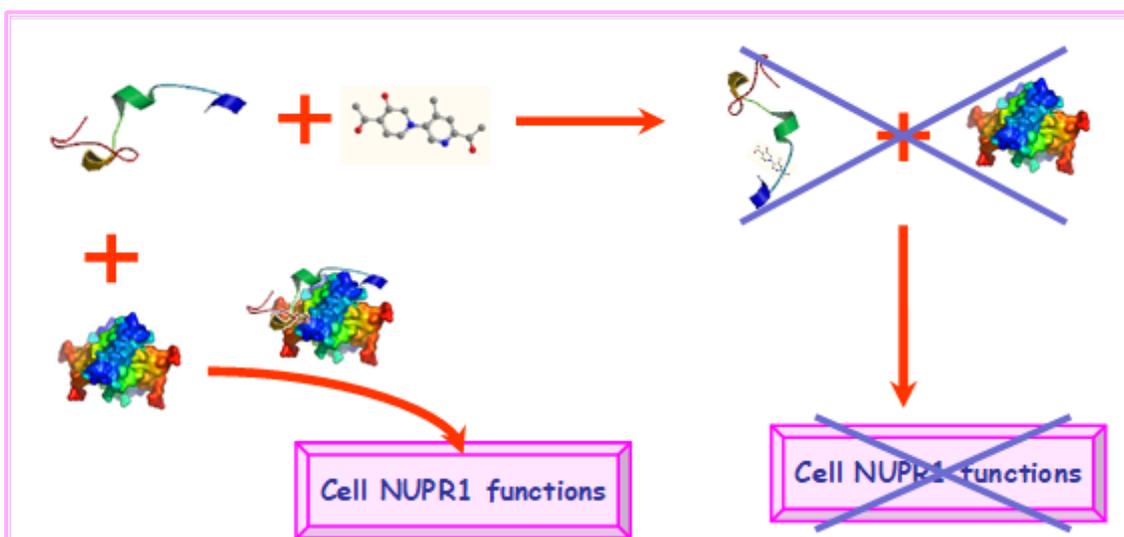
# **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

## HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Todos los estudios reportados previamente a la realización de esta tesis doctoral parecen indicar que NUPR1 es una proteína pequeña intrínsecamente desestructurada (IDP) que está implicada en numerosas rutas celulares, relacionadas muchas de ellas con desarrollo del cáncer, por lo que puede ser considerada una buena diana terapéutica para la investigación de nuevos fármacos antitumorales.

El descubrimiento de pequeñas moléculas que interaccionaran con la IDP NUPR1 impidiendo la unión de la misma a sus ligandos biológicos, podría dar como resultado el bloqueo de muchas de las funciones protumorales que la proteína desempeña la proteína en la célula. Por ejemplo, una pequeña molécula que evitara la formación del complejo NUPR1/Protimosina- $\alpha$ , podría aumentar las tasas de apoptosis de las células tumorales pancreáticas; o si esta molécula inhibiera la formación del complejo NUPR1/MSL1, se modularía la reparación del DNA de esas células transformadas.

Aunque la búsqueda de estas moléculas que bloqueen la interacción proteína-proteína (IPP) de una proteína intrínsecamente desestructurada (IDP) es un reto, no hay que olvidar que la descripción de una estrategia para llevarla a cabo abriría un gran campo en el desarrollo de fármacos antineoplásicos, ya que gran parte de las proteínas implicadas en cáncer son proteínas intrínsecamente desestructuradas.



## HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Así pues, los objetivos que nos planteamos llevar a cabo en la presente tesis doctoral son los siguientes:

### 1. OBJETIVO PRINCIPAL:

Identificación de pequeñas moléculas con potencial efecto terapéutico para el tratamiento del adenocarcinoma ductal de páncreas, mediado a través de su interacción con la proteína intrínsecamente desordenada NUPR1.

### 2. OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- Diseñar una estrategia experimental que permita llevar a cabo un cribado de alto rendimiento que detecte interacción entre pequeñas moléculas químicas y la proteína intrínsecamente desordenada NUPR1.
- Caracterizar la unión de los ligandos previamente identificados con la proteína NUPR1:
  - “*in vitro*” mediante técnicas biofísicas, determinar parámetros de interacción y regiones de unión a la proteína.
  - “*in silico*” mediante métodos computacionales, identificar el tipo de interacciones entre la proteína NUPR1 y los ligandos.
  - “*in cellulo*” mediante técnicas de cultivo de celular, evaluar el efecto del ligando sobre la interacción de la proteína con sus *partners* celulares.
- Determinar el potencial efecto terapéutico de los compuestos:
  - “*in cellulo*”, sobre la viabilidad y capacidad progresión de células tumorales de adenocarcinoma ductal de páncreas.
  - “*in vivo*”, sobre ratones inmunodeficientes con xenoinjertos humanos derivados de adenocarcinoma ductal de páncreas.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

### MATERIALES Y METODOS GENERALES

#### 1. CULTIVOS CELULARES

##### 1.1 Mantenimiento de los cultivos celulares

La línea celular utilizada en este trabajo ha sido la línea celular MiaPaca2 derivada de adenocarcinoma de páncreas, cedida por el Dr. Juan Iovanna del Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (Francia).

El medio de cultivo utilizado para fue DMEN modificado (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) cuya composición es: 4,5 g/l glucosa, L-Glutamina, piruvato de sodio y 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub> (Pan Biotech), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (Pan Biotech), y antibióticos (penicilina 100U/ml y estreptomycin 100µl/ml, conteniendo también L-Glutamina 292 µl/ml, (Gibco by Life Technologies). Este medio se denominará de ahora en adelante, medio DMEN completo.

Las células MiaPaca2, fueron crecidas en un incubador termostatzado (LabLine, Thermo Scientific) a 37°C en una atmósfera de aire con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

Todos los experimentos reflejados en este trabajo se llevaron a cabo cuando las células se encontraban crecidas al 70-80% de confluencia y, para evitar cualquier estrés adicional a las células, todos los medios fueron atemperados a 37°C antes de ser añadidos a las mismas.

A su vez, todas las manipulaciones con células se realizaron en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (modelo PV-30/70, Telstar Life Science Solutions) y con todo el material utilizado, previamente esterilizado en autoclave a 121°C y alta presión durante 20min (Presoclave 75, Selecta).

Las células *knock-out* para la proteína NUPR1 fueron obtenidas en el laboratorio a partir de un modelo de ratón para cáncer pancreático, conocido como Pds1-Cre-Kras<sup>G12D</sup>/INK4<sup>flox/flox</sup> en el cual la proteína NUPR1 está delecionada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2 Tripsinización

Las líneas celulares se cultivaron rutinariamente en frascos de cultivo de 25 o 75 cm<sup>2</sup> realizándose pases de las mismas cuando las células se encontraban formando una monocapa al 75-85% de confluencia, cada 3-4 días ±. Para la realización de los pases se aspiraba el medio de cultivo, se lavaban las células dos veces con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (Pan Biotech) para eliminar los inhibidores de tripsina presentes en el suero y se adicionaba de 1 ml de solución de tripsina 0,05%, 0,02% EDTA en PBS (Pan Biotech). Posteriormente, se incubaban en la estufa a 37° hasta que se observaba al microscopio óptico (Lan Optics) que las células estaban despegadas, momento en el cual eran resuspendidas en medio completo fresco. Tras determinar el número y viabilidad celular como se describe en el punto 1.3, las células eran sembradas en cultivo a una densidad de 7 x 10<sup>5</sup> células en el caso de los frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> y a una densidad de 2,2 x 10<sup>6</sup> células en el caso de los frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>.

### 1.3 Determinación del número de células y su viabilidad

Para la determinación del número de células y su viabilidad se utilizó el método de exclusión del azul Tripán (Sigma-Aldrich). Se mezclaban 50µl de la suspensión celular previamente homogeneizada con 50µl de una solución de azul Tripán al 0.4% en PBS, se colocaba la mezcla en una cámara de Neubauer, y tras esperar 5-10 min se efectuaba el recuento celular (N) de los cuatro cuadrantes de la cámara al microscopio óptico (Lan Optics). Las células no viables, han perdido la integridad de su membrana y permiten al colorante entrar en la célula, dotándolas de un color azul. Por el contrario, las células vivas o apoptóticas, conservan su membrana íntegra, impidiendo la entrada del colorante a la célula.

Para la determinación del número de células y su viabilidad se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Densidad celular (cel/ml)} = (N/4) \times 1.000 \times 2 \times 10$$

$$\% \text{ de Viabilidad} = (\text{células no teñidas (viables)} / \text{células totales}) \times 100$$

### **1.4. Congelación/descongelación de las líneas celulares**

Para la conservación de las líneas celulares se utilizaron tanques de N<sub>2</sub> líquido. Las células se resuspendían en medio DMEN completo suplementado con un 10% de DMSO (Sigma-Aldrich) a una densidad de 2x10<sup>6</sup> células/ml. Los criotubos (Nunc) con las células se colocaban en un recipiente de congelación (Thermo Scientific™ Mr. Frosty™) para conseguir una velocidad de refrigeración muy próxima a -1°C/min, que es la velocidad óptima para la conservación de las células, y se almacenaba en un congelador de -80°C. Tras 24h a -80°C se pasaban al tanque de N<sub>2</sub> líquido.

Para descongelar las células, una vez descongeladas por completo en un baño a 37°C, se resuspendían en 10 ml de DMEN completo atemperado, se centrifugaban 5min a 1,8 rpm (Centrifuge 5702, Eppendorf), y el pellet resultante era resuspendido finalmente en 10ml de medio DMEN completo nuevo.

### **1.5 Detección de micoplasmas en los cultivos celulares mediante ensayo enzimático**

Para la detección de las posibles y frecuentes contaminaciones por micoplasmas en los cultivos celulares, estos se sometieron periódicamente a un test para su detección. El test utilizado (MycoAlert™ mycoplasma detection kit, Lonza) es un test enzimático que detecta la actividad de enzimas específicas de micoplasmas. Brevemente, tras haber permanecido las células un mínimo de 48h en cultivo, se toma una pequeña cantidad de sobrenadante, se centrifuga, y 100µl son añadidos a 100µl del reactivo MycoAlert™ reagent, el cual transforma el ATP en una señal luminosa vía luciferasa. Tras una primera medida de la luminiscencia en este punto, se añaden a la mezcla 100µl del sustrato MycoAlert™ Substrate, el cual reaccionaría con las enzimas de los micoplasmas viables en caso de que hubiese contaminación, produciendo la conversión de ADP en ATP, e incrementando por tanto la cantidad de luz medida en este punto. La relación entre las dos medidas de la luminiscencia, antes y después de añadir el sustrato MycoAlert™, es utilizada para la detección de posibles micoplasmas en la muestra.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El control positivo era proporcionado por el fabricante y como control negativo se preparó la misma mezcla anterior sustituyendo el sobrenadante celular por buffer o H<sub>2</sub>O libre de DNAsas.

Si la muestra no se analizaba de inmediato, el sobrenadante era congelado a -20°C hasta su análisis.

### **2. MODELOS ANIMALES**

El modelo animal utilizado para este trabajo fue el ratón inmunodeficiente NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>/Foxn1<sup>nu</sup>, proporcionado por los laboratorios Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) y mantenidos en la “Casa de Experimentación Animal” del Centre de Cancérologie de Marseille (CRCM) pôle Luminy. Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo a las directrices aprobadas a nivel nacional referentes al tratamiento de animales de laboratorio, y todos los procedimientos experimentales fueron previamente aprobados por el Comité de Ética número 14 de Marsella Tipo de ratones y que se trataron según los protocolos para el bienestar animal

### **3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

#### **3.1 Expresión de la proteína y purificación**

La proteína NUPR1 fue producida y purificada a través de bacterias E. Coli competentes crecidas en medio LB como ha sido previamente descrito (Encinar *et al.* 2001). La proteína fue cedida por el grupo del Dr. Neira del Instituto de Biología Molecular y Celular, de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante).

#### **3.2 Transfección de las células MiaPaca2**

Las células MiaPaca2 fueron sembradas en placas petri P100 a una densidad de  $2,2 \times 10^6$  células/placa y crecidas en estufa durante 24h o hasta el 90% confluencia. Las células

## MATERIALES Y MÉTODOS

fueron entonces transfectadas con los plásmidos correspondientes mediante el reactivo Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Invitrogen by Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las mezclas de reacción utilizadas fueron:

- Mix 1: Control de la transfección: pEGFP-N1:

- ▶ pEGFP-N1 (1×) (3 µg/ µl): 3 µl
- ▶ pcDNA-Ø (0,5x) (1,5 µg/ µl): 6 µl
- ▶ Lipofectamina: 18 µl
- ▶ DMEN sin FBS: 582 µl

- Mix 2: Control negativo de los experimentos: pcDNA3-FlagHIS-Nupr1:

- ▶ pcDNA3-FlagHIS-Nupr1 (1×) (3 µg/ µl):: 3 µl
- ▶ pcDNA-Ø (0,5x) (1,5 µg/ µl): 6 µl
- ▶ Lipofectamina: 18 µl
- ▶ DMEN sin FBS: 582 µl

- Mix 3: Células que expresan ambas proteínas para testar los compuestos: pcDNA3-FlagHIS-Nupr1 + pcDNA4-V5-HIS-MSL1:

- ▶ pcDNA3-FlagHIS-Nupr1 (1×) (3 µg/ µl): 3 µl
- ▶ pcDNA4-V5-HIS-MSL1 (1×) (3 µg/ µl): 3 µl
- ▶ Lipofectamina: 18 µl
- ▶ DMEN sin FBS: 582 µl

Todas las mezclas de reacción fueron incubadas a temperatura ambiente durante 20 min para permitir la formación de los lipocomplejos que albergan el DNA en su interior. Una vez formados los lipocomplejos, las células se lavaron dos veces y se añadieron 4,5 ml de DMEN sin FBS y las mezclas de reacción correspondientes a cada una de las placas. Posteriormente se incubaron 4 h a 37 °C para permitir la fusión de las membranas de los lipocomplejos con las membranas celulares, lo que provoca la integración del DNA en la célula.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para detener la transfección se aspiró el medio anterior de las placas y se añadieron 10 ml de DMEN con FBS al 10%. Las células se dejaron incubando 4h a 37°C antes de pasarlas a las placas correspondientes.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### **1 CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO (*HIGH-THROUGHPUT SCREENING: HTS*)**

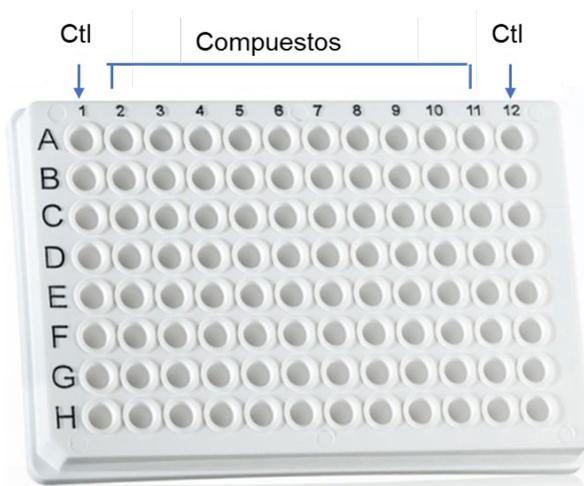
Para identificar los potenciales ligandos de la proteína intrínsecamente desestructurada (IDP) NUPR1, se llevó a cabo un procedimiento experimental de cribado basado en la detección de cambios en el perfil de desnaturalización térmica tras la unión de la proteína a distintos compuestos, respecto al perfil de desnaturalización térmica de la proteína aislada. Estos cambios en el perfil de fluorescencia implicarían una estabilización de la proteína IDP tras la unión del ligando y la formación de un complejo estable entre ambos, tal y como ha sido descrito en trabajos previos como en el estudio de la identificación de pequeñas moléculas inhibitoras de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C (Abian et al., 2013), el estudio de inhibidores de la flavodoxina en *Helicobacter Piloni* (Cremades et al., 2009), o el estudio de chaperonas farmacológicas de la fenilalanina hidroxilasa humana (Pey et al., 2008).

La desnaturalización térmica se llevó a cabo en un espectrofluorímetro de placas FluoDia T70 (PTI: Photon Technology International Inc.), el cual es capaz de medir la fluorescencia emitida por una muestra en un rango variable de temperaturas. Las longitudes de onda utilizadas en los experimentos fueron  $\lambda_{\text{Absorción}} = 390\text{nm}$  y  $\lambda_{\text{Emisión}} = 500\text{nm}$ , y el rango de temperaturas utilizado para la realización de los perfiles, es decir, para llevar a cabo la desnaturalización térmica, fue de  $+5^{\circ}\text{C}$  a  $+75^{\circ}\text{C}$  con una velocidad de barrido de  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y tomando medidas cada  $1^{\circ}\text{C}$ .

Los compuestos elegidos para ser testados fueron los compuestos de la quimioteca *Prestwick Chemical Library*<sup>®</sup> (Prestwick Company, Illkirch, France), compuesta por 1280 pequeñas moléculas orgánicas, todas ellas catalogadas como fármacos o profármacos por la FDA u otras agencias reconocidas. Todos los compuestos de la quimioteca fueron suministrados disueltos en DMSO 100% y a una concentración de 4 mM.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El número total de compuestos a cribar se dividió en 14 placas de 96 pocillos en las que se incluían también 16 controles negativos tal y como se muestra a continuación (Figura MM.1), llevando a cabo el cribado de 88 compuestos en cada placa.



**Figura MM1:** Distribución de las placas de 96 pocillos utilizadas en el cribado de alto rendimiento donde se pueden ver las posiciones de los controles negativos (NUPR1 aislada) y los compuestos (mezcla NUPR1+compuesto) testados en el cribado.

La proteína NUPR1 fue producida y purificada como ha sido descrito previamente (Encinar, Mallo, Mizyrycki, Giono, González-Ros, et al., 2001). Para la elección de la sonda fluorescente necesaria para la monitorización de la fluorescencia de NUPR1, se llevaron a cabo experimentos previos de puesta a punto con las sondas hidrofóbicas *SyproOrange*<sup>®</sup> y ANS (Sigma-Aldrich), teniendo en cuenta que la emisión de fluorescencia de una sonda hidrofóbica aumenta intensamente cuando esta se une a las regiones hidrofóbicas de la proteína expuestas al solvente tras la desnaturalización térmica. En estos experimentos se comparó el perfil de desnaturalización térmica de la sonda (*SyproOrange*<sup>®</sup> o ANS) sola (mezcla 1) con el perfil de desnaturalización térmica de la sonda junto con la proteína (mezcla 2). Ambas mezclas se llevaron a cabo mediante la disolución de sus componentes en DMSO (Sigma-Aldrich), debido a que los compuestos de la quimioteca fueron suministrados disueltos en dicho disolvente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Mezcla 1:

- ▶ Tampón:  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 20 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7$
- ▶ Sonda fluorescente:  $[\text{ANS}] = 23 \text{ }\mu\text{M}$  / Sonda fluorescente:  $[\text{SyproOrange}^{\text{®}}] = 40 \text{ }\mu\text{M}$
- ▶ DMSO: 2.5%

-----  
Volumen<sub>final</sub> = 100  $\mu\text{l}$

### Mezcla 2:

- ▶ Tampón:  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 20 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7$
- ▶ Proteína:  $[\text{NUPR1}] = 4 \text{ }\mu\text{M}$
- ▶ Sonda fluorescente:  $[\text{ANS}] = 23 \text{ }\mu\text{M}$  / Sonda fluorescente:  $[\text{SyproOrange}^{\text{®}}] = 40 \text{ }\mu\text{M}$
- ▶ DMSO: 2.5%

-----  
Volumen<sub>final</sub> = 100  $\mu\text{l}$

Una vez seleccionada la sonda fluorescente ANS, debido a su mayor cambio en el perfil de fluorescencia que el observado con SyproOrange, se obtuvo para cada compuesto su perfil de desnaturalización térmica individual, mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida al aumentar la temperatura de +5°C a +75°C. Las lecturas se realizaron en placas multipocillo cónicas opacas de 96 pocillos (ThermoFast 96 skirted plates, de Thermo Scientific, Madrid, España) y la mezcla de reacción utilizada para cada compuesto fue la que se describe a continuación (mezcla 3). Previamente a la medición, las mezclas fueron incubadas a 25°C durante 30 min cubiertas con 20  $\mu\text{l}$  de aceite mineral para prevenir su evaporación.

### Mezcla 3:

- ▶ Tampón:  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 20 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7$
- ▶ Proteína:  $[\text{NUPR1}] = 4 \text{ }\mu\text{M}$
- ▶ Sonda fluorescente:  $[\text{ANS}] = 100 \text{ }\mu\text{M}$
- ▶ Compuesto de la quimioteca:  $[\text{Ligando}] = 250 \text{ }\mu\text{M}$  (concentración final DMSO: 2.5%)

-----  
Volumen<sub>final</sub> = 100  $\mu\text{l}$ /pocillo

## MATERIALES Y MÉTODOS

Como control negativo del experimento (mezcla 4) se utilizó la mezcla anterior sin el compuesto, utilizando en su lugar DMSO:

### Mezcla 4:

- ▶ Tampón:  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 20 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7$
- ▶ Proteína:  $[\text{NUPR1}] = 4 \text{ }\mu\text{M}$
- ▶ Sonda fluorescente:  $[\text{ANS}] = 100 \text{ }\mu\text{M}$
- ▶ DMSO: 2.5%

-----  
Volumen<sub>final</sub> = 100  $\mu\text{l}$ /pocillo

En todos los experimentos la señal de fluorescencia emitida medida en U.A (Unidades Arbitrarias) se monitorizó en función de la temperatura. Para el análisis de todos los datos obtenidos, se utilizó el software informático Origin 7.0 (OriginLab, Northampton, MA).

La selección de los compuestos fue llevada a cabo en función de las diferencias observadas en los perfiles de desnaturalización térmica de las mezclas NUPR1+ compuesto respecto al perfil de desnaturalización térmica de la proteína de NUPR libre.

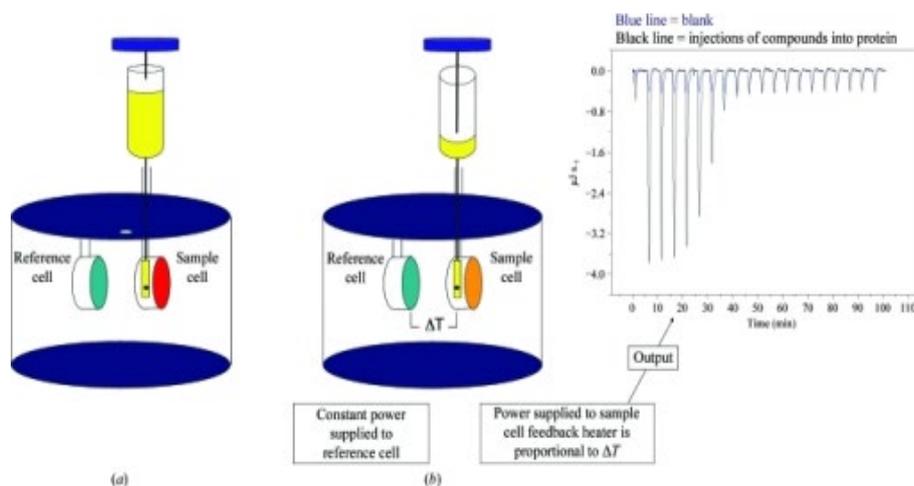
## **2 CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LA INTERACCIÓN NUPR1-COMPUESTO**

### **2.1 CALORIMETRÍA ISOTÉRMICA DE TITULACIÓN (Isothermal Titration Calorimetry: ITC)**

La calorimetría isotérmica de titulación permitió la caracterización termodinámica del complejo resultante entre la proteína NUPR1 y los compuestos seleccionados en el cribado HTS.

Los experimentos de ITC se llevaron a cabo en el calorímetro de alta sensibilidad automático Auto-Itc200 (MicroCa-Marvern Instruments, Malvern UK).

## MATERIALES Y MÉTODOS



**Figura MM2:** Esquema del funcionamiento de un calorímetro y termograma obtenido en la reacción de titulación de una proteína propio del mismo.

Las medidas fueron tomadas a 25°C y 37°C, utilizando una disolución tampón a pH 7 y/o pH 4. Cada experimento individual se llevó a cabo mediante la titulación de la disolución de la proteína NUPR1 con los distintos compuestos, con una concentración de proteína en la celda del dispositivo de 20  $\mu\text{M}$  y una concentración del compuesto dispuesta en la jeringa de 300  $\mu\text{M}$ . El volumen final de la celda fue de 400  $\mu\text{l}$  y el de la jeringa de 150  $\mu\text{l}$ .

Para cada experimento fueron necesarias, por tanto, tres muestras distintas:

- Muestra para el prelavado del sistema:

- ▶ Tampón:  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 20 \mu\text{M}$ , pH = 7;  $[\text{NaAc}] = 20 \mu\text{M}$ , pH = 4.5
- ▶ DMSO: 1,5 %

-----  
Volumen<sub>final</sub> = 400  $\mu\text{l}$

## MATERIALES Y MÉTODOS

### - Muestra de la celda:

- ▶ Tampón:  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 20 \mu\text{M}$ ,  $\text{pH} = 7$ ;  $[\text{NaAc}] = 20 \mu\text{M}$ ,  $\text{pH} = 4.5$
- ▶ DMSO: 1,5 %
- ▶ Proteína:  $[\text{NUPR1}] = 20 \mu\text{M}$

-----  
Volumen<sub>final</sub> = 400  $\mu\text{l}$

### - Muestra de la jeringa:

- ▶ Tampón:  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 20 \mu\text{M}$ ,  $\text{pH} = 7$ ;  $[\text{NaAc}] = 20 \mu\text{M}$ ,  $\text{pH} = 4.5$
- ▶ DMSO: 1,5 %
- ▶ Compuesto:  $[\text{Ligando}] = 300 \mu\text{M}$

-----  
Volumen<sub>final</sub> = 150  $\mu\text{l}$

Previamente a la titulación de la proteína con los compuestos seleccionados en el cribado, el calorímetro fue calibrado mediante la medición del calor de reacción de una titulación típica, la titulación del  $\text{Ca}^{2+}$  del  $\text{CaCl}_2$  con EDTA a 25°C. Las mezclas utilizadas para dicha calibración fueron:

### - Muestra para el prelavado del sistema:

- ▶ Tampón:  $[\text{MES}] = 10 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 5,6$

-----  
Volumen<sub>final</sub> = 400  $\mu\text{l}$

### - Muestra de la celda:

- ▶ Tampón:  $[\text{MES}] = 10 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 5,6$
- ▶  $[\text{EDTA}] = 0,4 \text{ mM}$

-----  
Volumen<sub>final</sub> = 400  $\mu\text{l}$

## MATERIALES Y MÉTODOS

### - Muestra de la jeringa:

- ▶ Tampón: [MES]= 10 mM, pH=5,6
- ▶ [CaCl<sub>2</sub>]= 5 mM

$$\text{Volumen}_{\text{final}} = 150 \mu\text{l}$$

Para la titulación de NUPR1 con los distintos compuestos, todas las muestras fueron degasificadas durante 10 minutos a temperatura ambiente mediante agitación vigorosa para eliminar cualquier pequeña burbuja que pudiera interferir en las mediciones, antes de ser cargadas cuidadosamente en el calorímetro.

En todos los experimentos, se realizaron secuencialmente un total de 19 inyecciones de 2  $\mu\text{l}$  del compuesto contenido en la jeringa a la proteína contenida en la celda, con una velocidad de agitación de 1000 rpm, y separadas por un intervalo de 150 segundos para asegurar que el poder calorífico regresa a la línea base antes de la siguiente inyección.

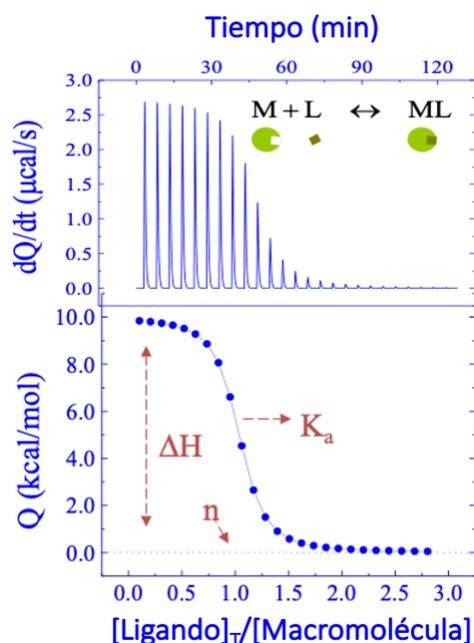
El calorímetro monitoriza la cantidad de calor necesario para mantener la celda de la muestra a la misma temperatura que la celda de referencia (solo contiene agua destilada) después de cada inyección en función del tiempo. El calor implicado en la reacción de interacción entre NUPR1 y los compuestos se calculó mediante la diferencia entre el calor de reacción y el calor de dilución correspondiente, siendo este último un valor estimado y constante durante todo el experimento, e incluido como un parámetro ajustable en el análisis. Los experimentos de control, para asegurar la ausencia de señales ajenas a la interacción proteína-compuesto, consistieron en la inyección del compuesto directamente en tampón, y se llevaron a cabo en las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente. La constante de asociación ( $K_a$ ) y la entalpía ( $\Delta H$ ) de la reacción de interacción entre NUPR1 y los compuestos se obtuvieron directamente del experimento mediante regresión no lineal de los datos experimentales, con un modelo de un único sitio de unión a la proteína.

Los datos obtenidos en los experimentos fueron analizados con el software Origin 7.0 (OriginLab, Northampton, MA).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Un experimento de ITC es una titulación en la que, el compuesto cuya afinidad se quiere estudiar, es inyectado en la muestra que contiene la proteína en una serie de pequeñas alícuotas (2  $\mu$ l en nuestro caso) hasta que la reacción de interacción entre ambos alcanza el equilibrio. Si existe interacción entre las dos moléculas y se produce la formación de un complejo estable entre ellas, cada inyección de compuesto produce un pulso de calor, directamente proporcional a la interacción, lo que da lugar a los distintos picos de los termogramas obtenidos. A partir de los mismos, el área de cada pico se integra con respecto al tiempo y se normaliza por la concentración. Así se genera una curva de titulación Kcal/mol vs las ratios molares de ambas moléculas ( $[\text{compuesto}]/[\text{Nupr1}]$ ), lo que da lugar a las isotermas de interacción o curvas de titulación.

La calorimetría isotérmica de titulación permite a su vez obtener información acerca de la fuerza de la interacción entre la proteína y el ligando ya que proporciona las constantes de afinidad/disociación ( $K_a/K_d$ ) entre ambas moléculas, a la vez que proporciona también otras constantes termodinámicas como la entalpía ( $\Delta H$ ), la entropía ( $\Delta S$ ) o la estequiometría ( $n$ ) del complejo resultante. Las curvas de titulación isoterma resultantes (es decir, el calor diferencial de la interacción normalizado frente al ratio molar de ambas moléculas) son ajustadas a distintos modelos de enlace. En nuestro caso, las isotermas fueron ajustadas a un modelo de interacción simple con un único sitio de unión a la proteína (1:1) del que se deriva la afinidad ( $K_a$ ). La relación molar en el centro de la isoterma de enlace nos da la estequiometría de la reacción ( $n$ ), así como la entalpía ( $\Delta H$ ), que también es derivada directamente de la isoterma, siendo la cantidad de calor liberado por mol del enlace del ligando, como se muestra en la siguiente representación (Figura MM3).



**Figura MM3:** Isoterma de interacción o curva de titulación obtenida en un experimento de calorimetría isoterma de titulación (ITC) y su relación con los distintos parámetros termodinámicos derivados del análisis.

Finalmente, la integración de todos estos datos termodinámicos,  $K_a/K_d$ ,  $\Delta H$ , y  $n$  del complejo resultante proporcionan un perfil termodinámico completo de la interacción molecular entre ambas moléculas (Pierce, et al., 1999).

## 2.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA (*Fluorescence Spectroscopy: FS*)

Para el estudio de la posible unión macromolecular entre la proteína NUPR1 y los compuestos seleccionados en el cribado inicial, se llevaron a cabo experimentos de emisión de fluorescencia, los cuales permiten estudiar cambios conformacionales en el entorno de los aminoácidos aromáticos de una proteína tras su interacción con otra biomolécula.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los espectros de fluorescencia fueron ejecutados en un espectrofluorímetro Cary Eclipse conectado a una celda Peltier termostalizada (ambos de Varian-Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), utilizando una cubeta de medida de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las medidas de la señal de fluorescencia emitida se obtuvieron excitando las tirosinas de la proteína NUPR1 a la longitud de excitación de las mismas ( $\lambda_{\text{Excitación}} = 274 \text{ nm}$ ) y recogiendo el espectro de emisión de fluorescencia en un rango de entre 290-400 nm ( $\lambda_{\text{Emisión}} = 290-400 \text{ nm}$ ). La anchura de las rendijas fue de 5 nm tanto para la longitud de onda de excitación como para la de emisión. El tiempo de integración fue de 1 s y el voltaje aplicado necesitó ser ajustado en función de la concentración de proteína hasta obtener la señal correcta. Todos los experimentos fueron realizados a 25°C y el tiempo de incubación de la mezcla antes de la medición de las lecturas fue de 30 min.

En el ensayo, los espectros del complejo resultante debido a la interacción de la proteína NUPR1 y los distintos compuestos (espectro 1), fueron comparados con la suma del espectro de NUPR1 (espectro 2) más los espectros de cada uno de los compuestos (espectro 3) individualmente. Todos los espectros fueron corregidos restando la línea base correspondiente, tomando como blanco una disolución del tampón con la misma concentración de DMSO que las muestras. Fueron necesarias por tanto tres mezclas para la realización de los experimentos de fluorescencia:

Muestra 1 (Espectro 1) → Complejo NUPR1/ Compuesto:

- ▶ Tampón:  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 20 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7$
- ▶ Proteína:  $[\text{NUPR1}] = 3,2 \text{ }\mu\text{M}$
- ▶ [Compuesto] =  $100 \text{ }\mu\text{M}$

-----  
Volumen<sub>final</sub> = 1 ml

## MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra 2 (Espectro 2) → NUPR1/ DMSO:

- ▶ Tampón:  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 20 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7$
- ▶ Proteína:  $[\text{NUPR1}] = 3,2 \text{ }\mu\text{M}$
- ▶ DMSO: 0,5%

-----  
Volumen<sub>final</sub> = 1 ml

Muestra 3 (Espectro 3) → Compuesto

- ▶ Tampón:  $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = 20 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 7$
- ▶ [Compuesto] = 100  $\mu\text{M}$

-----  
Volumen<sub>final</sub> = 1 ml

Para el caso de los compuestos C13 y C15, se calcularon los espectros diferenciales. Los espectros diferenciales fueron obtenidos mediante la sustracción al espectro del complejo (espectro NUPR1-C13/C15) la suma de los espectros de los componentes individuales (espectro NUPR1+ espectro C1/C15).

### **2.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (*Nuclear Magnetic Resonance*: RMN)**

Para la caracterización a nivel atómico de las interacciones entre la proteína NUPR1 y los compuestos seleccionados en el cribado HTS, se llevaron a cabo experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN), que permiten conocer la localización exacta de los residuos de la proteína sobre los que se produce la interacción. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Neira, en el Instituto de Biología Molecular y Celular, de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Alicante).

Los experimentos de RMN se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Avance DRX-500 (500 Hz) equipado con una sonda de triple resonancia y gradiente z, a 25°C, y en tampón acetato a pH 4,5 según las siguientes concentraciones:

## MATERIALES Y MÉTODOS

- ▶ Tampón NaAc; pH= 4.5
- ▶ Proteína: [NUPR1]= 100  $\mu$ M
- ▶ Compuesto: [Compuesto] = 400  $\mu$ M

Todos los espectros fueron referidos a la referencia externa TSP (*Sodium trimethylsilyl [2,2,3,3-2H4] propionate*).

Se llevaron a cabo espectros bidimensionales de RMN (2D-RMN) de todos los compuestos seleccionados y se aplicaron dos técnicas distintas para el estudio de las interacciones NUPR1-Compuesto de las cuales se obtiene información complementaria:

- Por un lado, se llevaron a cabo experimentos de RMN de correlación heteronuclear: 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (*Heteronuclear Simple Quantum Coherence*) (Bodenhausen & Ruben, 1980):

Los espectros HSQC fueron adquiridos en modo sensible a la fase para la proteína NUPR1 marcada ( $^{15}\text{N}$ -NUPR1), a una concentración de 100  $\mu$ M; o para la proteína NUPR1 marcada ( $^{15}\text{N}$ -NUPR1) a una concentración de 100  $\mu$ M en presencia del correspondiente compuesto a una concentración de 400  $\mu$ M. Ratios similares de proteína/compuesto habían sido usadas en otros estudios (Iconaru et al., 2015) (Krishnan et al., 2014) (Hammoudeh et al., 2009) (A. V. Follis et al., 2008) para estudiar compuestos en IDPs. La discriminación de frecuencias en las dimensiones indirectas se logró utilizando el método echo/antiecho-TPPI (*Time-Proportional Phase Incrementation*). Los espectros fueron adquiridos con 1K puntos complejos en la dimensión del  $^1\text{H}$ , 128 puntos complejos en la dimensión del  $^{15}\text{N}$ , y 200 escaneos. El portador de la dimensión  $^1\text{H}$  fue fijado a la frecuencia del agua (8.00 ppm), y el de  $^{15}\text{N}$  a 120 ppm. Las anchuras espectrales utilizadas fueron de 10 y 35 ppm en las dimensiones del  $^1\text{H}$  y el  $^{15}\text{N}$  respectivamente. La señal del agua fue suprimida con la secuencia WATERGATE (Piotto *et al.*, 1992) para eliminar la señal del agua residual. Los datos fueron rellenados con cero hasta duplicar en número de puntos originales en ambas dimensiones, tratados con la función campana senoidal al cuadrado en las dos dimensiones y transformadas mediante Fourier con el programa TopSpin 1.2. Las asignaciones fueron tomadas de las publicadas previamente (Aguado-Llera et al., 2013b). La intensidad de la señal para cada carrera en el espectro HSQC fue medida usando TopSpin 2.1, teniendo en cuenta, como una referencia interna, la intensidad del último residuo de NUPR1. Únicamente las diferencias

## MATERIALES Y MÉTODOS

en la intensidad de un residuo particular entre el espectro del complejo NUPR1-compuesto y el de la proteína NUPR1 aislada mayores del 10% fueron consideradas significativas.

- Por otro lado, se realizaron experimentos de RMN de espectroscopía de difusión ordenada: DOSY RMN

Las medidas se llevaron a cabo a 25°C tal y como se ha descrito previamente (Czypionka et al., 2007). Los grupos metilo de la proteína NUPR1 con desplazamiento químico entre 1.0 y 0.70 ppm fueron usados para la integración; el valor del coeficiente de difusión traslacional es la media de dos valores medidos. La fuerza del gradiente fue calibrada usando el valor del coeficiente de difusión traslacional para la línea del protón del agua residual en una muestra conteniendo 100% D<sub>2</sub>O en un tubo de 5 mm (Czypionka et al., 2007). Se añadió dioxano a un 1% de concentración final; el radio hidrodinámico, R<sub>h</sub>, de la proteína NUPR1 fue obtenido asumiendo que el R del dioxano es 2.12 Å (Wilkins et al., 1999). El valor fue 22 ± 3 Å, y este fue usado para comparar con el radio de rotación de las moléculas modeladas en las simulaciones de dinámica molecular (MD).

### 2.4 MÉTODOS DE SIMULACIÓN COMPUTACIONALES

Los experimentos de simulación computacional fueron realizados en colaboración con el Dr. Rizzuti, del departamento de física de la Universidad de Calabria en Cosenza (Italia). La simulación computacional o análisis *in silico* consisten en un conjunto de técnicas que permiten estudiar las características generales y las propiedades de unión de una proteína a un ligando, además de la conformación del complejo resultante, únicamente mediante el estudio computacional o bioinformático de su secuencia y su estructura.

Por ello, se llevó a cabo un análisis *in silico* detallado de la proteína NUPR1 para determinar las características y propiedades de unión a la misma de los compuestos seleccionados. La información básica de la proteína NUPR1 se obtuvo del servidor “*Expert Protein Analysis System*”: ExPASy (Instituto Suizo de Bioinformática: SIB). Las estructuras tanto de la proteína como de los compuestos fueron construidas usando el programa de gráficos moleculares *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (Humphrey et al.,

## MATERIALES Y MÉTODOS

1996) para el primer caso, y el sistema de visualización UCSF quimera (Pettersen et al., 2004) para la construcción de la estructura de los compuestos. La proteína NUPR1 fue modelada inicialmente como una cadena extendida. Posteriormente fue colapsada en una simulación de dinámica molecular (MD) en vacío en un tiempo muy corto (15-30 ps), y equilibrada durante 80-200 ns en presencia de agua y 5 contra iones de Cl<sup>-</sup>, siguiendo el modelo de agua simple TIP3P (Jorgensen et al., 1983). Se empleó una caja de dodecaedro rómbico con una distancia mínima de 10 Å del disolvente y se aplicaron condiciones de contorno periódicas. Se llevaron a cabo 16 simulaciones utilizando el paquete GROMACS 4.5 (Pronk et al., 2013) con el campo de fuerza AMBER ff99SB-ILDN (Lindorff-Larsen et al., 2010). Las interacciones electrostáticas de largo alcance se calcularon mediante el método de Ewald de malla de partículas (Essmann et al., 1995). El muestreo se realizó en el conjunto isotérmico-isobárico utilizando un termostato de reescalado de velocidad y un barostato de Berendsen (Berendsen et al., 1984), con valores de referencia de 300 K y 105 Pa, respectivamente.

Las estructuras proteicas se extrajeron de la trayectoria de simulación mediante un análisis de grupos y se utilizaron para realizar experimentos de acoplamiento de compuestos con AutoDock Vina (Trott & Olson, 2009). Se obtuvo una gran variedad de estructuras (8-32 estructuras, dependiendo del procedimiento de agrupación), lo que permitió una amplia evaluación de las propiedades de unión de NUPR1 en el *docking* molecular. Estas múltiples conformaciones de la cadena principal de NUPR1 fueron utilizadas para validar la reproductibilidad de las posiciones de unión y los valores de la energía de afinidad. Además, fue permitida flexibilidad total para cada uno de los ligandos en los cálculos de acoplamiento. En algunos casos de especial interés, se examinó la posibilidad de interacción simultánea de un compuesto con múltiples residuos proteicos seleccionados, cada uno de ellos evaluado individualmente como lugar de unión tanto en los experimentos de RMN como en los experimentos de *docking*, pero distantes entre sí en las estructuras de NUPR1 obtenidas en la simulación. Estos casos se modelaron superponiendo al ligando las porciones correspondientes de la cadena principal de la proteína. Estos complejos, que simulan la presencia de un compuesto en un bolsillo (transitorio) de la proteína, se equilibraron en ejecuciones de MD cortas (2 ns) en las mismas condiciones descritas anteriormente, utilizando además para el ligando el campo de fuerza GAFF (J. Wang et al., 2004).

### 3. ESTUDIOS “IN VITRO” CON CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS HUMANAS

#### 3.1 ENSAYO DE LIGACIÓN POR PROXIMIDAD *IN SITU* (PLA: *PROXIMITY LIGATION ASSAY*)

Para el estudio de la interacción a nivel intracelular entre la proteína NUPR1 y los compuestos seleccionados en el cribado inicial de este trabajo, se utilizó el ensayo de ligación por proximidad *in situ* (PLA) o ensayo de ligación de proteínas. Este ensayo, basado en la técnica de inmunoanálisis, permite detectar y cuantificar las interacciones entre distintas proteínas a nivel intracelular (Weibrecht et al., 2010). Estos experimentos fueron realizados en Marsella con el grupo del Dr. Iovanna, en el Centre de Recherche en Cancerologie de Marseille (CRCM) (INSERM U1068) en Marsella, Francia.

Los experimentos de ligación por proximidad *in situ* o ligación de proteínas fueron realizados mediante el kit *Duolink® In situ* (Olink Bioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante tal y como se resume a continuación:

- Las células utilizadas fueron células MiaPaca2 transfectadas con 300 ng de DNA de las proteínas NUPR1 y MSL1 (plásmidos pcDNA3-FlagHIS-NUPR1 + pcDNA4-V5-HIS-MSL1), mediante el agente de transfección Fugene HDTM (Roche, Meylan, France), según ha sido descrito previamente (Jacobsen et al., 2004). Como controles negativos de los experimentos, se utilizaron células MiaPaca2 transfectadas únicamente con DNA de la proteína NUPR1 (plásmido pcDNA3-FlagHIS-NUPR1).

El objetivo de la transfección es aumentar la concentración intracelular de NUPR1 y MSL1, expresadas de manera natural, pero en baja concentración en las células de cáncer de páncreas MiaPaca2.

- Las células transfectadas fueron crecidas en cubreobjetos de cristal de 10 mm y estos fueron insertados en placas de 24 pocillos, a una densidad de 100.000 células/pocillo en 500 µl medio DMEN completo.
- Tras la incubación de las células en estufa a 37°C durante 24h, estas fueron tratadas con los compuestos seleccionados en el cribado HTS inicial (C1-C15) a

## MATERIALES Y MÉTODOS

una concentración de 10 $\mu$ M, junto con Oxaliplatino a la misma concentración, en medio DMEN completo (500  $\mu$ l/pocillo). El Oxaliplatino es un inductor de daño en el DNA celular. Al estimular el daño, provoca un estrés en la célula, que estimula la interacción de MSL1 con NUPR1 para la formación del complejo de reparación de DNA MSL1-NUPR1 (Aguado-Llera et al., 2013b). Como control positivo del experimento se utilizaron células tratadas únicamente con DMSO ([Compuesto]=0  $\mu$ M), para que la proporción de dicho disolvente fuera la misma que en las células tratadas, ya que los compuestos están disueltos en DMSO. Los controles negativos, es decir, las células transfectadas únicamente con la proteína NUPR1, fueron tratados del mismo modo.

- Tras el tratamiento de las células con los compuestos durante 24h en estufa a 37°C se llevó a cabo la inmunofluorescencia de la técnica PLA propiamente dicha. Para ello, las células fueron lavadas con PBS, fijadas en paraformaldehído durante 6 min, bloqueadas en NH<sub>4</sub>Cl 10 min, y permeabilizadas con Triton X-100 3 min, todo ello a temperatura ambiente (TA). Tras el siguiente paso de bloqueo con el “*bloquink reagent*” del kit Duolink durante 30 min a 37°C, las células fueron incubadas con los dos anticuerpos primarios que posteriormente se conjugarán con las dos sondas empleadas en la técnica de PLA. Dichas sondas están compuestas por un anticuerpo secundario unido a un fragmento de DNA (PLA+: anti-conejo y PLA-: anti-ratón), que se unirán a los anticuerpos primarios.

Los dos anticuerpos primarios utilizados fueron el anticuerpo monoclonal de ratón Anti-V5 (Invitrogen) y el anticuerpo policlonal de conejo Anti- Flag (Santa Cruz. Rabbit polyclonal IgG. Flag-prove (D-8)). La dilución de los anticuerpos utilizada fue de 1:50 y el tiempo de incubación 1h a 37°C en cámara húmeda.

Tras el lavado de las células con tampón A (Tris 0,01 M, NaCl 0,15 M y Tween 20 0,05%), se realizó una segunda incubación de las células, en las mismas condiciones que la anterior, con las sondas PLA+ y PLA- del kit.

Tras el lavado de nuevo de las células con el tampón A y, para la detección de la interacción proteína-compuesto, se agregó la solución de ligación (ligasa, tampón de ligación y oligonucleótidos) y se incubó 30 min a 37°C en cámara húmeda.

Tras la incubación, las células fueron lavadas de nuevo con el tampón A, y la solución de amplificación (polimerasa, nucleótidos y oligonucleótidos

## MATERIALES Y MÉTODOS

fluorescentes y tampón de amplificación) fue añadida, incubando la mezcla 100 min a 37°C en cámara húmeda.

- Para finalizar, las muestras fueron lavadas con tampón B (Tris 0,2 M, NaCl 0,1 M) y fijadas con etanol. Una vez secas las preparaciones, se procedió al montaje de las muestras sobre un portaobjetos con medio de montaje profile+DAPI (Olink Bioscience) y se dejaron toda la noche en la oscuridad.
- La visualización de las preparaciones y la adquisición de las imágenes fue llevada a cabo con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i (Nikon Instruments, Amsterdam, Netherlands). El tratamiento de las imágenes a 40x fue llevado a cabo mediante el software Image J (National Institutes of Health) para estimar el número de puntos rojos que representaban la unión NUPR1-MSL1. La reducción en el número de puntos rojos fluorescentes respecto a los controles, es proporcional a la inhibición de la interacción entre NUPR1 y MSL1 por parte de los compuestos.

### 3.2 ESTUDIOS CELULARES DE LAS CÉLULAS MiaPaca2 TRATADAS CON LOS COMPUESTOS

#### 3.2.1 ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR

Para analizar el efecto citotóxico de los compuestos seleccionados en el cribado inicial C1-C15 sobre líneas celulares de cáncer de páncreas, se utilizó el método colorimétrico “*CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*” (Promega). Este kit utiliza el colorante MTS (MTS: [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]) como marcador del índice de viabilidad celular, siendo la disminución en la formación del compuesto coloreado, monitorizado por la disminución de la absorbancia, proporcional a la disminución de esta viabilidad.

Los experimentos de citotoxicidad celular iniciales se llevaron a cabo en la línea celular MiaPaca2. Las células MiaPaca2 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad

## MATERIALES Y MÉTODOS

de 85.000 células/ml en 100  $\mu$ l de medio DMEN completo. Las placas fueron incubadas en estufa a 37°C durante 24h para permitir la adhesión de las células al fondo de los pocillos, tras lo cual se aspiró el medio, se lavaron las células y estas, fueron tratadas con los compuestos C1-C15 a concentraciones decrecientes haciendo diluciones seriadas. Las concentraciones de compuesto utilizadas fueron desde una concentración de compuesto de 120  $\mu$ M hasta 0  $\mu$ M en el caso del control (120, 60, 30, 15, 7.5, 3.8, 1.7, y 0  $\mu$ M). Como control negativo del experimento se utilizaron las células sin tratar añadiendo la cantidad equivalente de DMSO (0.6%) debido a que los compuestos se encontraban disueltos en este disolvente. Las células tratadas con los compuestos fueron incubadas en estufa a 37°C durante 24, 48 o 72h en tres experimentos independientes.

Posteriormente a la incubación, se llevó a cabo el experimento para valorar la viabilidad de las células tratadas con los compuestos siguiendo el protocolo del fabricante. Para ello, el MTS se diluyó a una dilución 1:4 en medio DMEN completo y 20  $\mu$ l de esta mezcla fueron añadidos a las células. Las placas fueron incubadas en estufa a 37°C durante 3h, tras lo que fueron leídas en el lector de placas (fluorímetro) Synergy HT (BioTek) mediante la medida de las absorbancias de las muestras a 490 nm y 700 nm ( $\lambda$  a la que el compuesto no absorbe). La absorbancia resultante de cada uno de los pocillos se calculó como: Absorbancia = Absorbancia a 490nm - Absorbancia a 700 nm, y la viabilidad celular fue calculada tras la normalización con las células control. Estos experimentos se repitieron por triplicado en 3 experimentos independientes y la significancia estadística asumida fue de p-valor <0.05.

Para los experimentos de viabilidad celular más largos, es decir, con una incubación más larga de las células tratadas que en el caso anterior, las células MiaPaca2 fueron sembradas a una densidad de 10000 células/pocillo en placas de 96 pocillos con medio DMEN completo. Tras una primera incubación a 37°C durante 24h, el medio fue suplementado con 10  $\mu$ M de compuesto (C1-C15) y las células fueron incubadas a 37°C durante 6 días más. Como control negativo del experimento se utilizaron células MiaPaca-2 sin tratar con los compuestos, (se añadió DMSO para igualar la concentración de este disolvente a los compuestos); y como control positivo del mismo, células tratadas con 60 nM de Oxaliplatino, fármaco utilizado habitualmente en el tratamiento de diversos tipos de tumores. Cada experimento fue llevado a cabo en duplicado y repetido 3 veces. Al igual que en el caso anterior, la viabilidad celular fue estimada después de la adición

## MATERIALES Y MÉTODOS

del reactivo de viabilidad *CellTiter-Blue* (Promega, Madrid) según el protocolo suministrado por el fabricante. La viabilidad celular fue medida en el día 6 y normalizada con los porcentajes de las células no tratadas, como en el caso anterior. La significancia estadística asumida fue de p-valor  $\leq 0.1$ ,  $\leq 0.05$ , y  $\leq 0.001$ .

Para estudiar si el efecto citotóxico de los compuestos en los que este efecto era más significativo era dependiente de la proteína NUPR1, se llevaron a cabo experimentos de viabilidad celular tal y como se ha descrito anteriormente con otros dos tipos de líneas celulares. Por un lado, se utilizaron células de modelo de ratón con adenocarcinoma ductal de páncreas modificado genéticamente para no expresar la proteína NUPR1 (knock-out para NUPR1); y por otro, las mismas células de modelo de ratón con adenocarcinoma ductal de páncreas, pero no modificadas genéticamente (*wild type*) que si expresan, por tanto, la proteína NUPR1. Ambos tipos de células fueron sembradas en una placa de 96 pocillos a una densidad de 10000 células/pocillo y tratadas con los compuestos C1, C13 y C15 a una concentración de 10 $\mu$ M durante 6 días. Como control del experimento se utilizaron células sin tratar añadiendo la cantidad equivalente de DMSO (0.6%) debido a que los compuestos se encontraban disueltos en dicho disolvente. Los cálculos de la viabilidad celular se llevaron a cabo de la misma manera que en el caso anterior, y al igual que en este, la significancia estadística asumida fue de p-valor  $\leq 0.1$ ,  $\leq 0.05$ , y  $\leq 0.0001$ .

Finalmente, para ir más allá y estudiar el efecto de los compuestos en la sensibilidad de las células MiaPaca-2 a los fármacos quimioterápicos estándares, se llevaron a cabo de nuevo experimentos de viabilidad celular tal y como se ha descrito anteriormente con la diferencia de que, en este caso, las células fueron tratadas con la combinación del compuesto más Gemcitabina u Oxaliplatino. El experimento se llevó a cabo con compuesto C15, por ser uno de los compuestos más prometedores según los resultados previos. Las células MiaPaca2 fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 10000 células/pocillo con medio DMEN completo. Tras 24h de incubación a 37°C las células fueron suplementadas con concentraciones crecientes de compuesto C15, con Gemcitabina u Oxaliplatino a concentraciones creciente desde 1 nM a 1 mM; o con la combinación de las anteriores más compuesto C15 a una concentración de 10  $\mu$ M. Las combinaciones utilizadas fueron por tanto: compuesto C15, Gemcitabina, Gemcitabina+compuesto C15, Oxaliplatino, y Oxaliplatino+compuesto C15. Las células fueron incubadas con los distintos tratamientos durante 3 días a 37°C tras lo que se

## MATERIALES Y MÉTODOS

llevaron a cabo los experimentos de citotoxicidad celular con el reactivo *CellTiter-Blue* como se ha descrito previamente. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado de manera independiente, y la significancia estadística asumida fue, al igual que en los casos anteriores de p-valor  $\leq 0.1$ ,  $\leq 0.05$ , y  $\leq 0.0001$ .

### 3.2.2 ESTUDIOS CELULARES A TIEMPO REAL: iCELLigence assays

Para llevar a cabo estudios celulares a tiempo real, se utilizó, en colaboración con el grupo del Dr. Iovanna, en el Centre de Recherche en Cancerologie de Marseille (CRCM) (INSERM U1068) en Marsella, Francia, el analizador celular a tiempo real de iCELLigence E-plate (ACEA Biosciences, San Diego, CA), que permite entre otras cosas, la monitorización de la proliferación celular durante todo el periodo del experimento. Este ensayo, basado en la medición de la impedancia de los biosensores insertados en los pocillos, permite evaluar la viabilidad y la toxicidad celular. Las células MiaPaca2 fueron sembradas en los 16 pocillos del sistema a una densidad de 40000 células/pocillo con medio DMEN completo. Tras 7h de incubación, las células fueron tratadas con 10 $\mu$ M de compuesto C15, 60 nM de Gemcitabina, o 4 $\mu$ M de Oxaliplatino. Las células fueron incubadas en estufa con los tratamientos administrados durante 3 días. El valor de la impedancia de cada pocillo fue monitorizado automáticamente por el sistema iCELLigence durante 3 días y expresado como CI (índice celular).

El valor estadístico asumido fue de p-valor  $\leq 0.1$ ,  $\leq 0.05$  y  $\leq 0.001$ .

### 3.2.3 ESTUDIOS DE CICATRIZACIÓN DE HERIDAS (Wound Healing Assay)

Para estudiar el efecto que tienen los compuestos sobre una de las características de las células tumorales que las diferencia de las células sanas, como es su capacidad de migración a sitios lejanos de su lugar de origen para dar lugar a las metástasis, se realizaron estudios de cicatrización de heridas.

Concretamente, estos estudios se llevaron a cabo con aquellos compuestos en los que se había observado previamente cierto efecto citotóxico sobre las células MiaPaca2. Para la realización de los mismos, las células MiaPaca2 fueron sembradas en placas de 24

## MATERIALES Y MÉTODOS

pocillos a una densidad de 10.000 células/pocillo con 500 µl de medio DMEN completo y fueron incubadas en estufa a 37°C hasta que su crecimiento llegó a una monocapa al 80-90% de confluencia, lo que vino a ser en unas 48h±. En este momento, se realizó una “herida o brecha” en la zona central del pocillo de cultivo mediante una punta (P200) de pipeta estéril. Una vez realizada la herida, las células se lavaron 5 veces con PBS para eliminar los restos celulares generados. Inmediatamente después se añadieron a cada pocillo 500 µl de medio DMEN sin FBS para minimizar la proliferación celular, junto con los compuestos C1, C2, C6, C7, C11, C12, C13 y C15, a una concentración de 10µM. Como control del experimento se sustituyó la adición del compuesto por DMSO en la misma proporción, para igualar la proporción del disolvente en todos los casos.

La migración de las células a través de la “cicatriz de la herida inducida” se monitorizó mediante el sistema de microscopia multidimensional Leica DMI 6000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Las imágenes fueron capturadas con el objetivo de 10x a distintos tiempos (t=0, 24h, y 48h) con una cámara digital acoplada al mismo que permitía observar la migración de las células y la “cicatrización de la herida inducida”. Los tiempos utilizados fueron: tiempo 0h o instante en el que se realizó la herida y se añadieron los compuestos; tiempo 24h, tras 24h de incubación de las células con los compuestos en estufa a 37°C; y tiempo 48h, tras 48h de incubación de las células con los compuestos a 37°C. Tras la captura de las imágenes, estas fueron tratadas con el software de análisis del microscopio MetaMorph MM AF (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) y el programa ImageJ. La comparación de los tratamientos fue evaluada para probar la significancia estadística usando el test estadístico t-Student asumiendo un p-valor<0.05.

### **3.2.4 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE COLONIAS EN SOFT AGAR**

Otra de las características de las células tumorales que las diferencia de las células sanas, es su capacidad para sobrevivir y formar colonias sin anclarse a ninguna superficie sólida, lo que da idea del potencial tumorigénico y la capacidad metastática de estas células. Para ver el efecto que tienen los compuestos sobre esta característica de las células tumorales, se llevaron a cabo experimentos de formación de colonias en soft-agar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Previamente a la siembra en las placas de agar, las células tumorales MiaPaca2 fueron tratadas con los compuestos que habían demostrado tener actividad citotóxica sobre estas células, los compuestos C1, C2, C6, C7, C11, C12, C13 y C15. Para ello, las células MiaPaca2 fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 150.000 células/ml con 2 ml de medio DMEN completo. Las placas fueron incubadas en estufa a 37°C durante 24h, tras lo que se procedió a la aspiración del medio, el lavado de las células y su tratamiento con los compuestos disueltos en 2 ml de medio DMEN estéril a dos concentraciones distintas: 50 y 10  $\mu$ M. Las células fueron incubadas nuevamente a 37°C durante 48h, tras lo que fueron tripsinizadas y sembradas en las placas de agar.

Para la preparación de las placas de agar se utilizaron placas de 6 pocillos, una disolución de stock de agar noble (Sigma Aldrich) al 1,8%, y una disolución de medio DMEN completo 2x. Como capa base de agar se utilizó 1,5 ml de agar al 0,6% en medio DMEN completo (1 ml medio DMEN 2x, 0,35 ml de agua desionizada y 0,65 ml de la disolución stock de agar). La mezcla se vertió en los pocillos y se dejó solidificar. Posteriormente, las células tripsinizadas y homogeneizadas en el paso anterior se resuspendieron a una densidad de 7000 células viables/pocillo en una mezcla de agar noble al 0,3% en medio DMEN completo (0,625 ml medio DMEN 2x, 0,415 ml de células más agua desionizada y 0,21 ml de la disolución stock de agar). 1 ml de la mezcla anterior se vertió sobre la base de agar preparada anteriormente y tras su solidificación, fue cubierta por 1 ml de medio DMEN 1x. Las placas se mantuvieron en cultivo a 37°C durante 3 semanas, cambiando el medio de cultivo cada 3-4 días. Transcurrido ese tiempo, las células fueron teñidas con 0,5 ml de cristal violeta (Sigma Aldrich) al 0,005% y 25% metanol en PBS durante 90 min a temperatura ambiente. Las colonias fueron observadas con el sistema de microscopía multidimensional Leica DMI 6000B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) y fotografiadas con el transiluminador Safe Imager (Invitrogen). Posteriormente, las imágenes fueron analizadas mediante el software del microscopio MMAF (MetaMorph) para contar el número de colonias formadas compuestas por más de 20 células. La comparación de los tratamientos fue evaluada con el test estadístico t-Student asumiendo un p-valor<0.05.

### 4. EXPERIMENTOS “IN VIVO” EN ANIMALES MODELO

Una vez que el efecto del compuesto más prometedor, el compuesto C15, quedó demostrado a nivel celular, se procedió al estudio de su efecto en un modelo “in vivo”. Para lo cual, se llevaron a cabo experimentos en modelo de ratón en colaboración con el laboratorio dirigido por el Dr. Iovanna, localizado en la universidad de Aix-Marsella (Francia), concretamente en el Centre de Recherche en Cancerologie de Marsella (CRCM), INSERM.

El modelo de ratón utilizado para este trabajo fue el ratón NMRI-Foxn1<sup>nu</sup>/Foxn1<sup>nu</sup>, un ratón inmunodeficiente en el que se implantó un xenoinjerto humano, es decir, un tumor derivado de células de adenocarcinoma ductal de páncreas humano. Dichos ratones fueron proporcionados por los laboratorios Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) y mantenidos en la “Casa de Experimentación Animal” del Centre de Cancérologie de Marseille (CRCM) pôle Luminy. Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo a las directrices aprobadas a nivel nacional referentes al tratamiento de animales de laboratorio, y todos los procedimientos experimentales fueron previamente aprobados por el Comité de Ética número 14 de Marsella.

Para inducir el tumor derivado de células humanas en los ratones inmunodeficientes, 10 millones de células MiaPaCa-2 fueron inoculadas por vía subcutánea a ratones inmunodeficientes NMRI-NUDE de 8 semanas de vida. Cuando el volumen de los tumores alcanzó aproximadamente los 400 mm<sup>3</sup>, se iniciaron los tratamientos. Los ratones fueron separados en 3 grupos de 6 sujetos cada uno. Cada uno de los grupos fue tratado diariamente con suero fisiológico en el caso del grupo control, o con el compuesto C15 a una concentración de 5 mg / kg, o 10 mg / kg respectivamente en los otros dos grupos de ratones. Cada 5 días, el peso y volumen de los tumores fueron medidos. Finalmente, los ratones se sacrificaron después de 35 días de tratamiento.

Para el análisis estadístico de los datos se aplicó el test estadístico de análisis de la varianza con una significación estadística de p-valor  $\leq 0.1$ ,  $\leq 0.05$ ,  $\leq 0.001$ .

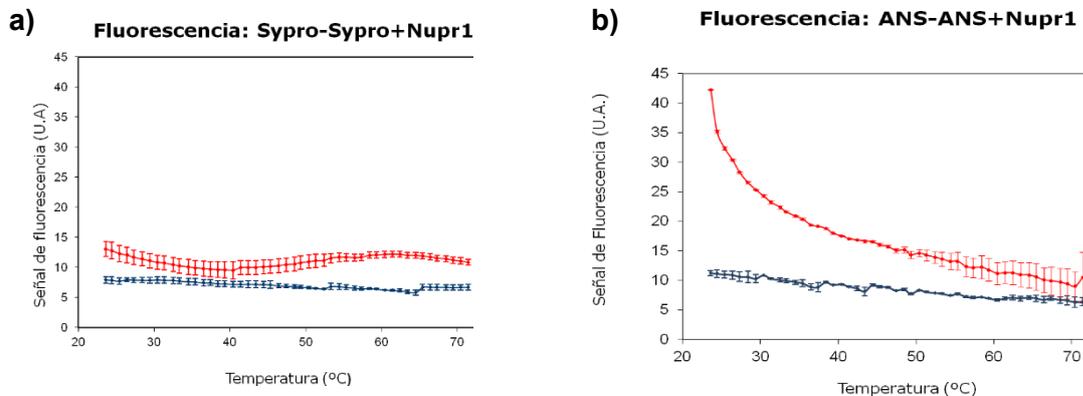
# **RESULTADOS**

## RESULTADOS

### 1 CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO (HTS): IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES LIGANDOS DE LA PROTEÍNA NUPR1

#### Puesta a punto del cribado de alto rendimiento:

El primer paso para la puesta a punto del método fue la elección de una sonda que, una vez unida a nuestra proteína diana NUPR1, permitiera obtener una señal de fluorescencia para el seguimiento de los experimentos. Para la elección de la más adecuada, se ensayaron las sondas ANS y *SyproOrange*®. Ambas sondas se unen a los núcleos hidrofóbicos de las proteínas, pero pueden mostrar comportamientos distintos a medida que aumenta la temperatura y se desnaturaliza la proteína. Para comprobar la unión de ambas sondas a NUPR1, se compararon los perfiles de fluorescencia de la sonda (ANS o *SyproOrange*®), cuando la temperatura aumentaba de 25°C a 75°C, es decir, su perfil de desnaturalización térmica, en presencia y ausencia de la proteína NUPR1, utilizando DMSO como disolvente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura R1.1.



**Figura R1.1:** Perfiles de fluorescencia (fluorescencia emitida) obtenidos al llevar a cabo el perfil de desnaturalización térmica ( $T^a$  25-75°C) de las sondas fluorescentes: a) *SyproOrange*, en ausencia (línea azul) y en presencia de la proteína NUPR1 (línea roja) en ambos casos con solvente DMSO (2.5%) y en concentraciones de  $[Sypro]= 5X$  y de  $[NUPR1]= 4\mu M$ ; b) ANS en ausencia (línea azul) y en presencia de la proteína NUPR1 (línea roja) en ambos casos con solvente DMSO (2.5%) y en concentraciones de ( $[NUPR1]= 4\mu M$ ,  $[ANS]= 23 \mu M$ ). Las barras de error representan las desviaciones estándar correspondientes a 3 medidas independientes.

## RESULTADOS

Como se puede observar en la gráfica anterior (Figura R1.1), los perfiles de fluorescencia emitida durante la desnaturalización térmica de ambas sondas en ausencia de proteína en el medio no mostraron prácticamente variación en la señal de fluorescencia al aumentar la temperatura. Sin embargo, cuando el mismo proceso de desnaturalización térmica se produce en presencia de la proteína NUPR1, tanto en el caso de ANS como en *SyproOrange*, se observaron cambios en el perfil de desnaturalización por fluorescencia respecto a los perfiles de las sondas en ausencia de proteína. Esta alteración indicaría la existencia de interacción entre las sondas y la proteína presente en el medio. En el caso de la sonda *SyproOrange*<sup>®</sup> (R1.1.a), este cambio en el perfil de fluorescencia fue menor que para ANS (R1.1.b), donde se apreció una mayor diferencia entre los perfiles en ausencia y en presencia de proteína. La señal de fluorescencia fue un poco mayor a temperaturas bajas, siendo este hecho compatible con una mayor exposición de las zonas hidrófobas de la estructura de la proteína, al tratarse NUPR1 de una proteína intrínsecamente desestructurada. Originalmente, la proteína se encuentra desplegada, con los residuos hidrofóbicos expuestos en su superficie, por lo que la sonda se unirá, aunque al ser una proteína de pequeño tamaño, la señal no es muy intensa. A medida que aumenta la temperatura, la proteína, que inicialmente ya tenía muy poca estructura, no expone más residuos hidrofóbicos, por lo que la señal de fluorescencia únicamente experimenta un decaimiento debido al propio decaimiento de la fluorescencia (Badea *et al.*, 1979). Debido a su mayor intensidad de señal de fluorescencia partida al comienzo de la desnaturalización, se seleccionó la sonda ANS para continuar con los experimentos.

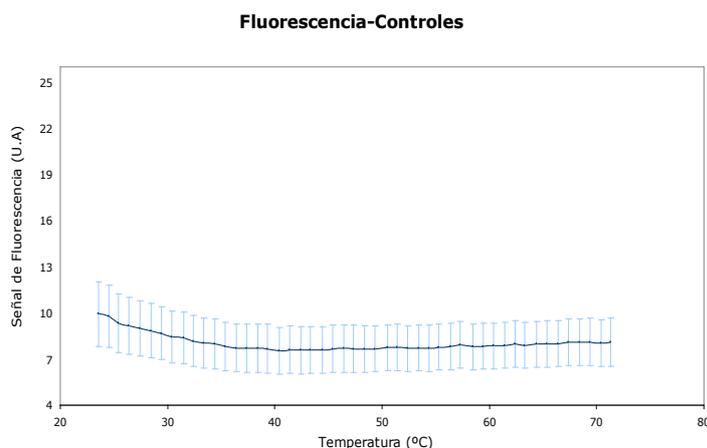
Otro de los puntos a tener en cuenta para la puesta a punto del cribado fue la influencia del disolvente DMSO. La quimioteca que se pretende utilizar en este trabajo tiene sus compuestos disueltos en DMSO (100%), por lo que todos los ensayos de puesta a punto de este trabajo se llevaron a cabo con DMSO al 2.5% (este % de DMSO es el que resulta cuando se utiliza una cantidad típica compuesto, 2.5  $\mu$ L, procedente de la librería de compuestos para 100  $\mu$ L de volumen final de pocillo de la placa de cribado). Por otro lado, se ensayaron distintas concentraciones de proteína y ANS hasta obtener las concentraciones de ambas que emitían la máxima señal (datos no mostrados) y que resultaron ser [NUPR1]=4 $\mu$ M y [ANS]=100  $\mu$ M tal y como se refiere en la sección de materiales y métodos.

## RESULTADOS

### Cribado de alto rendimiento:

Una vez puesto a punto el experimento, se llevó a cabo el cribado con los compuestos de la quimioteca.

Es muy importante incluir en las placas de cribado controles negativos, es decir, pocillos que no contuviesen ningún compuesto de la librería, pero sí que incluyesen el solvente en el que están disueltos (DMSO), para que la proteína tuviera la misma exposición a este solvente orgánico que en los pocillos de los compuestos que se van a testar. De esta forma el posible efecto del DMSO sobre la proteína, sería el mismo en todos los casos. En estos controles, se analizó el perfil de desnaturalización térmica de la mezcla, a las concentraciones previamente definidas, formada por la proteína NUPR1 en tampón fosfato, la sonda ANS y el DMSO.



**Figura R1.2:** Controles negativos de las placas de cribado de alto rendimiento: Perfil de fluorescencia en la desnaturalización térmica ( $T^a$  25-75°C) de la mezcla formada por la sonda ANS ([ANS]= 100 $\mu$ M), la proteína NUPR1 ([NUPR1]= 4 $\mu$ M), y DMSO ([DMSO]= 2.5%) en tampón fosfato sódico. Las barras de error representan las desviaciones estándar correspondientes a 16 medidas recogidas de forma independiente.

## RESULTADOS

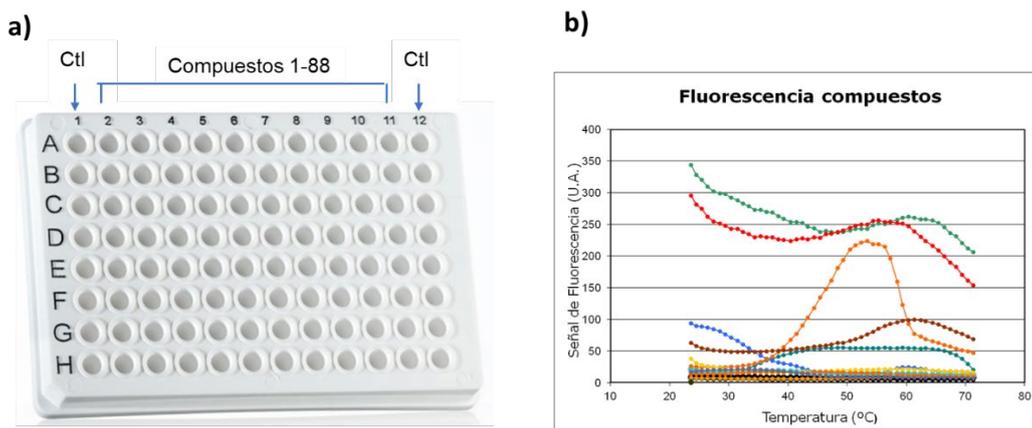
El comportamiento de los controles negativos fue el mostrado en la figura anterior (Figura R1.2). Como se esperaba, no se observó ningún cambio significativo de la intensidad de fluorescencia emitida al llevar a cabo la desnaturalización térmica. Además, la desviación estándar de la intensidad de la señal en las réplicas realizadas fue de entorno al 5-10% lo que entra dentro del error experimental esperado.

El cribado de los 1280 compuestos de la quimioteca, que se encontraban disponibles en formato de 14 placas de compuestos, se llevó a cabo en las mismas condiciones que en el caso de los controles negativos, pero sustituyendo el DMSO por los distintos compuestos contenidos en los pocillos de las placas de la quimioteca. De esta forma, se testaron cada una de las placas de los compuestos y dado que dichas placas tienen vacíos los pocillos de las columnas 1 y 12, se aprovecharon para incluir en la placa cribado, los controles negativos. Estos nos van a servir tanto para determinar el correcto desarrollo de la desnaturalización térmica de los pocillos con compuesto, como también como referencia para la identificación de aquellos compuestos que resulten positivos en el cribado.

Las mezclas formadas por la proteína NUPR1, la sonda ANS, y los distintos compuestos, todos ellos en tampón fosfato sódico ( $[NUPR1]=4\mu\text{M}$ ;  $[ANS]=100\ \mu\text{M}$ ;  $[Compuesto]=250\ \mu\text{M}$ ), se sometieron a una desnaturalización térmica ( $T^a\ 25-75^{\circ}\text{C}$ ) y se registró la fluorescencia emitida en cada caso. El número total de compuestos a cribar se dividieron en 14 placas de 96 pocillos en las que se incluían también 16 controles negativos tal y como se muestra representado en la Figura R1.3.a.

A modo de ejemplo, se muestran los resultados obtenidos en una de las 14 placas (Placa N°1) en la Figura R1.3.b:

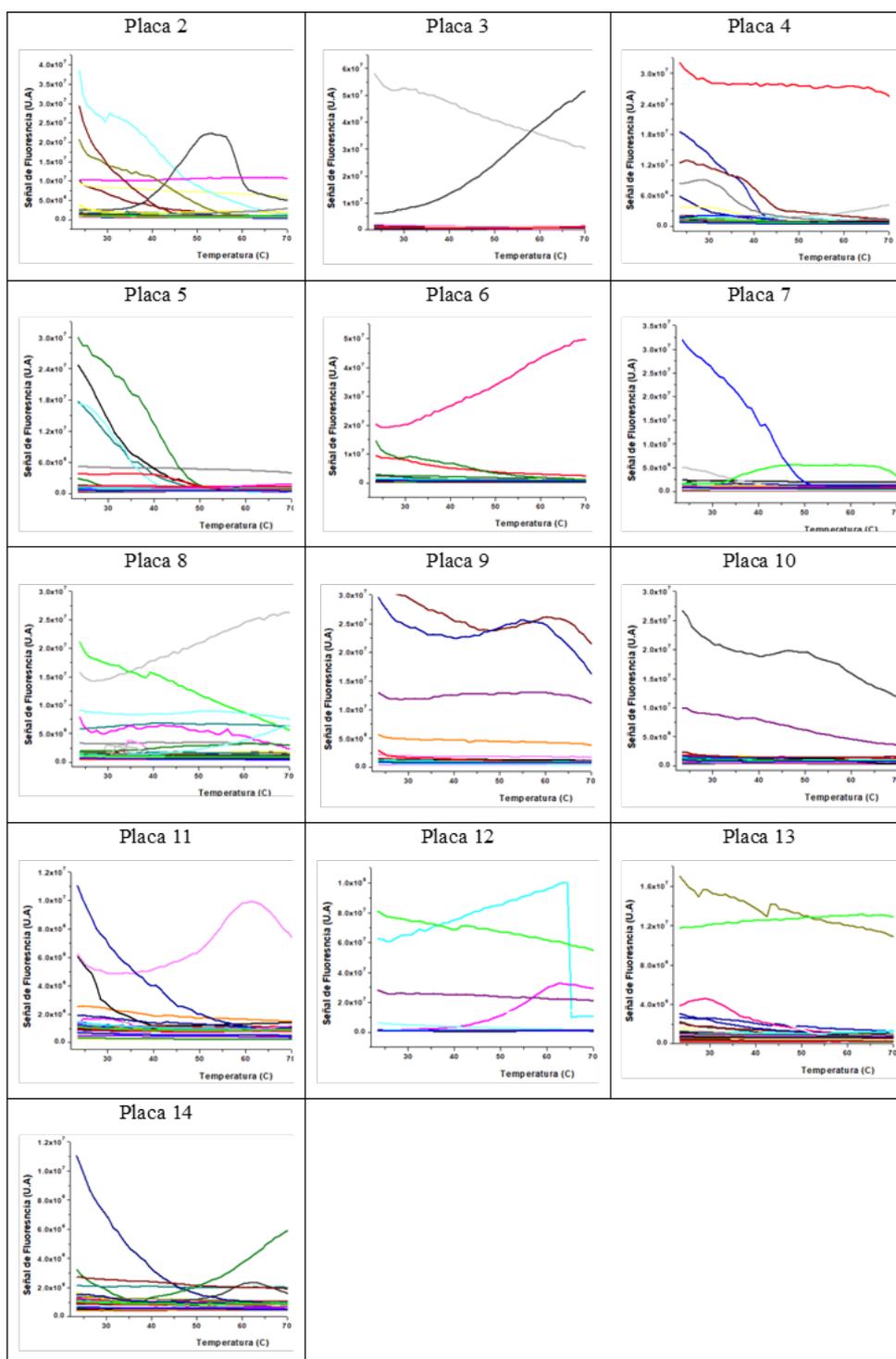
## RESULTADOS



**Figura R1.3:** Cribado de alto rendimiento. a) Diseño de la placa N°1 utilizada para el cribado de los compuestos de la quimioteca, donde se indican las posiciones de los controles negativos y los compuestos testados. El diseño de las placas restantes fue similar exceptuando los compuestos añadidos, que variaban según cada una de las 14 placas de la quimioteca. b) Perfil de fluorescencia obtenido en la desnaturalización térmica (Tª 25-75°C) de la mezcla formada por la proteína NUPR1, la sonda ANS, los 16 controles negativos y los 88 compuestos testados en la placa N°1 donde se observa la fluorescencia emitida tanto por los controles negativos, como por los 88 compuestos testados en la placa ([ANS]= 100µM); proteína NUPR1 ([NUPR1]= 4µM), y ([Compuesto]= 250µM).

Al comparar los perfiles de desnaturalización térmica de la mezcla NUPR1+compuesto (líneas de colores) frente al comportamiento de la proteína NUPR1 aislada, es decir, el control negativo (líneas negras), se observaron dos tipos de compuestos, tal y como muestra la figura R1.3.b. En la mayoría de los compuestos (compuestos negativos que no sufrían interacción con la proteína) no se observó una variación importante en la forma del perfil de fluorescencia en todo el gradiente de temperatura, comportándose igual que los controles negativos. Sin embargo, en un grupo reducido de compuestos, fueron observadas variaciones importantes en dicho perfil de desnaturalización térmica (R1.3.b). Esta placa es representativa de lo observado en el resto de las placas (Figura R1.4), en las que la mayoría de los compuestos mostraban un perfil de fluorescencia similar a los controles negativos, pero en las que también se observaba algún compuesto con variaciones importantes en dicho perfil como en el caso anterior.

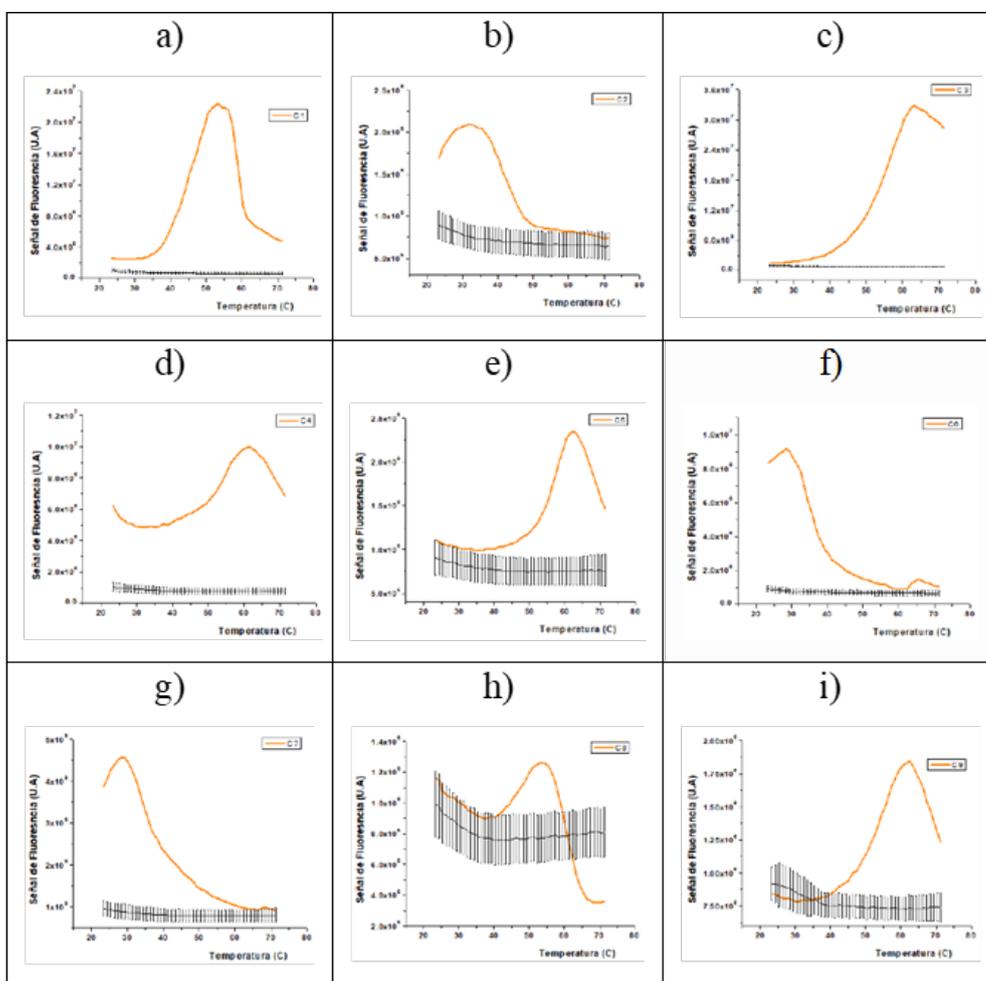
## RESULTADOS



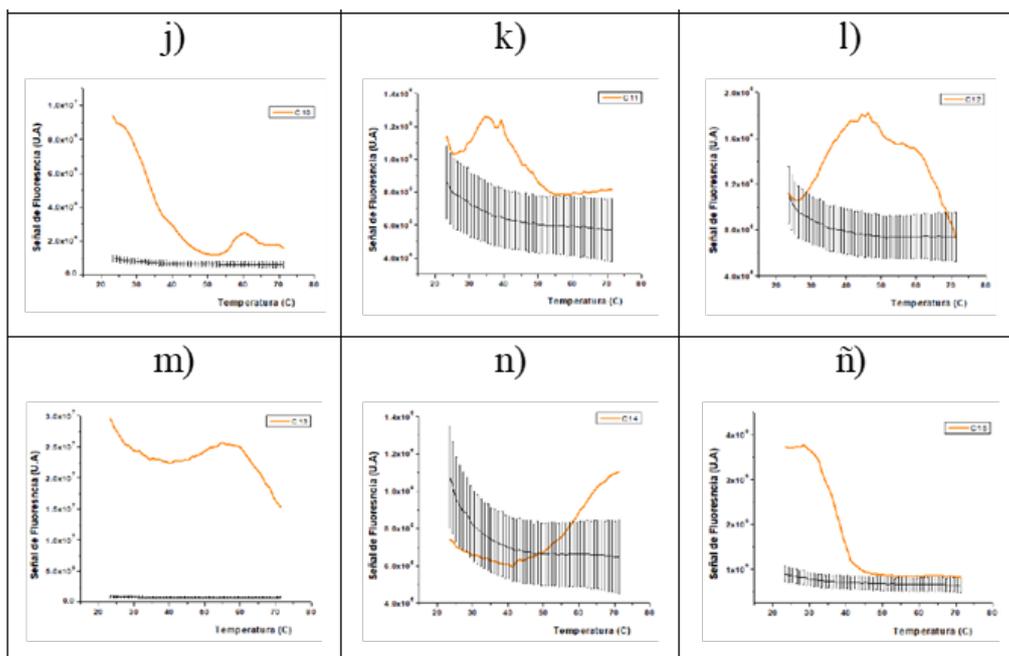
**Figura R1.4:** Cribado de alto rendimiento. Perfil de fluorescencia obtenido en la desnaturalización térmica ( $T^{\circ}$  25-75 $^{\circ}$ C) de la mezcla formada por la proteína NUPR1, la sonda ANS, los 16 controles negativos y los 88 compuestos testados en las placas N $^{\circ}$ 2 a la N $^{\circ}$ 14 donde se observa la fluorescencia emitida tanto por los controles negativos, como por los 88 compuestos testados en la placa ( $[ANS]= 100\mu M$ ); proteína NUPR1 ( $[NUPR1]= 4\mu M$ ), y ( $[Compuesto]= 250\mu M$ ).

## RESULTADOS

La selección de los compuestos positivos en este *screening* se basó en las diferencias observadas en el perfil de fluorescencia durante la desnaturalización térmica de la proteína NUPR1 en presencia de la sonda ANS de los pocillos de las placas de cribado expuesta a los distintos compuestos, respecto a los controles negativos o pocillos sin compuesto. Así pues, fueron seleccionados como potenciales ligandos de la proteína NUPR1, aquellos perfiles de fluorescencia que mostraban mayores cambios durante la desnaturalización. Se tomó la decisión de seguir con el estudio con 15 compuestos de la quimioteca. En adelante serán denominados como Compuesto-1 (C1) hasta Compuesto-15 (C15)), y sus perfiles de fluorescencia se muestran en la siguiente figura (Figura R1.5).



## RESULTADOS



**Figura R1.5** Perfil de fluorescencia emitido en la desnaturalización térmica ( $T^a$  25-75°C) de la mezcla formada por la proteína NUPR1 ( $[NUPR1]= 4\mu M$ ), la sonda ANS ( $[ANS]= 100\mu M$ ), y los compuestos ( $[Compuesto]= 2.5\%= 250 \mu M$ ) a) Compuesto-1 (C1); b) Compuesto-2 (C2); c) Compuesto-3 (C3); d) Compuesto-4 (C4); e) Compuesto-5 (C5); f) Compuesto-6 (C6); g) Compuesto-7 (C7); h) Compuesto-8 (C8); i) Compuesto-9 (C9); j) Compuesto-10 (C10); k) Compuesto-11 (C11); l) Compuesto-12 (C12); m) Compuesto-13 (C13); n) Compuesto-14 (C14); ñ) Compuesto-15 (C15). Se ha representado en negro el perfil de desnaturalización térmica de los controles y en naranja los perfiles de desnaturalización térmica de los 15 compuestos seleccionados. Las barras de error son las desviaciones estándar correspondientes a 16 medidas de controles independientes que se llevaban a cabo en cada placa de cribado en cada experimento.

Tal y como se muestra en la figura anterior (Figura R1.5), se observaron cambios significativos en el perfil de desnaturalización térmica y la intensidad de fluorescencia en la combinación de la proteína NUPR1+compuestos C1 a C15 respecto a los controles. La forma del perfil varía entre los 15 compuestos, siendo la aparición de una señal de fluorescencia que no aparece en el caso de los controles la que nos indica que esos compuestos (potenciales ligandos) podrían interactuar con nuestra proteína diana NUPR1. Dichos ligandos podrían producir una estabilización de la proteína y formar con ella complejos estables, lo que podría inducir la aparición de cierta estructura en la proteína IDP. Esta interacción podría impedir la unión de la proteína NUPR1 a sus

## RESULTADOS

ligandos biológicos e incluso llegar a bloquear la acción que esta unión pudiera llevar a cabo en la célula.

Por todo ello, estos compuestos C1 a C15 fueron seleccionados como posibles candidatos a interactuar con la proteína NUPR1 y fueron sometidos a más ensayos. El detalle de las estructuras de los compuestos identificados se encuentra detallada en la Tabla R1.6.

Nombre	Posición placa	Nombre químico	Estructura	Fórmula	Peso Molecular	Nombre	Posición placa	Nombre químico	Estructura	Fórmula	Peso Molecular
C1	02F09	Terfenadine		C <sub>23</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>2</sub>	471,68907	C9	12D02	(+)-Isoproterenol (+) bitartrate salt		C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>9</sub>	361,35186
C2	04H11	Fluphenazine dihydrochloride		C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	510,45316	C10	01F10	Pheniramine maleate		C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	356,42528
C3	12C03	Caffeic acid		C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	180,16171	C11	07B06	Terconazole		C <sub>26</sub> H <sub>31</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	532,47467
C4	11H06	Reserpine		C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	608,69475	C12	08A10	Dihydroergofloxine mesylate		C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> SR	616,71891
C5	14F08	(-) Isoproterenol hydrochloride		C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>3</sub>	247,72401	C13	09G09	Benzethonium chloride		C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> ClNO <sub>2</sub>	448,09429
C6	04H03	Flunarizine dihydrochloride		C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>2</sub> N <sub>2</sub>	477,42926	C14	02G06	Chlortetracycline hydrochloride		C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	515,35118
C7	13H02	Halofantrine hydrochloride		C <sub>26</sub> H <sub>31</sub> Cl <sub>3</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O	536,89727	C15	04H04	Trifluoperazine dihydrochloride		C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> S	480,42667
C8	10B10	Levonorgestrel		C <sub>19</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	183,20886						

**Tabla R1.6** Datos de los compuestos seleccionados: Posición de la placa, nombre químico, estructura, fórmula, y peso molecular.

## 2. CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DEL COMPLEJO FORMADO POR LA PROTEÍNA NUPR1 Y LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS

Una vez identificados mediante el cribado de alto rendimiento (*High Throughput Screening*, HTS) los compuestos que, al parecer, eran capaces de unirse a la proteína NUPR1 y alterar su perfil de desnaturalización térmica, se procedió a la caracterización de los complejos resultantes mediante el uso de distintas técnicas biofísicas como Calorimetría Isotérmica de Titulación (ITC), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopía de Fluorescencia (EF), y diversos métodos computacionales.

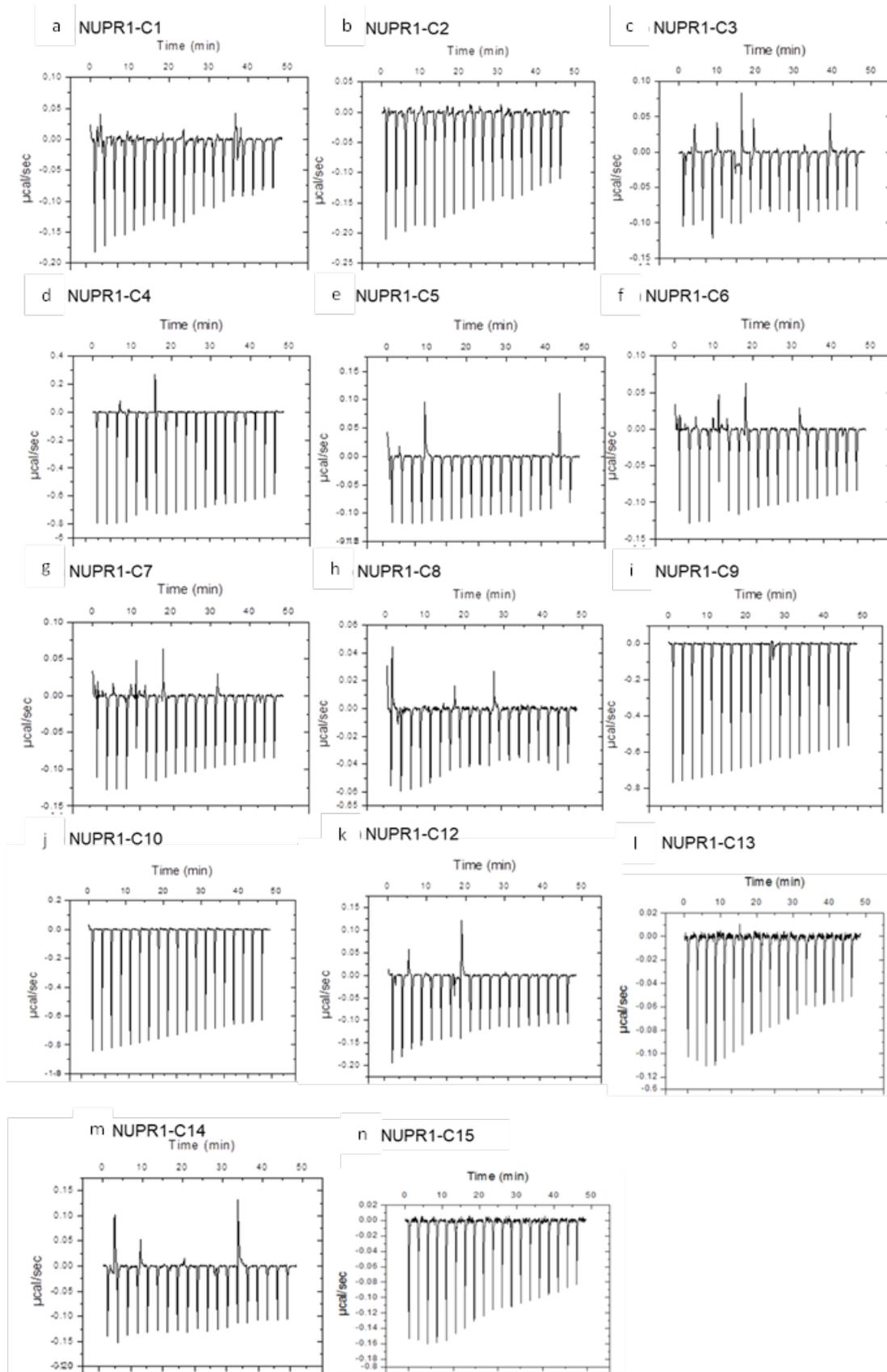
## RESULTADOS

### **2.1 CALORIMETRÍA ISOTÉRMICA DE TITULACIÓN (ITC): CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE LOS COMPLEJOS NUPR1- COMPUESTO**

Mediante el cribado realizado anteriormente, basado en el aumento de estabilidad observado durante la desnaturalización térmica de la proteína junto a los distintos compuestos respecto a la proteína aislada, fueron seleccionados aquellos compuestos que inducían una mayor estabilización en NUPR1. Este aumento de estabilidad está íntimamente relacionado con la afinidad de unión de los compuestos a la proteína, pero esta correlación no es directa. Por ello, fue necesario el uso de otras técnicas para profundizar en la caracterización biofísica de las interacciones moleculares entre ambas especies y determinar sus afinidades.

La primera de las técnicas utilizadas para la caracterización termodinámica de la interacción entre la proteína NUPR1 y los 15 compuestos seleccionados (C1-C15), fue la calorimetría isotérmica de titulación (ITC). Tras añadir el compuesto de la jeringa a la proteína contenida en la celda del calorímetro, a dos temperaturas (25° y 37°) y dos pH (4 y 7) para ver las condiciones más favorables, se obtuvieron los termogramas que se muestran a continuación (Figura R2.1.1).

# RESULTADOS



**Figura R2.1.1:** Caracterización biofísica de la unión entre los compuestos seleccionados (C-1 a C-15) y la proteína NUPR1: Termogramas correspondientes a los experimentos de

## RESULTADOS

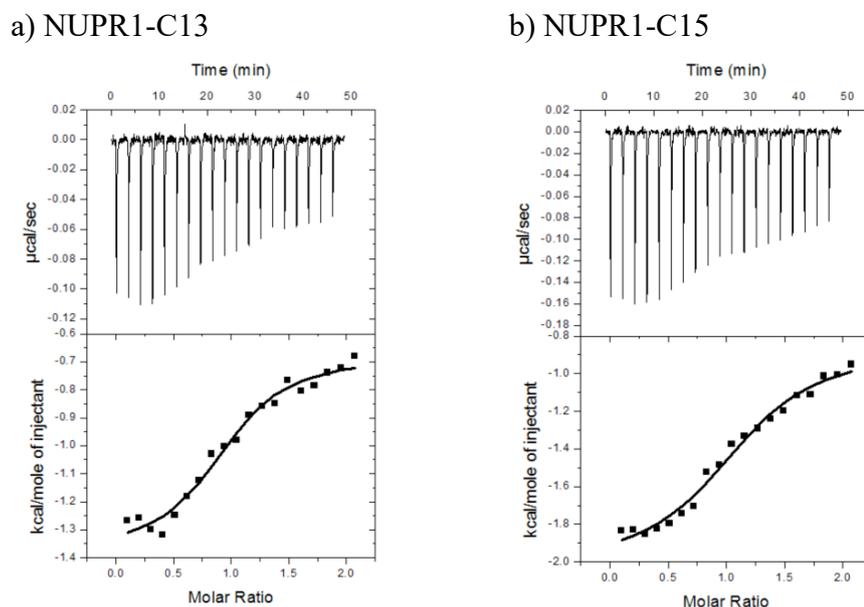
ITC llevados a cabo para el estudio de la interacción entre la proteína NUPR1 y el a) C1 (37°C; pH 7); b) C2 (37°C; pH 7); c) C3 (25°C; pH 7); d) C4 (37°C; pH 4); e) C5 (25°C; pH 7); f) C6 (25°C; pH 7); g) C7 (25°C; pH 7); h) C8 (25°C; pH 7); i) C9 (37°C; pH 4); j) C10 (37°C; pH 4); k) C11 (25°C; pH 7); l) C12 (25°C; pH 7); m) C14 (25°C; pH 7); n) C15 (25°C; pH 7). Las condiciones del calorímetro fueron: celda [NUPR1]= 20 $\mu$ M, DMSO 1,5%; jeringa [compuesto disuelto en DMSO]= 300 $\mu$ M; ambos disueltos en tampón fosfato 20mM (pH 7) o tampón acetato de sodio (pH 4). NOTA: Solo se muestran los termogramas obtenidos bajo las mejores condiciones de temperatura y pH.

Las gráficas anteriores (Figura R2.1.1) muestran los termogramas correspondientes a la reacción de formación del complejo entre la proteína NUPR1 y los compuestos seleccionados (C1-C15), que se corresponden con el calor intercambiado en la reacción de interacción entre ambas especies. Con respecto a las formas observadas en los termogramas, se apreciaban diferencias en cuanto al calor generado (kcal/s) entre el principio y el final de la reacción, lo que indica que la interacción entre la proteína y los compuestos había tenido lugar. Esto se observó en todos los compuestos excepto en el compuesto C-11, en el que no se producía interacción bajo las condiciones de trabajo ensayadas (imagen no mostrada). Con respecto a la dirección de los picos del termograma, se observó en todos los casos (excepto el compuesto C-11) que este calor era de signo negativo, lo que aparte de confirmar que existe reacción entre NUPR1 y los distintos compuestos, reflejó también que se trataba de reacciones de carácter exotérmico. En este tipo de reacciones, la celda de la muestra se calienta más que la de referencia, por lo que es necesario aplicar calor a la celda de referencia para igualar de nuevo las temperaturas de las celdas, lo que se traduce con un pico hacia abajo en el termograma.

Además, en todos los casos excepto en el caso del compuesto C-11, se pudieron obtener las curvas de ITC correspondientes a la formación de los complejos, lo que reafirmó la existencia de reacción química entre la proteína y los compuestos. Las curvas de ITC se corresponden con el calor intercambiado por mol de compuesto añadido (Kcal/mol) en función de la ratio molar de las dos especies [compuesto]/[Npr1]), obtenido a partir del calor generado en cada pulso, integrado con respecto al tiempo y normalizado por la concentración. El ajuste mostrado en todos los casos fue un ajuste no lineal de acuerdo con el modelo considerado con un único sitio de unión del compuesto. En la siguiente

## RESULTADOS

figura (Figura R2.1.2) se muestran como ejemplos las curvas de ITC de los compuestos C13 y C15, dos de los compuestos más prometedores.



**Figura R2.1.2:** Caracterización biofísica de la unión de los compuestos C13 y C15 a la proteína NUPR1. Termogramas (parte superior de la gráfica) y curvas de ITC (parte inferior de la gráfica) correspondientes a los experimentos de ITC llevados a cabo para el estudio de la interacción entre la proteína NUPR1 y el a) compuesto C13; b) compuesto C15. Las condiciones del calorímetro fueron: celda  $[\text{NUPR1}] = 20\mu\text{M}$ , DMSO 1,5%; jeringa  $[\text{compuesto disuelto en DMSO}] = 300\mu\text{M}$ , ambos disueltos en tampón fosfato 20mM (pH 7) a  $T25^\circ\text{C}$ .

Como se ha mencionado anteriormente, de las curvas de ITC obtenidas en un experimento de calorimetría isotérmica de titulación se deducen algunos parámetros termodinámicos de la interacción estudiada, como son las constantes de afinidad/disociación ( $K_a/K_d$ ) entre las moléculas que interaccionan, la entalpía de reacción ( $\Delta H$ ), la entropía ( $\Delta S$ ), o la estequiometría ( $n$ ) del complejo resultante. En el caso de la interacción entre la proteína NUPR1 y los compuestos seleccionados y para la formación de los complejos correspondientes, se obtuvieron los datos mostrados en la siguiente tabla (Tabla R2.1.3):

## RESULTADOS

<b>Complejo</b>	<b>K<sub>a</sub></b> <b>(μM<sup>-1</sup>)</b>	<b>K<sub>d</sub></b> <b>(μM)</b>	<b>ΔH</b> <b>(kcal/mol)</b>
<b>NUPR1- C1</b>	0,2	5.0	-0.2
<b>NUPR 1- C2</b>	0,5	2.0	-0.2
<b>NUPR 1- C3</b>	0,5	2.0	-0.2
<b>NUPR 1- C4</b>	0,3	3.2	-0.3
<b>NUPR 1- C5</b>	0,2	3.9	-0.8
<b>NUPR 1- C6</b>	0,3	3.1	-0.7
<b>NUPR1- C7</b>	0,3	3.3	-0.6
<b>NUPR 1- C8</b>	0,7	1.5	-0.2
<b>NUPR 1- C9</b>	0.2	4.0	-1.4
<b>NUPR 1- C10</b>	0.2	4.3	-1.1
<b>NUPR 1- C11</b>	-*	-	-
<b>NUPR 1- C12</b>	0.2	4.0	-2.04
<b>NUPR 1- C13</b>	0,3	3.6	-0.7
<b>NUPR 1- C14</b>	0,7	1.5	-0.9
<b>NUPR 1- C15</b>	0.2	5.2	-1.1

**Tabla R2.1.3:** Parámetros termodinámicos (constantes de afinidad (K<sub>a</sub>), constantes de disociación (K<sub>d</sub>) y entalpia (ΔH) de la reacción de interacción entre la proteína NUPR1 y los 15 compuestos seleccionados en el cribado HTS (C1-C15), obtenidos mediante experimentos de calorimetría isotérmica de titulación (ITC). La constante de disociación (K<sub>d</sub>) no es proporcionada directamente en los experimentos de ITC sino que fue calculada mediante la fórmula 1/ K<sub>a</sub>.

(\*): No pudo ser determinado a las condiciones ensayadas.

Como se aprecia en la tabla anterior (Tabla R2.1.3), en todos los casos excepto en el caso del compuesto C11, se obtuvieron datos de las constantes termodinámicas de la unión, lo que vuelve a constatar que todas las reacciones de interacción entre la proteína NUPR1 y los distintos compuestos estudiados han tenido lugar. En cuanto a la afinidad de la proteína por los distintos compuestos, los datos de la tabla muestran pequeñas variaciones, desde los valores más bajos de K<sub>a</sub> como es el caso de la interacción del C1, C5, C9, C10, C12 o C15 con la proteína (K<sub>a</sub>=0.2), hasta aquellos compuestos con valores de K<sub>a</sub> más elevados y que muestran por tanto más afinidad por la proteína como es el caso

## RESULTADOS

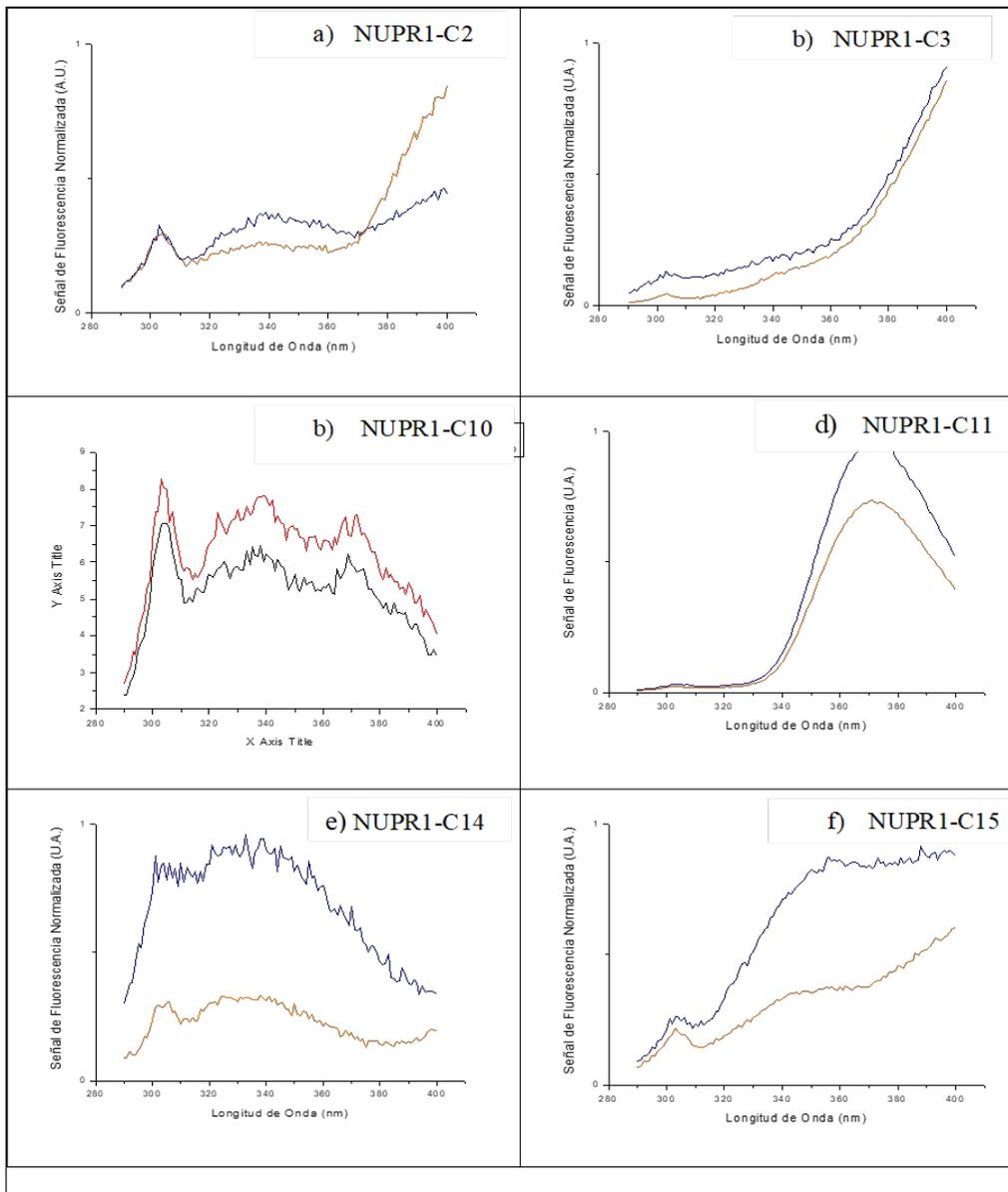
del C8 o el C14 ( $K_a=0.7$ ). Pero aún con estas pequeñas diferencias, todos los compuestos mostraron constantes de afinidad del orden de micromolar que resulta ser el orden esperado para las interacciones de las proteínas intrínsecamente desordenadas con sus ligandos biológicos (Gianni et al., 2014).

### **2.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA (SF): ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DEL ENTORNO DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS DE NUPR1 TRAS LA INTERACCION CON LOS COMPUESTOS**

Una vez caracterizados termodinámicamente los complejos formados por la proteína NUPR1 y los compuestos seleccionados en el cribado inicial mediante experimentos de ITC, y buscando una evidencia más de la interacción directa entre ambas biomoléculas, se llevaron a cabo experimentos de espectroscopía de fluorescencia intrínseca. Este tipo de experimentos proporcionan información acerca de la estructura terciaria en torno a los aminoácidos aromáticos de una proteína y son capaces de detectar cualquier cambio que se produzca en los mismos o alrededor de ellos tras su interacción con otra biomolécula.

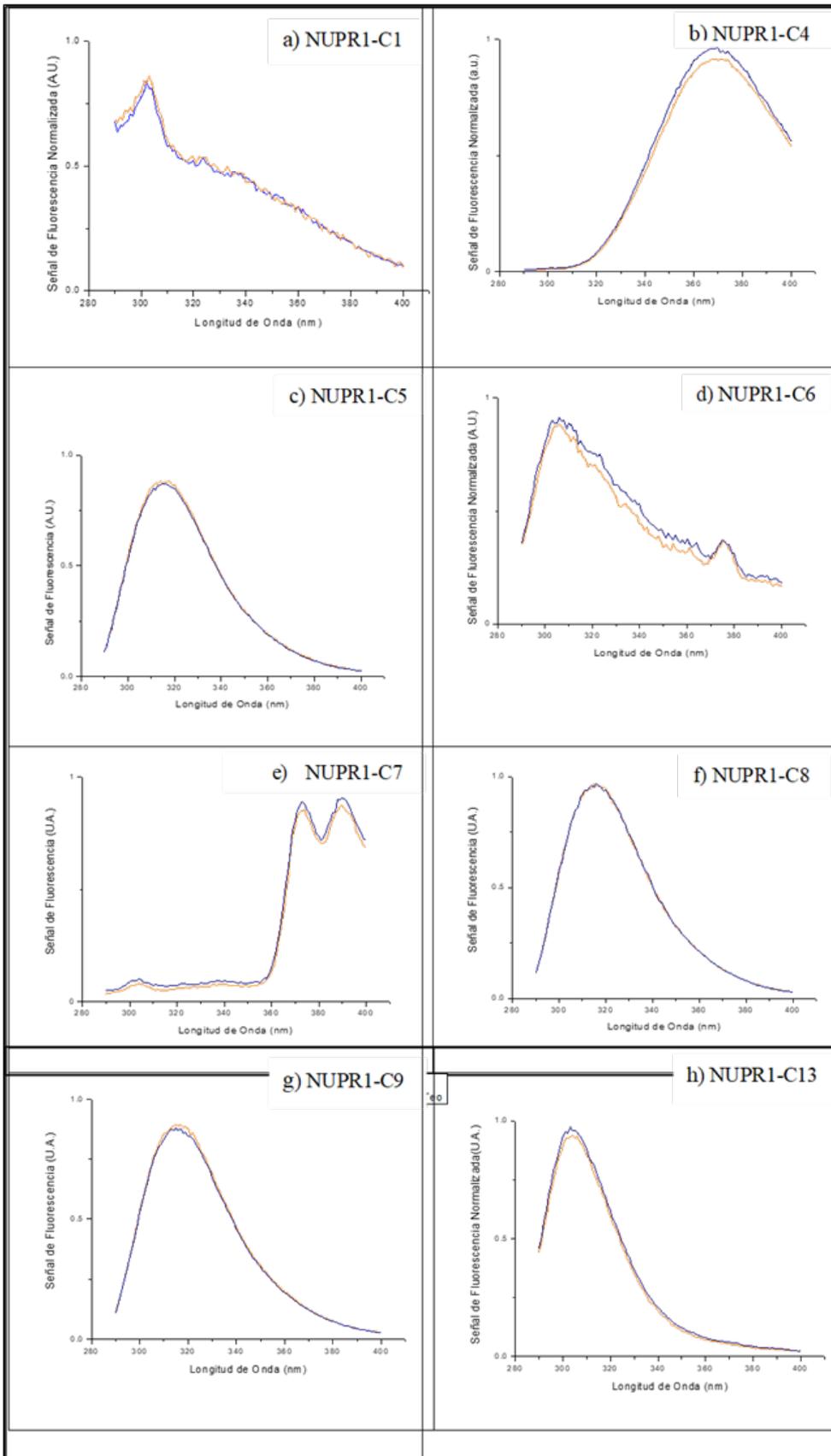
Para ello, se realizaron espectros de fluorescencia de los complejos NUPR1-Compuesto, por un lado, y de la proteína NUPR1 y los compuestos por separado por otro ( $[NUPR1]=3.2 \mu\text{M}$ ;  $[Compuesto] = 100 \mu\text{M}$ ; Tampón:  $[Na_2HPO_4]= 20\text{mM}$ ,  $\text{pH}=7$ ) y se observaron las diferencias entre ambos. Las comparaciones se llevaron a cabo entre los espectros de los complejos NUPR1-Compuesto (C1-C15) y la suma de los espectros de los componentes individuales (NUPR1 y C1-C15) disueltos en DMSO (restando a este último término el espectro del DMSO-tampón para evitar que el disolvente contase dos veces). A continuación, se muestran los resultados obtenidos, clasificados en tres grupos distintos según el comportamiento de su fluorescencia observado (Figuras R2.2.1, R2.2.2, R2.2.3).

## RESULTADOS



**Figura R2.2.1:** Comparación de los espectros de fluorescencia de los complejos NUPR1-compuesto (línea naranja) vs. la suma de los espectros individuales de la proteína NUPR1 y los compuestos (líneas azules) a) compuesto C2; b) compuesto 3; c) compuesto C10; d) compuesto C11; e) compuesto C14; f) compuesto C15. En todos los casos se restó el espectro del DMSO a la suma de los espectros individuales para que este no estuviese dos veces representado. Las concentraciones utilizadas fueron  $[NUPR1]= 3.2 \mu M$ ;  $[Compuesto] = 100 \mu M$ ; y Tampón:  $[Na_2HPO_4]= 20mM$ ,  $pH=7$ .

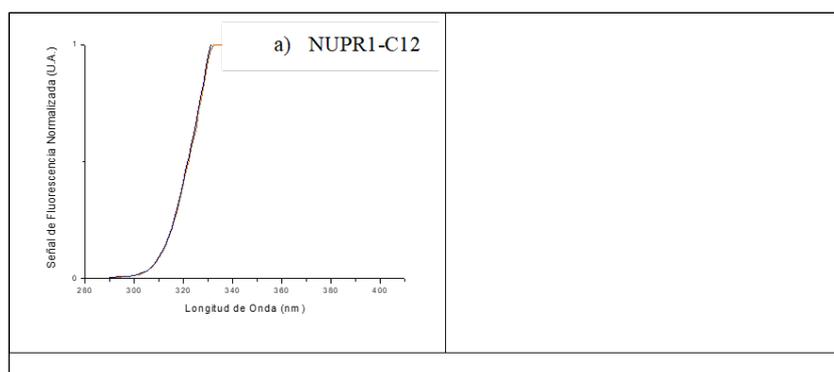
## RESULTADOS



**Figura R2.2.2:** Comparación de los espectros de fluorescencia de los complejos NUPR1-compuesto (línea naranja) vs. la suma de los espectros individuales de la proteína NUPR1

## RESULTADOS

y los compuestos (líneas azules). a) compuestos C1; b) compuesto C4; c) compuesto C5; d) compuesto C6; e) compuesto C7 f) compuesto C8 g) compuesto C9; y h) compuesto C13. En todos los casos se restó el espectro del DMSO a la suma de los espectros individuales para que este no estuviese dos veces representado. Las concentraciones utilizadas fueron [NUPR1]= 3.2  $\mu\text{M}$ ; [Compuesto] = 100  $\mu\text{M}$ ; y Tampón: [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ]= 20mM, pH=7.



**Figura R2.2.3:** Comparación del espectro de fluorescencia del complejo NUPR1-compuesto12 (línea naranja) vs. la suma de los espectros individuales de la proteína NUPR1 y el compuesto C12 (línea azul). Se restó el espectro del DMSO a la suma de los espectros individuales. Las condiciones del experimento fueron [NUPR1]= 3.2  $\mu\text{M}$ ; [Compuesto] = 100  $\mu\text{M}$ ; Tampón: [ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ]= 20mM, pH=7.

La comparación de los espectros de fluorescencia de los complejos NUPR1-compuesto frente a la suma de los espectros individuales, permitieron clasificar a los compuestos en tres grupos, tal y como muestran las figuras R2.2.1, R2.2.2 y R2.2.3.

En un primer grupo de compuestos (Figura R2.2.1), formado por los compuestos C2, C3, C10, C11, C14 y C15, se observaron diferencias más o menos marcadas entre ambos espectros, que implicaría una modificación del entorno de los aminoácidos aromáticos tras la adición del compuesto, lo que supondría la existencia de interacción entre la proteína y el compuesto. Esta interacción, que no existía en los componentes individuales, produciría la modificación del entorno de los aminoácidos aromáticos de la proteína y la consiguiente variación en los espectros de fluorescencia.

En un segundo grupo de compuestos (Figura R2.2.2), formado por los compuestos C1, C4, C5, C6, C7, C8, C9 y C13, estas diferencias en la emisión de fluorescencia entre

## RESULTADOS

ambos espectros no se apreciaban, o eran mínimas, lo que implica que el entorno de los aminoácidos aromáticos de la proteína NUPR1 no ha sido modificado tras la adición de estos compuestos.

Finalmente, en el compuesto C12 (Figura R2.2.3), se observó una fluorescencia propia muy superior a la de la NUPR1, por lo que queda enmascarado cualquier cambio en el espectro de emisión del complejo NUPR1-C12, no pudiéndose sacar ningún dato concluyente en dicha interacción.

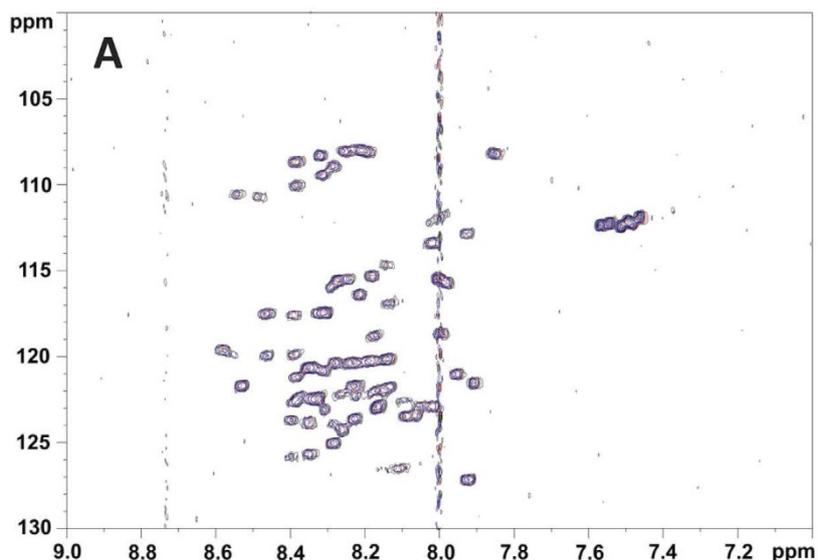
### **2.3 RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN): ESTUDIO DE LOS RESIDUOS DE NUPR1 IMPLICADOS EN LA INTERACCIÓN CON LOS COMPUESTOS**

Tras la caracterización termodinámica de los complejos resultantes de la interacción entre la proteína NUPR1 y los compuestos seleccionados en el cribado inicial (C1-C15), y el estudio de dicha interacción entre ambas moléculas mediante el estudio de la fluorescencia emitida el proceso, se llevaron a cabo, en colaboración con el Dr. J.L. Neria de la Universidad de Elche estudios de resonancia magnética nuclear (RMN). El objetivo de estos estudios era identificar en la proteína los residuos exactos de unión a los compuestos. Este tipo de estudios se basan que, si se produce interacción entre dos biomoléculas, se va a producir un cambio en el espectro de RMN, ya sea en los desplazamientos químicos, en la amplitud, o en la intensidad, respecto a los espectros RMN de cada una de las moléculas por separado. De manera que, para estudiar la interacción entre biomoléculas mediante RMN bastará con comparar los espectros de las moléculas por separado, en nuestro caso la proteína NUPR1 y los compuestos seleccionados, con los espectros del complejo formado NUPR1-compuesto. Los residuos de unión concretos de los compuestos a la proteína pueden ser caracterizados usando tanto las variaciones en los desplazamientos químicos (son las variaciones en la frecuencia), como las variaciones en la amplitud de la señal de resonancia (en la anchura de los picos) de un espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC.

En nuestro caso, tras la realización de los espectros 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, se observó que la adición de los compuestos a la proteína NUPR1 no inducía ningún cambio en los desplazamientos de ninguno de los picos, ni tampoco variaciones importantes en la amplitud de la señal, lo que indica que la proteína permanece en su mayoría desordenada

## RESULTADOS

incluso después de que se lleve a cabo la interacción con los compuestos. A modo de ejemplo, en la figura R2.3.1, se muestran datos del espectro 2D HSQC para dos de los compuestos, C9 y C15, que interaccionan con la proteína NUPR1. En ambos casos se observó ausencia de cambios en el desplazamiento químico en todas las señales, al igual que ocurría en el resto de los compuestos (datos no mostrados).



**Figura R2.3.1:** RMN de los compuestos frente a NUPR1. A) Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC de la proteína NUPR1 aislada (rojo) a 100  $\mu\text{M}$ ; NUPR1 y C9 (negro) (100:400  $\mu\text{M}$ ); y NUPR1 y C15 (azul) (100:400  $\mu\text{M}$ ).

El análisis detallado de los espectros HSQC, residuo a residuo, de todos los compuestos, reveló pequeñas variaciones no uniformes en la amplitud de las señales para algunos de los residuos de la proteína NUPR1. Esto es debido al intercambio de las moléculas de compuesto entre el estado libre y el estado acomplexado NUPR1-compuesto. Estas variaciones señalaban los residuos concretos de la proteína en los que habían interactuado los compuestos. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla (Tabla R2.3.2)

## RESULTADOS

<b>Resonancias afectadas por la unión de los compuestos a NUPR1</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>Residuos cuyo espectro RMN se ve modificado por la unión del compuesto</b>
C-1 Terfenadina	-
C-2 Flufenazina dihidrocloruro	Thr68
C-3 Acido cafeico	Ala33; Thr68
C-4 Reserpina	Thr68
C-5 (-) -Isoproterenol dihidrocloruro	Thr68
C-6 Flunarizina dihidrocloruro	Ala33; Thr68
C-7 Halofantrina hidroclocloruro <sup>a</sup>	Thr68
C-8 Levonordefrina	Ala33; Thr68
C-9 (+)-Isoproterenol(+)-bitartrato sal	Ser9; Ala10; Leu29; Ala33; Gly38; Thr68
C-10 Pheniramina maleato	Ser9; His62; Thr68
C-11 Terconazol	Thr68
C-12 Dihidroergotoxina hidroclocloruro	Leu29; Le32; Gly38; Thr68
C-13 Bencetonio cloruro	Thr68
C-14 Clortetraciclina hidroclocloruro	Ala33; Thr68
C-15 Trifluoperazina dihidrocloruro	Ala33; Thr68

**Tabla R2.3.2:** Datos obtenidos en los experimentos RMN de la proteína NUPR1 y los compuestos. En la tabla aparecen señalados los residuos de la proteína en los que se produce una variación en su espectro RMN (pequeña variación de la amplitud de los picos) tras la unión de los distintos compuestos.

<sup>a</sup> El compuesto precipita a la concentración usada para RMN.

## RESULTADOS

Como queda reflejado en la tabla anterior (tabla R2.3.2), todos los compuestos analizados fueron solubles a una concentración de 400  $\mu\text{M}$  (la concentración de NUPR1 fue de 100  $\mu\text{M}$ ) a excepción del compuesto C7, que precipitaba en esas condiciones.

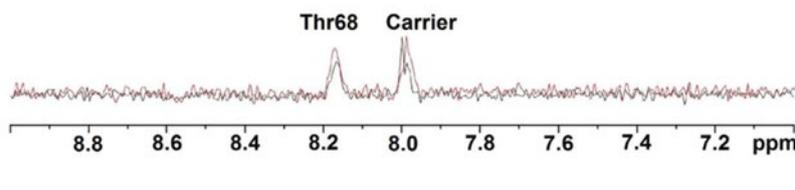
Como se ha dicho anteriormente, las variaciones en la amplitud de la señal de resonancia observadas en los residuos afectados de la proteína por la unión de los compuestos fueron muy pequeñas en todos los casos, lo que indica que la proteína permanecía mayormente desplegada después de la interacción. Hay que destacar sin embargo que, en la mayoría de los casos, estas variaciones se produjeron en un número restringido de residuos de la proteína, tal y como se muestra en la tabla R2.3.2.

Se observaron algunas diferencias en las interacciones de los distintos compuestos. El compuesto que más residuos modificó tras su interacción con NUPR1 es el compuesto C9, cuya interacción afecta a 6 residuos de la proteína; seguido por el compuesto C10 y el compuesto C12 que afectaban a 4 y 3 residuos de la proteína respectivamente. Solo hubo un compuesto, el compuesto C1, que no produjo ningún cambio, por mínimo que fuera, en el espectro RMN tras su interacción con la proteína.

Es importante señalar, que más que el número de residuos de la proteína modificados tras la adición de los compuestos es interesante el hecho de que varios de estos residuos se repetían en las interacciones de todos los compuestos. Estos residuos, concretamente los aminoácidos Ala33 y Thr68, parecían ser claves en las interacciones de la proteína NUPR1 por estar implicados en la unión de todos los compuestos ensayados.

Si nos centramos en el residuo de NUPR1 modificado por la interacción de todos los compuestos, la Thr68, y uno de los compuestos más prometedores, el compuesto C15 se observa lo que muestra la siguiente figura (Figura R2.3.3). En ella se muestra el espectro RMN correspondiente al desplazamiento químico del  $^{15}\text{N}$  de la Thr68 de NUPR1 en ausencia o presencia del compuesto C15.

## RESULTADOS



**Figura R2.3.3:** Espectro 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC correspondiente al desplazamiento químico del  $^{15}\text{N}$  de la Thr68 de NUPR1 para la proteína NUPR1 aislada (rojo) y NUPR1 más el compuesto 15 (negro). La señal a 8 ppm que aparece en ambas filas corresponde a la posición de la sonda interna. Descrita en materiales y métodos. Los experimentos se realizaron a 25°C y pH 4.5.

En la figura anterior (Figura R2.3.3) se observó claramente como para el residuo Thr68 de la proteína NUPR1, se producía una disminución en la intensidad de la señal tras la adición del compuesto C15, lo que parece confirmar la implicación de este residuo en la interacción entre ambas biomoléculas.

### 2.4 METODOS COMPUTACIONALES: DINÁMICA MOLECULAR Y ACOPLAMIENTO (DOCKING) MOLECULAR

Una vez identificados los residuos concretos de interacción la proteína NUPR1 con los distintos compuestos mediante la técnica de RMN, se procedió a estudiar las características de esas uniones de la proteína NUPR1 basándonos únicamente en el análisis de su secuencia a través de los métodos computacionales previamente descritos en el apartado introducción. Para ello, en colaboración con el Dr. Rizzuti (Italia), se llevó a cabo una simulación computacional o análisis *in silico* detallado de la proteína NUPR1 con el objetivo de determinar las características generales de la estructura de la misma y sus propiedades de unión.

Este análisis *in silico* de las propiedades de unión de NUPR1 se llevó a cabo en dos pasos. Inicialmente, se realizó una investigación bioinformática de la secuencia de la proteína, para posteriormente proceder al modelaje o diseño tanto de los diferentes confórmers de

## RESULTADOS

la proteína y los compuestos por separado, como de la estructura de los complejos resultantes en su interacción.

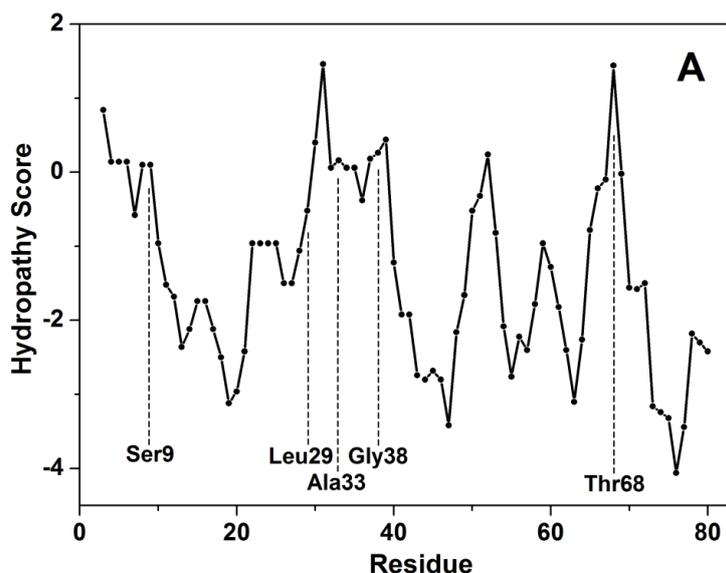
### **Estudio bioinformático de la secuencia de la proteína:**

En esta primera parte, se recurrió en primer lugar al servidor ExPASy (the *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB)), para obtener distintas informaciones de la proteína NUPR1:

- a pH 7 la carga media (calculada como la carga neta de cada residuo a pH 7 dividida por el número total de residuos) de la proteína NUPR1 es de +5e.
- la fracción de residuos cargados positivamente (Arg + Lys + His); 6K, 9R, 4D y 6E y negativamente (Asp + Glu) es del 18% y el 12% respectivamente.
- su hidrofobicidad media (calculada como la suma de la hidrofobicidad media de cada residuo dividido entre el número total de residuos) es de 0,35, menor que la hidrofobicidad media de las IDPs típicas, que es  $0,39 \pm 0,05$ , y mucho menor que la hidrofobicidad de las proteínas globulares plegadas, que es  $0,48 \pm 0,03$  (VN et al., 2000).

Siguiendo con el estudio de la secuencia de la proteína NUPR1, se recurrió en segundo lugar a la escala de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982) para llevar a cabo la caracterización de la hidrofobicidad de cada residuo de la proteína tal y como se muestra en la siguiente figura (Figura R2.4.1)

## RESULTADOS



**Figura R2.4.1:** Propiedades de la cadena principal de NUPR1 en función del número de residuo: Hidrofobicidad de la proteína NUPR1 en función del número de residuo calculada según la escala de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle (Kyte and Doolittle 1982) Los residuos de NUPR1 cuyo espectro RMN resultaba modificado tras la unión de los diferentes complejos a la proteína aparecen marcados en la figura. El cálculo se llevó a cabo considerando un tamaño de ventana de 5 residuos.

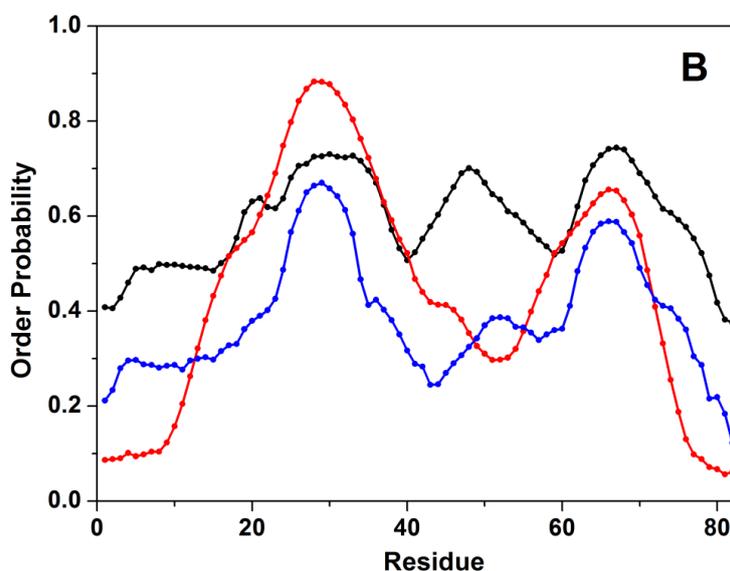
La figura anterior (Figura R2.4.1) muestra el carácter hidrofóbico de cada residuo de la proteína NUPR1 calculado de acuerdo con la escala de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle. En nuestro caso, se utilizó una ventana de 5 residuos, que es el valor más usado en la literatura, con lo que se consiguió evaluar la hidrofobicidad local alrededor de cada residuo de aminoácido considerando también la contribución de los dos residuos adyacentes de cada lado a lo largo de la secuencia. Esta escala considera que las regiones que se encuentran por encima de cero son regiones de carácter hidrofóbico, mientras que las que se encuentran por debajo presentan carácter hidrofílico. Como se aprecia en la figura, en la mayoría de los residuos la hidrofobicidad se encontraba por debajo del cero, lo que sugería la no hidrofobicidad de estos residuos, aunque también se observaron algunas regiones con índice hidropático mayor que cero. Los picos más prominentes de la figura anterior, que se corresponden con los residuos más hidrofóbicos de la proteína, se corresponden con los residuos cuyas resonancias se veían afectadas tras la unión de los distintos compuestos a la proteína NUPR1 con un margen de 2 aminoácidos como máximo. Los índices de hidrofobicidad más altos se observaron para los residuos 31, que

## RESULTADOS

se encuentra entre la Leu29 y la Ala33, residuos modificados en los espectros RMN tras la unión de los compuestos; y la Thr68, residuo clave de NUPR1 que se modificaba tras la unión de todos los compuestos. Otros picos en el patrón de hidrofobicidad se observan en los residuos 8-9 y 39, que se corresponden con la Ser9, Ala10 y Gly38, cuya resonancia se ve modificada también por la unión de algunos de los compuestos.

En resumen, podemos decir que se apreció claramente como los picos más prominentes coinciden con aquellos residuos de la proteína NUPR1 cuyas resonancias se veían afectadas por la unión de los compuestos, según los resultados observados en RMN.

Otro aspecto estudiado mediante el análisis de la secuencia de la proteína NUPR1 fue la predicción del grado de orden a lo largo de su estructura primaria. Se utilizaron para ello tres métodos distintos muy usados en DM para predecir la dinámica de los residuos de una proteína, lo que resulta estar estrechamente relacionado con su grado de orden. Estos tres métodos son DinaMine (Cilia et al., 2013) (Cilia et al., 2014), PrDOS (Ishida & Kinoshita, 2007) y DISOclust (Mcguffin, 2008), y todos ellos están basados únicamente en el conocimiento de la secuencia de la proteína. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura (Figura R2.4.2)



**Figura R2.4.2:** Propiedades de la cadena principal de NUPR1 en función del número de residuo: Probabilidad de la estabilidad conformacional obtenida mediante el cálculo del parámetro de predicción de orden  $S^2$  de los grupos N-H de la cadena principal de la

## RESULTADOS

proteína NUPR1. Los programas utilizados fueron DynaMine (línea negra)(Cilia et al., 2013) (Cilia et al., 2014), PrDOS (línea roja) (Ishida & Kinoshita, 2007), y DISOcLUST (línea azul) (Mcguffin, 2008).

Como se muestra en la figura anterior (Figura R2.4.2), los tres métodos tienen valores de la “probabilidad de orden” que van desde 0, representando una conformación inestable y una posición altamente dinámica, hasta 1, cuyo valor representa un residuo con orden completo con una conformación estable (estabilidad local completa). La relación entre el orden y la dinámica de la proteína está clara, ya que según su tendencia al orden o al desorden, la proteína será más o menos dinámica, resultando las más ordenadas las menos dinámicas y viceversa.

El primero de los métodos, el método de DynaMine (Cilia *et al.*, 2014), utiliza el parámetro de orden  $S^2$  de los grupos N-H del esqueleto de la proteína para examinar la tendencia al orden o al desorden de un aminoácido concreto (línea negra de la figura), lo que da una estimación de la flexibilidad de la cadena proteica. En el caso de la proteína NUPR1, y tal y como muestra la figura, no se detectó ningún residuo en una disposición estable ( $S^2 \geq 0,75$ ), y, aunque la conformación para los residuos 26-37, 47-51 y 63-71 pueden ser clasificados como dependientes del contexto ( $0,65 < S^2 < 0,75$ ), en el resto de los residuos, que son la mayoría, encontramos valores de  $0,65 < S^2$ , considerado desordenados por el programa.

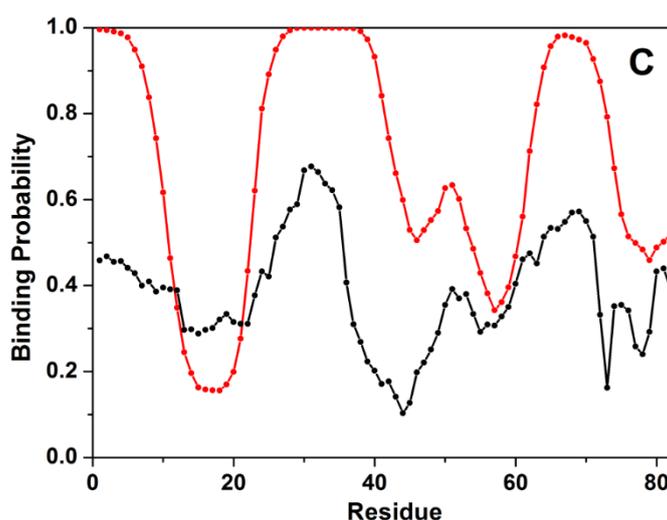
En los otros dos métodos utilizados para predecir la tendencia al orden de los residuos, el PrDOS (línea roja de la figura), que combina información local de la secuencia de la proteína con una predicción basada en una secuencia molde (Ishida *et al.*, 2007) y el método de DISOcLust (línea azul de la figura) el cual correlaciona el desorden de la proteína con los errores por residuo en modelos de reconocimiento múltiple) (McGuffin LJ *et al.*, 2008) se obtuvieron resultados similares al anterior, excepto en la región de los residuos 47-51, que estos últimos consideran desordenada ( $S^2 < 0,5$ ), frente al método DynaMine que considera la región como una zona ordenada de la proteína.

A pesar de esta pequeña diferencia, y a pesar de no estar normalizadas recíprocamente, las tres estrategias coincidían en que existen únicamente 2 regiones, una que incluye los residuos Leu29 y Ala33 (y marginalmente Gly38), y la otra, que incluye a la Thr68 (y

## RESULTADOS

marginalmente His62), clasificadas como zonas cuya estabilidad depende del contexto, y en las que existiría la probabilidad de convertirse en regiones ordenadas bajo condiciones favorables.

Posteriormente al estudio del orden de cada residuo de NUPR1, se determinó la probabilidad de unión de cada residuo de la proteína. Para ello se utilizaron dos métodos de predicción computacional, el método MoRFpred (Disfani *et al.*, 2012), y el método ANCHOR 31 (Dosztányi *et al.*, 2009), que predicen la probabilidad de unión de los residuos de la proteína NUPR1 a través de la transición desorden-orden dinámica de los residuos de la proteína, lo que a su vez está relacionado con su grado de orden. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura (Figura R2.4.3).



**Figura R2.4.3:** Propiedades de la cadena principal de NUPR1 en función del número de residuo: Probabilidad de unión de la proteína NUPR1 a través de la transición desorden-orden. La probabilidad de unión a lo largo de la secuencia de la proteína fue obtenida usando el predictor computacional MoRFpred (línea negra) (Disfani *et al.*, 2012); y el método ANCHOR (línea roja) (Mészáros *et al.*, 2009) y ANCHOR 31 (Dosztányi *et al.*, 2009)

El primero de los métodos, el método MoRFpred (Disfani *et al.*, 2012) identifica, dentro de las regiones más grandes intrínsecamente desestructuradas, regiones de unión más cortas, a menudo caracterizadas por una combinación de alta hidrofobicidad y tendencia al orden comparadas con los residuos adyacentes. Por el contrario, el método ANCHOR

## RESULTADOS

(Dosztányi *et al.*, 2009) está basado en estimaciones de energía para detectar los segmentos de la cadena principal de la proteína que podrían ser estabilizados en la presencia de un ligando molecular aproximadamente globular.

La figura anterior (Figura R2.4.3), muestra por tanto la probabilidad de unión de los ligandos a los distintos residuos de la proteína NUPR1 a través de transiciones desorden-orden de pequeñas porciones de la cadena de la proteína NUPR1. De nuevo se pudo observar que, en ambos casos que, a pesar de las diferencias en la metodología utilizada y en el rango de variabilidad para los valores de probabilidad de unión predichos, las herramientas computacionales usadas coinciden en evidenciar que los valores más altos, es decir los residuos de la proteína NUPR1 con una mayor probabilidad de estar implicados en la unión a los compuestos, correspondían a las dos porciones de la cadena principal centradas alrededor de la Ala33, o más precisamente, entre Leu29 y Gly38; y alrededor de la Thr68, residuos clave en las interacciones con los ligandos según los experimentos de RMN previos.

### **Modelaje de la estructura de los complejos formados por la proteína NUPR1 y los compuestos seleccionados:**

Una vez analizada en profundidad la estructura de la proteína NUPR1 mediante los estudios bioinformáticos mencionados anteriormente, se pasó a la segunda parte del estudio computacional, el diseño *in silico* de los posibles modelos de las estructuras de los complejos formados por NUPR1 y los 15 compuestos seleccionados (C1-C15). Como en el caso de la predicción teórica anterior, los modelos fueron obtenidos a ciegas, es decir, sin utilizar la información de los experimentos previos de ITC y RMN.

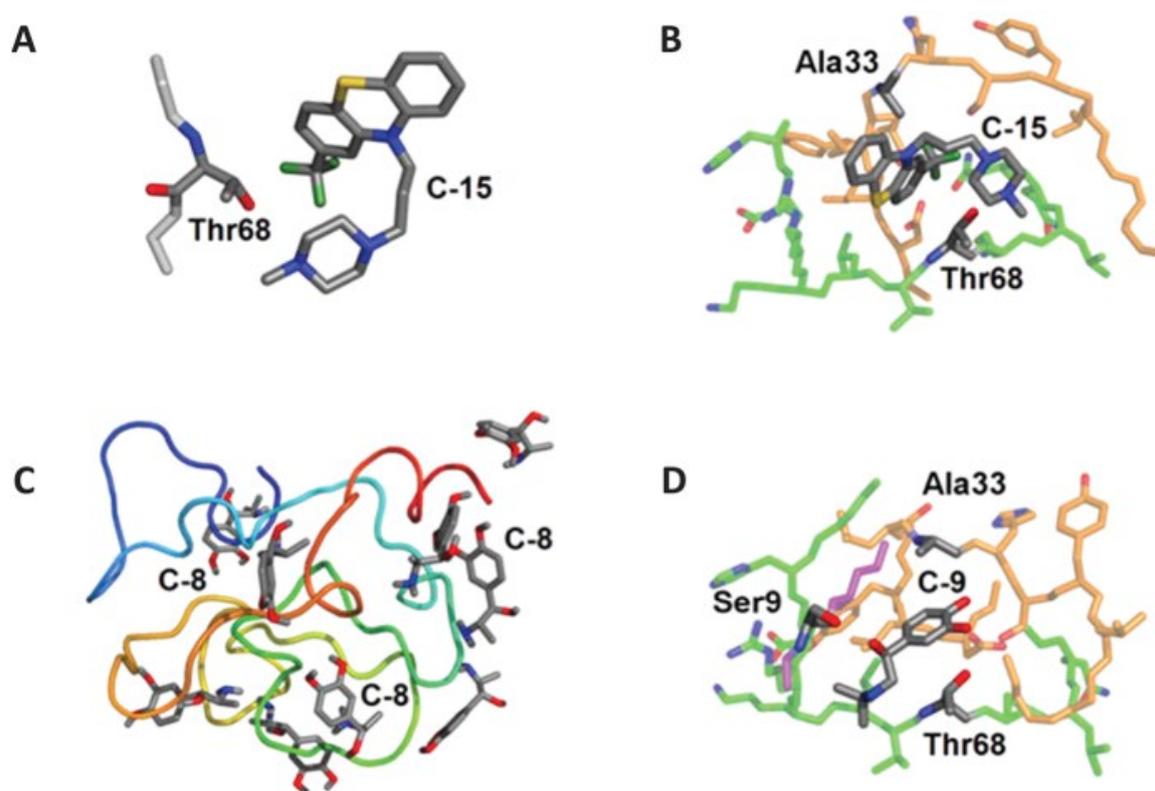
Para el modelaje de los compuestos, se llevaron a cabo experimentos de acoplamiento (*docking*) molecular a partir de las estructuras obtenidas por simulación mediante dinámica molecular (DM) tanto para la proteína como para los compuestos aislados, lo que permitió predecir la conformación más estable del complejo formado entre ambos.

El punto de partida fueron un gran número de conformaciones diferentes de NUPR1 diseñadas mediante simulaciones de DM por el método de colapso de la cadena de la proteína extendida. Estas conformaciones compartían la característica común de ser

## RESULTADOS

estructuras de glóbulo fundido, con un tamaño compatible con el radio hidrodinámico medido en los experimentos DOSY RMN,  $22\pm 3$  Å, y sin estructura secundaria definida, lo que coincide con las informaciones previas. Y, aunque este conjunto de estructuras de NUPR1 seleccionadas no forman necesariamente un conjunto representativo de la simulación, sí que proporcionan una aproximación de la conformación preferida de la proteína en solución, por lo que consideramos apropiado su uso en experimentos de *docking* molecular para determinar potenciales zonas de unión de la misma en la unión con los compuestos. Así se pudo investigar la unión local de los compuestos a la cadena principal de la proteína bajo diversas condiciones.

Los principales hallazgos de los experimentos de acoplamiento o *docking* molecular llevados a cabo se muestran en la siguiente figura (Figura R2.4.4)



**Figura R2.4.4:** *Docking* o acoplamiento molecular entre los compuestos y la proteína NUPR1 A) Modo de unión del compuesto C15 con la cadena lateral de la Thr68. La figura muestra también una porción de la cadena principal de la proteína (gris claro); B) Bolsillo transitorio de la proteína modelado por combinación de los modos de unión del compuesto C15 con las porciones de la cadena principal de NUPR1 incluyendo los residuos 27-40 (naranja) y 62-72 (verde); C) Numerosos modos de unión para el compuesto C8 con la cadena principal de la proteína (N- y C-

## RESULTADOS

terminales se muestran en azul y rojo respectivamente); D) Bolsillo transitorio de la proteína NUPR1 modelado por la combinación de diferentes modos de unión del compuesto C9 con la cadena principal de la proteína NUPR1, que involucra a los residuos 8-11 (morado), 27-40 (naranja) y 60-72 (verde). Para todas las representaciones fue utilizado el programa PyMol (DeLano WL (2002) (<http://www.pymol.org>). Los hidrógenos y los oxígenos de la cadena principal de la proteína no están mostrados y los nitrógenos del esqueleto de la proteína están coloreados solo para los residuos implicados en la interacción.

Los resultados más significativos obtenidos en el *docking* molecular (figura R2.4.4) fueron los siguientes:

- Las energías de unión más favorables (-6.5 Kcal/mol) fueron obtenidas para los compuestos C15 y C2 (Figura R2.4.4.A) interaccionando con la cadena lateral de la Thr68, que resultó ser el sitio de unión preferido de la proteína NUPR1. En concreto, se observó como el compuesto C2 interactúa con la proteína a través de la región central que abarca sus tres anillos conectados, mientras que los demás grupos del ligando se encontraban solvatados (imagen no mostrada). La energía de esta unión fue  $< -6,5$  Kcal/mol, tratándose por tanto de una interacción energéticamente favorable.

- Otros compuestos, como por ejemplo los compuestos C6, C8 y C9, mostraban una menor afinidad por la proteína (Figura R2.4.4.C). Por ejemplo, el compuesto C8, mostraba una afinidad de unión de  $< -5,5$  kcal/mol, un poco menor que en el caso anterior, aunque seguía siendo una reacción favorable, y, en su unión con la proteína estaba implicada una interacción entre su anillo de benceno con la cadena lateral de Thr68.

Una diferencia si lo comparamos con el compuesto C2, fue que en el caso del *Docking* del compuesto C8, la Thr68 no es su único posible acoplamiento, sugiriendo que contactos con residuos adicionales en la cadena principal de la proteína podrían contribuir significativamente a fijar el compuesto.

De especial interés resulta el acoplamiento del compuesto C9 (Figura R2.4.4.D) con la proteína NUPR1, por ser el compuesto cuya interacción afecta a mayor número de residuos de la proteína según los experimentos de RMN. Además, la similitud estructural entre el compuesto C8 y el compuesto C9, permite una comparación directa de los resultados obtenidos en los dos casos. Tanto la Thr68 como la Ser9-Ala10 proporcionan

## RESULTADOS

las mejores localizaciones para los compuestos. En ambas posiciones se trata de reacciones favorables, con una energía de unión para ambas posiciones de acoplamiento de  $<-6,0$  kcal/mol. Para el resto de los modos de unión se observa una menor afinidad entre proteína y ligando, con una diferencia entre ambas situaciones de  $\Delta G \geq 1,0$  kcal.

- Para algunos de los compuestos, la energía de unión calculada fue tan baja (-3.0 Kcal/mol), como por ejemplo en el caso del compuesto C8, que únicamente podrían cuadrar con los datos experimentales asumiendo que múltiples residuos (incluyendo la Ala33, Ser9 y la Ala10) cooperan juntos en la interacción del ligando. De hecho, los modos de unión predichos por el programa AutoDock Vina para este compuesto podrían involucrar varios residuos de NUPR1 como muestra la figura, incluyendo como en los casos anteriores a la Thr68 y la Ala33. Para relacionar este resultado con los datos de RMN, es razonable asumir que la Thr68 y la Ala33 cooperan conjuntamente para unir el compuesto C8, en vez de interactuar con el de una forma independiente el uno del otro. Esta hipótesis es apoyada por la localización de esos dos residuos en las partes más hidrofóbicas de la secuencia de la proteína, como se evidencia en la Figura R2.4.4.C, lo que sugiere que ambos residuos, Thr68 y Ala33 son espacialmente adyacentes por lo menos en la presencia del ligando, y que pueden actuar juntos para formar una región de la proteína única que está parcialmente protegida del solvente y que es clave en la unión de los ligandos.

Esto fue verificado modelando algunos bolsillos en la proteína (Figura R2.4.4.B y Figura R2.4.4.D), lo que mostraba un aumento de la afinidad de hasta 3 Kcal/mol: Para profundizar más en este último punto, se llevó a cabo un “*docking* de fragmentos” individualmente tanto para el compuesto C8 como para el compuesto C9, incluyendo en cada uno de ellos tanto los compuestos como las porciones locales de la cadena principal de la proteína que se encuentra interaccionando con ellos en sus distintos modos de unión. Estos fueron combinados en un complejo único que fue equilibrado mediante simulaciones de dinámica molecular, como se muestra en el ejemplo de la Figura R2.4.4.D. La combinación de los fragmentos de la proteína implicados en los distintos modos de unión crea un bolsillo en la proteína. La afinidad, es decir, la energía de unión, calculada para el ligando unido dentro de tales bolsillos de la proteína, se encontró que aumentaban más de 3-4 kcal/mol comparado con las posiciones de los fragmentos individuales, aunque en general esta energía de unión depende mucho de los detalles de

## RESULTADOS

la conformación resultante. Los mejores modos de unión para el compuesto C9 fueron obtenidos cuando la cadena lateral de la Leu29 de la proteína interactúa con su cola isopropilo, lo que no ocurre en el caso del compuesto C8, el cual no tiene ese aducto químico y no interactúa con Leu29, como se puede observar en los experimentos de RMN.

Por otro lado, incluso en el caso más favorable (compuestos C15 y C2), la energía de unión podría ser también reducida en la misma proporción (hasta -3.0 Kcal/mol) si el ligando es acoplado en la misma posición, pero solamente incluyendo en el cálculo una pequeña región de 5-10 residuos del esqueleto de la proteína alrededor de los residuos de unión. Por lo tanto, estos resultados indican que, aunque Thr68, concretamente su cadena lateral, es el residuo de unión preferido en NUPR1, no sólo es importante un residuo particular para proporcionar el sitio de anclaje para el compuesto correspondiente, sino que es importante también la presencia concomitante de otros aminoácidos cercanos.

- Finalmente, los resultados de *docking* entre los compuestos C10 y C12 y la proteína NUPR1 fueron altamente variables y dependían incluso de una forma más llamativa que en el caso anterior de la geometría de unión del complejo. Esto es especialmente evidente para el compuesto C12, probablemente debido a la complejidad en la estructura química del mismo. Además, la presencia simultánea de los iones maleato y metanosulfonato que acompañan a estos compuestos, podrían tener un papel adicional en la unión. En relación con esto último, cabe destacar que también en el caso del compuesto C9, la presencia del ion bitartrato que lo acompaña, podría tener un efecto suplementario, ya que el *docking* del mismo en NUPR1 mostraba que podría interactuar con un número de residuos de la proteína que incluyen Gly39 y Ser10-Ala11.

### **3. ESTUDIOS “*IN VITRO*” CON CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS HUMANAS**

Los experimentos llevados a cabo en la primera parte de este trabajo, basados en herramientas biofísicas y computacionales parecían demostrar la interacción entre la proteína NUPR1 y la mayoría de los compuestos seleccionados en el cribado HTS inicial (C1-C15) a nivel extracelular. Para demostrar nuestra hipótesis principal de trabajo, es

## RESULTADOS

decir, que la unión de los compuestos a la proteína NUPR1, modularía la unión de la misma a sus ligandos biológicos, alterando las propiedades protumorales de los complejos biológicos, es necesario confirmar en primer lugar si esa interacción se producía también a nivel intracelular y ver posteriormente si esa unión afectaba de alguna manera a las funciones celulares. Para ello se llevaron a cabo los estudios celulares y animales que se muestran a continuación.

### **3.1 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN NUPR1-LIGANDO A NIVEL INTRACELULAR: ENSAYO DE LIGACIÓN POR PROXIMIDAD *IN SITU* (PLA: *PROXIMITY LIGATION ASSAY*)**

Los primeros ensayos llevados a cabo para investigar la unión de los compuestos seleccionados a la proteína NUPR1 a nivel intracelular fueron los ensayos de ligación por proximidad *in situ* o de ligación de proteínas (PLA).

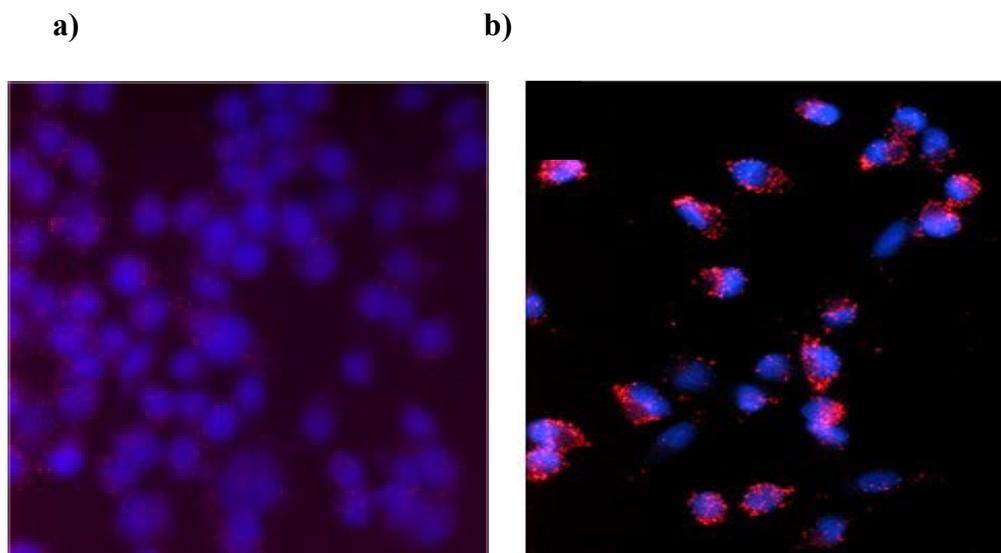
Existe un ligando biológico de NUPR1, la proteína MSL1, que interacciona en la primera en respuesta al daño en el DNA celular para formar el complejo de reparación del DNA NUPR1-MSL1 (Aguado-Llera et al., 2013b). Esta interacción natural es la base del estudio indirecto de la interacción NUPR1-compuesto llevado a cabo mediante PLA en este trabajo. La idea era estudiar si los compuestos eran capaces de unirse intracelularmente a NUPR1 y bloquear la interacción de la proteína con uno de sus ligandos biológicos, el MSL1. Para ello se monitorizó la interacción entre NUPR1 y MSL1 en las células de cáncer de páncreas MiaPaca-2 tratadas o no, en el caso del control, con los distintos compuestos y en presencia de oxaliplatino, ambos a una concentración de 10 $\mu$ M. La función del oxaliplatino era provocar un daño en el DNA y la consiguiente formación del complejo de reparación entre NUPR1 y MSL1.

En la técnica de ligación PLA, las células MiaPaca2 transfectadas con los plásmidos de las proteínas NUPR1-Flag y MSL1-V5 y tratadas o no con los compuestos en presencia de oxaliplatino, fueron incubadas respectivamente con los anticuerpos anti-Flag y anti-V5 en primer lugar. Posteriormente fueron incubadas con las sondas fluorescentes PLA+ y PLA-, que a su vez estaban compuestas por un anticuerpo secundario contra especie unido a un fragmento de DNA. Tras la incubación se llevó a cabo la ligación y amplificación tal y como ha sido descrito previamente (Aguado-Llera et al., 2013b). La

## RESULTADOS

ligación de las sondas PLA+ y PLA- y la formación de un círculo cerrado de DNA, es decir, un DNA concatámero marcado sobre el que hibridan las sondas, permitiendo una amplificación por círculo rodante y la aparición de una señal fluorescente, únicamente se produciría si las sondas estaban lo suficientemente cerca (<40nm) es decir. Es decir, las señales de puntos fluorescentes solo aparecerían si existía una interacción entre ambas proteínas (NUPR1 y MSL1) y se había formado un complejo estable entre ellas. Por el contrario, si las proteínas no interaccionaran y estuvieran separadas, las sondas estarían alejadas entre sí y no se produciría amplificación del DNA, por lo que no se observaría ninguna señal fluorescente.

El resultado obtenido en este ensayo de ligación de para el caso del control negativo, es decir, de las células transfectadas únicamente con la proteína NUPR1 y sin tratar con los compuestos; y para el caso del control positivo, es decir, de las células transfectadas tanto con la proteína NUPR1 como con MSL1, pero sin tratar con los compuestos, se muestran en la siguiente figura (Figura R3.1.1)



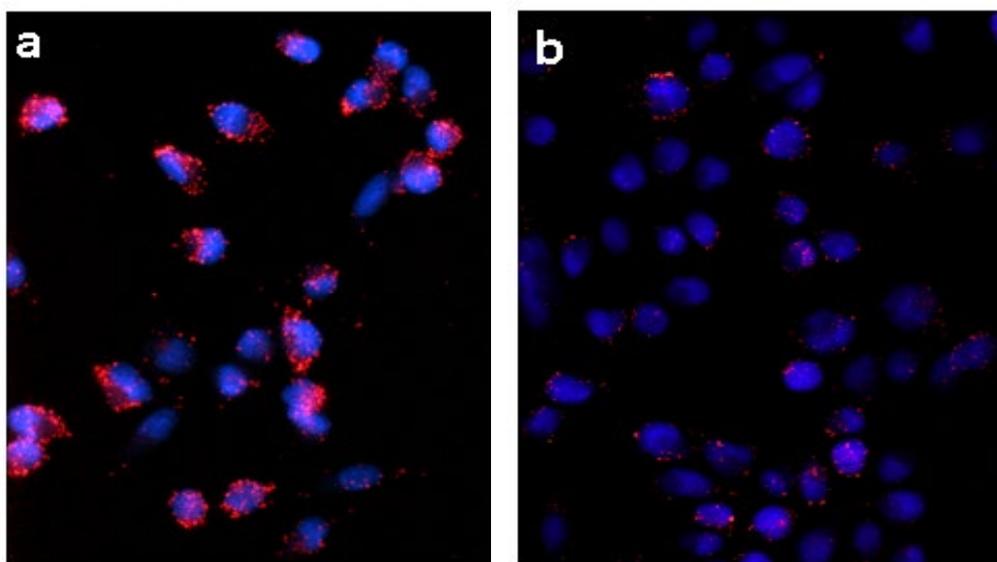
**Figura R3.1.1:** Ensayo de ligación por proximidad *in situ* o ligación de proteínas (PLA) de las proteínas NUPR1 y MSL1 en células de cáncer de páncreas MiaPaca2: a) Control negativo. Las células MiaPaca2 fueron sembradas en cubres y transfectadas a) únicamente con el plásmido pcDNA3-NUPR1-Flag: control negativo; o b) con los plásmidos pcDNA3-NUPR1-Flag y pcDNA4-V5-HIS-MSL1: control positivo. A las 24h, ambas células fueron tratadas con oxaliplatino (10 $\mu$ M) para inducir daño en el DNA y provocar la unión de NUPR1 y MSL1 para formar el complejo de reparación del DNA, y DMSO, ya que los compuestos están disueltos en este disolvente. La técnica PLA fue llevada a cabo 24 horas después tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos. Las imágenes fueron

## RESULTADOS

tomadas a 40x con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i y analizadas con el programa ImageJ para estimar el número de puntos rojos fluorescentes que representan la intensidad de la unión NUPR1-MSL1 para formar el complejo de reparación del DNA.

Como muestra la figura anterior (Figura R3.1.1), y en concordancia con lo mencionado anteriormente, en el caso del control negativo (Figura R3.1.1.a) en el que las células únicamente habían sido transfectadas con la proteína NUPR1 y no con la proteína MSL1, no se observaba señal fluorescente debido a que las células solo expresaban en concentración significativa una de las proteínas implicadas en la interacción. Lo contrario se pudo observar en el caso del control positivo (Figura R3.1.1.b), donde las células, transfectadas tanto con la proteína NUPR1 como con la proteína MSL1, pero sin haber sido tratadas con ninguno de los compuestos, mantenían intacta su interacción natural entre ambas proteínas tras la inducción del daño celular por el oxaliplatino, lo que concuerda con la observación de un número considerable de puntos fluorescentes intracelulares.

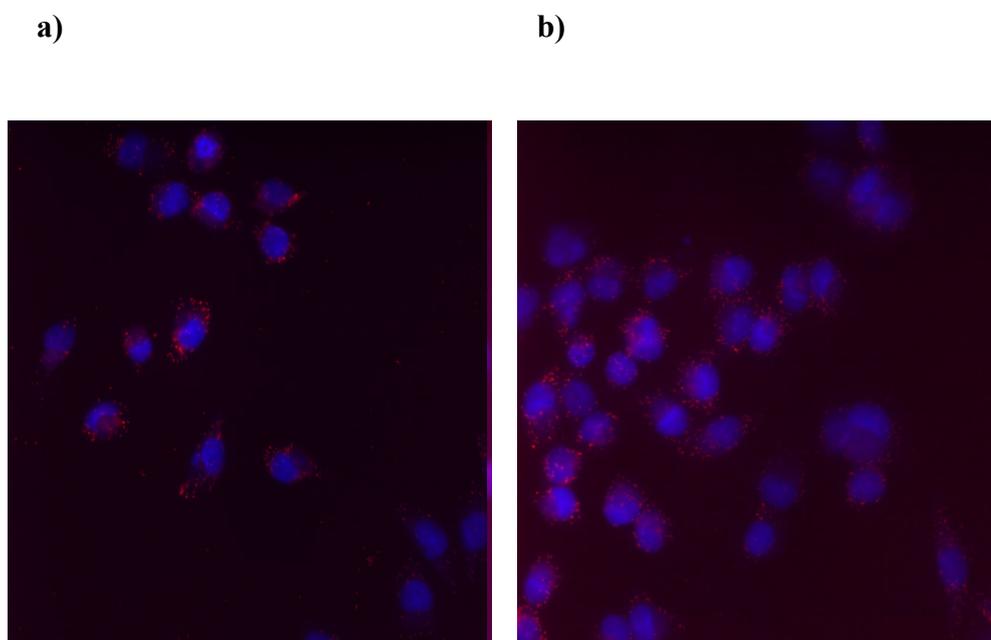
Por otro lado, al llevar a cabo este ensayo de ligación de proteínas (PLA) con las células transfectadas con ambos plásmidos y tratadas con los distintos compuestos (C1-C15) a una concentración de 10 $\mu$ M, se obtuvieron resultados claramente diferenciados tal y como se muestra con los siguientes ejemplos (Figuras R3.1.2 y R3.1.3).



**Figura R3.1.2:** Ensayo de ligación por proximidad *in situ* o ligación de proteínas (PLA) de las proteínas NUPR1 y MSL1 en células adenocarcinoma ductal de páncreas

## RESULTADOS

MiaPaca2. Las células fueron sembradas en cubres y tranfectadas con los plásmidos pcDNA3-NUPR1-Flag y pcDNA4-V5-HIS-MSL1. A las 24h, las células fueron tratadas simultáneamente con oxaliplatino (10 $\mu$ M) para inducir daño en el DNA y provocar la unión de NUPR1 y MSL1 para formar el complejo de reparación del DNA, y: a) DMSO (control positivo: células no tratadas) o b) compuesto C15 a una concentración de 10 $\mu$ M y disuelto en DMSO. La técnica fue llevada a cabo 24 horas después tal y como ha sido descrita en Materiales y Métodos. Las imágenes fueron tomadas a 40x con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 90i y analizadas con el programa ImageJ para estimar el número de puntos rojos fluorescentes, que representan el número de interacciones NUPR1-MSL1 producidas intracelularmente. La reducción en el número de puntos rojos fluorescentes es proporcional a la inhibición de la interacción MSL1-NUPR1 por parte del C15.



**Figura R3.1.3:** Ensayo de ligación por proximidad *in situ* o ligación de proteínas (PLA) de las proteínas NUPR1 y MSL1 en células de cáncer de páncreas MiaPaca2. Las células fueron sembradas en cubres y tranfectadas con los plásmidos pcDNA3-NUPR1-Flag y pcDNA4-V5-HIS-MSL1. A las 24h, las células fueron tratadas simultáneamente con oxaliplatino (10 $\mu$ M) para inducir daño en el DNA y provocar la unión de NUPR1 y MSL1 para formar el complejo de reparación del DNA, y: a) DMSO (control positivo: células sin tratar) o b) compuesto C6 a una concentración de 10 $\mu$ M (disuelto en DMSO). La técnica fue llevada a cabo 24 horas después tal y como ha sido descrita en Materiales y Métodos. Las imágenes fueron tomadas a 40x con el microscopio de fluorescencia

## RESULTADOS

Nikon Eclipse 90i y analizadas con el programa ImajeJ para estimar el número de puntos rojos fluorescentes que representan el número de interacciones NUPR1-MSL1 producidas intracelularmente. La reducción en el número de puntos rojos fluorescentes es proporcional a la inhibición de la interacción MSL1-NUPR1 por parte del compuesto C6.

Los ejemplos anteriores son una muestra de lo observado en los experimentos de ligación de proteínas en las células que expresaban tanto NUPR1 como MSL1 y que fueron tratadas con el resto de los compuestos, en los cuales se obtuvieron resultados dispares dependiendo del compuesto. Por un lado, se observó un grupo de compuestos, representados por el ejemplo del compuesto C15 (Figuras R3.1.2), en los que se observó una disminución en el número de puntos fluorescentes respecto al control positivo, lo que implicaría una disminución de la interacción natural entre las proteínas NUPR1 y MSL1 por acción de los compuestos. Este grupo de compuestos estaba formado por los compuestos C2, C3, C9, C10, C12, C13 y C15, Dichos compuestos, por tanto, habrían logrado bloquear o dificultar la unión de NUPR1 con uno de sus ligandos biológicos, la proteína MSL1. Sin embargo, en el segundo grupo de compuestos, representado por el ejemplo del compuesto C6 y formado por los compuestos C1, C4, C6, C8, C11, y C14, no se observó una diferencia significativa en la señal de fluorescencia (Figuras R3.1.3) entre las células tratadas con estos compuestos y las células sin tratar, por lo que estos compuestos parecen no afectar a la unión de ambas proteínas a nivel intracelular.

Hay que señalar que en el caso del compuesto C5 no fue posible la realización de la técnica dificultades técnicas, y en el caso del compuesto C7, se producía la precipitación del mismo en las condiciones de trabajo ensayadas.

### **3.2 ESTUDIOS CELULARES: EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS TUMORALES CON LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS**

Una vez demostrada la interacción de varios de los compuestos ensayados (C1-C15) con la proteína NUPR1 tanto a nivel extracelular (estudios biofísicos y computacionales) como intracelular (estudios de ligación de proteínas o PLA), se planteó la segunda cuestión, que fue investigar sobre el efecto que la formación de dicho complejo NUPR1-compuesto podría tener en algunas de las propiedades protumorales de la proteína NUPR1

## RESULTADOS

en las células cancerígenas, concretamente en células de adenocarcinoma de páncreas humano. En este contexto se llevaron a cabo una serie de experimentos con el objetivo de estudiar estas propiedades protumorales de las células MiaPaca-2 y compararlas con las mismas propiedades en las células tratadas con los compuestos, para ver si los compuestos eran capaces de producir algún cambio. Estos experimentos fueron los que se describen a continuación.

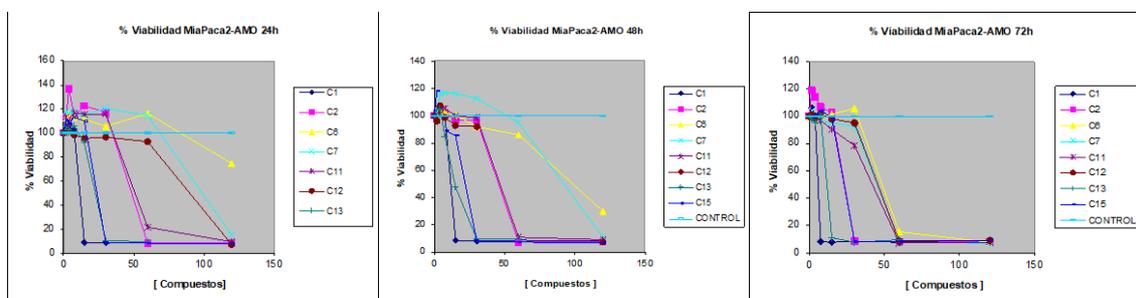
### 3.2.1 ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR

Los primeros estudios realizados para evaluar el efecto citotóxico de los compuestos C1-C15, o lo que es lo mismo, la capacidad de los mismos de disminuir la viabilidad de las células tumorales, fueron estudios de citotoxicidad celular. Estos fueron llevados a cabo mediante el kit *CellTiter*, el cual utiliza el colorante MTS como índice de la viabilidad celular. Las enzimas deshidrogenasas mitocondriales de las células metabólicamente activas (células viables), transforman el MTS de color amarillo en un compuesto de formarán soluble de color azul, el cual absorbe radiación a una longitud de onda de 490nm. La disminución en la formación de este compuesto de formarán, se relaciona con la pérdida de funcionalidad mitocondrial, y por lo tanto de viabilidad celular, o, dicho de otra manera, la cantidad de producto de formarán producido es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas.

En los experimentos de citotoxicidad iniciales, las células MiaPaca-2 fueron tratadas con concentraciones decrecientes de los compuestos C1-C15 (de 120 $\mu$ M, a 0  $\mu$ M en el caso del control) durante 24, 48 y 72h. Tras el tratamiento de las células y la adición del reactivo *CellTiter*, se calculó la viabilidad celular mediante la medida de la absorbancia de cada uno de los pocillos a 490 y 700 nm (consideramos que la absorbancia a  $\lambda=700$ nm debería ser cero, por lo que la usamos como blanco de nuestros experimentos). La absorbancia final de cada pocillo fue definida como:  $Abs = Abs_{490} - Abs_{700}$ ; y el % de viabilidad celular se calculó normalizado el resultado anterior por la absorbancia de células sin tratar (control) según la fórmula:  $\%viabilidad = (Abs_{células\ tratadas} / Abs_{células\ control}) \times 100$ .

## RESULTADOS

Se muestran como ejemplo los resultados de aquellos compuestos que mostraban ser citotóxicos para las células tumorales MiaPaca2, es decir, aquellos compuestos en los que se observaron disminuciones en la viabilidad celular tras el tratamiento con los mismos (Figura R3.2.1.1)



**Figura R3.2.1.1:** Estudios de viabilidad celular de las células tumorales MiaPaca-2 tratadas con los compuestos C1, C2, C6, C7, C11, C12, C13 y C15 a concentraciones decrecientes que van desde una concentración de compuesto de 120 μM hasta 0 μM en el caso del control, al que se le añadió DMSO para igualar la concentración de este disolvente a la de las células tratadas con los compuestos. Las células fueron incubadas con los compuestos a 37°C durante a) 24h, b) 48h o c) 72h tras lo que se procedió al estudio de su viabilidad mediante el método colorimétrico “CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay” tal y como ha sido descrito en el materiales y métodos. El cálculo de la absorbancia para cada caso se calculó mediante la fórmula  $Abs = Abs_{490} - Abs_{700}$ , y el % de viabilidad celular se calculó normalizado el resultado por la absorbancia de células sin tratar mediante la fórmula:  $\%_{viabilidad} = (Abs_{células\ tratadas} / Abs_{células\ control}) \times 100$ . En las gráficas se representa el % de viabilidad celular en función de la concentración de cada uno de los compuestos.

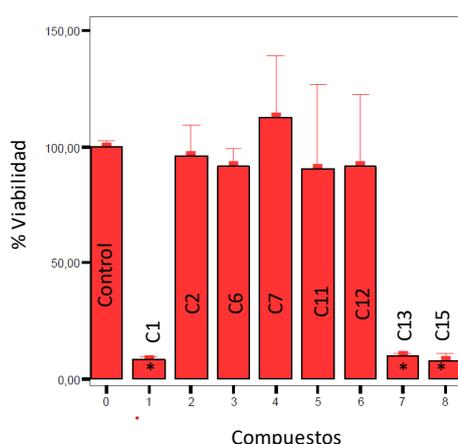
Como se observa en la figura anterior (Figura R3.2.1.1), se obtuvieron resultados significativos en el caso de las células tratadas con los compuestos C1, C2, C6, C7, C11, C12, C13 y C15, en los que se observó una clara disminución de la viabilidad celular, monitorizada por un descenso en la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial de las mismas, lo que es lo mismo, por una disminución de la absorbancia, tras el tratamiento de las células MiaPaca2 con los mismos. Este efecto es mucho más llamativo en el caso de los compuestos C1, C13 y C15, en los que, según se aprecia en las gráficas, sería necesaria una concentración muy baja de los mismos para disminuir significativamente al número de células MiaPaca-2 viables, destacando también la rapidez de este efecto, ya notable a las 24h de tratamiento. A medida que el tiempo de incubación aumenta a 48 y

## RESULTADOS

72h, son más los compuestos que afectan de una manera importante a la viabilidad de las células MiaPaca2 a bajas concentraciones. Podemos sugerir, por tanto, que el descenso en el número de células de adenocarcinoma de páncreas viables tratadas con los compuestos es directamente proporcional a la concentración de los mismos y al tiempo de incubación, siendo más acusado a mayor concentración del compuesto y mayor tiempo de incubación.

En el resto de los compuestos (gráficas no mostradas), no había una variación significativa de la viabilidad celular en las células tratadas con ellos respecto a las células sin tratamiento (control), por lo que estos compuestos no presentan actividad citotóxica frente a las células MiaPaca-2, al menos a una concentración de los mismos de 120 $\mu$ M o menor.

Se llevó a cabo un estudio más detallado de los datos anteriores analizando el % de células viables a una concentración determinada de compuesto, para observar los efectos citotóxicos de los distintos compuestos a la misma concentración sobre las células MiaPaca2. Se analizaron el número de células viables tras la incubación, durante 24h, de las células con los compuestos a una concentración de 30  $\mu$ M, por considerar esta una concentración razonable para observar el efecto tóxico en las células tumorales y minimizar sus efectos secundarios en células sanas llegado el caso. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente (Figura R3.2.1.2)



**Figura R3.2.1.2:** Estudios de citotoxicidad celular de las células tumorales MiaPaca2 tratadas con los compuestos a una concentración de 30 $\mu$ M, excepto en el caso del control en el que únicamente se trató con DMSO (0.6%). Las células fueron incubadas a 37°C con los compuestos durante 24h,

## RESULTADOS

tras lo que el reactivo MTS del kit utilizado en el experimento (*CellTiter-Blue*) fue añadido. Pasadas 3 horas de incubación en estufa, se procedió a la medida de la absorbancia de cada pocillo a 490nm y 700nm, tal y como se ha descrito en materiales y métodos. En las gráficas se representa el % de viabilidad celular (calculado como  $(\text{Absorbancia}_{\text{células tratadas}}/\text{Absorbancia}_{\text{células control}}) \times 100$ ) de las células tumorales tratadas con los compuestos a una concentración de 30 $\mu\text{M}$ . Las barras de error corresponden a la desviación estándar de 3 experimentos realizados de manera independiente y la significación estadística fue de  $p < 0.05$ .

Como se ha mencionado anteriormente y se vuelve a apreciar en la figura anterior (Figura R3.2.1.2), destacan sobre los demás los compuestos C1, C13 y C15 que, de manera muy precoz, con tan solo 24h de tratamiento, logran disminuir la viabilidad de las células tratadas por debajo de un 10% respecto al control, resultando ser los compuestos más citotóxicos de los ensayados en este trabajo frente a las células de adenocarcinoma ductal de páncreas.

Un término muy utilizado en la industria farmacéutica para evaluar la eficacia de un fármaco es la concentración inhibitoria semimáxima o IC50. Por definición IC50 indica la cantidad de fármaco necesaria para inhibir un proceso biológico a la mitad, proporcionando así una medida de la potencia de un fármaco antagonista en la investigación farmacológica (Andrews, 2001). Basándonos en esto, el siguiente paso fue el ajuste de las gráficas obtenidas en los experimentos de citotoxicidad anteriores (Figura R3.2.1.2) para la obtención de los valores de IC50, que en nuestro caso representa la concentración de compuesto con la que se han de tratar las células MiaPaca2 para ver reducida su viabilidad en un 50% respecto a las células sin tratar. Los resultados se muestran en la siguiente tabla (Tabla R3.2.1.3)

<b>IC50</b>	<b>MiaPaca2 24h</b>	<b>MiaPaca2 48h</b>	<b>MiaPaca2 72h</b>
<b>C1</b>	11-12 $\mu\text{M}$	11 $\mu\text{M}$	11 $\mu\text{M}$
<b>C2</b>	48 $\mu\text{M}$	45 $\mu\text{M}$	23 $\mu\text{M}$
<b>C6</b>	>120 $\mu\text{M}$	98 $\mu\text{M}$	48 $\mu\text{M}$
<b>C7</b>	100 $\mu\text{M}$	92 $\mu\text{M}$	45 $\mu\text{M}$
<b>C11</b>	51 $\mu\text{M}$	46 $\mu\text{M}$	43 $\mu\text{M}$
<b>C12</b>	90 $\mu\text{M}$	77 $\mu\text{M}$	45 $\mu\text{M}$
<b>C13</b>	23 $\mu\text{M}$	15 $\mu\text{M}$	12 $\mu\text{M}$
<b>C15</b>	24 $\mu\text{M}$	22 $\mu\text{M}$	24 $\mu\text{M}$

## RESULTADOS

**Tabla R3.2.1.3:** IC<sub>50</sub> o concentración inhibitoria semimáxima para cada uno de los compuestos con efecto citotóxico (C1, C2, C6, C7, C11, C12, C13, y C15) sobre las células MiaPaca2, obtenida a partir de los experimentos de citotoxicidad llevados a cabo tras el tratamiento de las mismas con concentraciones decrecientes de los compuestos (concentraciones de 120  $\mu$ M a 0  $\mu$ M en el caso del control) durante 24, 48 y 72h. El valor de IC<sub>50</sub> representa la concentración de compuesto que causa la disminución del 50% células MiaPaca-2 viables.

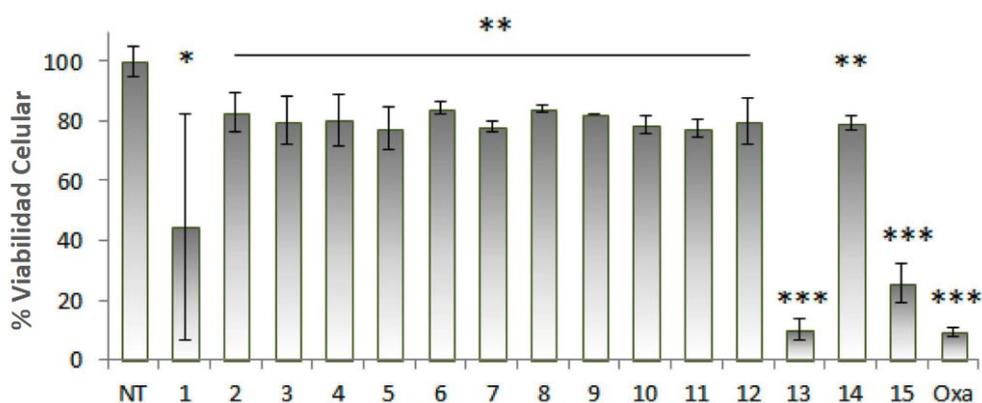
Como ya ha sido mencionado anteriormente en los experimentos de viabilidad celular, se observó un grupo de compuestos, formado por los compuestos C3, C4, C5, C8, C9, C10, y C14 (datos no mostrados), en los que no se observaba una disminución en la viabilidad de las células MiaPaca2 tras su tratamiento con los mismos a una concentración máxima de 120 $\mu$ M. Por tanto, en este grupo de compuestos, los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos fueron > 120 $\mu$ M incluso al máximo tiempo (72h) de incubación, lo que implica que estos compuestos no afectaban a la viabilidad celular incluso a concentraciones muy altas de compuesto. En un principio, estos compuestos no resultarían útiles en la práctica clínica por la cantidad de efectos secundarios que pudieran causar al necesitar una concentración muy elevada de compuesto para mostrar efectos citotóxicos significativos en las células tumorales.

Por el contrario, en el grupo de compuestos formado por los compuestos C1, C2, C6, C7, C11, C12, C13 y C15, se observó un efecto citotóxico variable a las distintas concentraciones ensayadas sobre las células MiaPaca2 (Figura R3.2.1.2). Los valores de IC<sub>50</sub> para este grupo de compuestos mostraban valores de IC<sub>50</sub> relativamente bajos, por lo que la concentración de compuesto necesaria para disminuir un 50% el número de células tumorales viables era una concentración razonable para ser utilizadas en la práctica clínica (tabla R3.2.1.3). Además, este efecto estaba relacionado con el tiempo de incubación en la mayoría de los casos, siendo más significativo a medida que el tiempo de incubación aumentaba. Cuanto mayor era el tiempo de incubación, menos concentración de compuesto era necesaria para causar el mismo efecto en las células (menor IC<sub>50</sub>) (excepto en el C1 y el C15 que se mantenía constante). De nuevo hay que destacar los valores de IC<sub>50</sub> significativamente menores en el caso de los compuestos C1, C13 y C15, donde ya a muy baja concentración de compuesto hay una afectación

## RESULTADOS

importante en el número de células tumorales viables, con un efecto muy inmediato, notándose su citotoxicidad incluso a las 24h de tratamiento. Concretamente para el compuesto C1 se obtuvo un IC<sub>50</sub> de 11µM, para el compuesto C13 de 23 µM, y para el compuesto C15 de 24 µM a las 24h de tratamiento. El resto de los compuestos de este grupo, aún teniendo actividad citotóxica sobre las células tumorales, necesitaban una concentración mayor o un mayor tiempo de tratamiento para que la viabilidad celular se viera afectada significativamente.

En vista de los resultados anteriores, se decidió hacer un nuevo experimento de viabilidad celular aumentando el tiempo de incubación hasta 6 días tal y como se ha descrito en materiales y métodos. La idea era tratar las células tumorales MiaPaca2 con todos los compuestos C1-C15 a baja concentración, para ver el efecto de una menor concentración de los compuestos, pero a largo plazo. Tras el tratamiento de las células con los compuestos a una concentración de 10µM y la incubación de las mismas a 37°C durante 6 días, se determinó la viabilidad celular con el kit *CellTiter* como se ha detallado anteriormente. Como control negativo se utilizaron células MiaPaca sin tratar (sólo con DMSO, para igualar la concentración de este disolvente de las células tratadas con los compuestos) y como control positivo del experimento se utilizaron las células incubadas con el compuesto quimioterápico Oxaliplatino a una concentración de 60nm. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura (Figura R4.2.1.4).



**Figura R3.2.1.4:** Estudios de citotoxicidad celular de las células tumorales MiaPaca-2 tratadas con los compuestos C1-C15 a una concentración de 10µM durante 6 días. Como control negativo se utilizaron células sin tratar con un 0.6% de DMSO. Las células MiaPaca2 fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 10000

## RESULTADOS

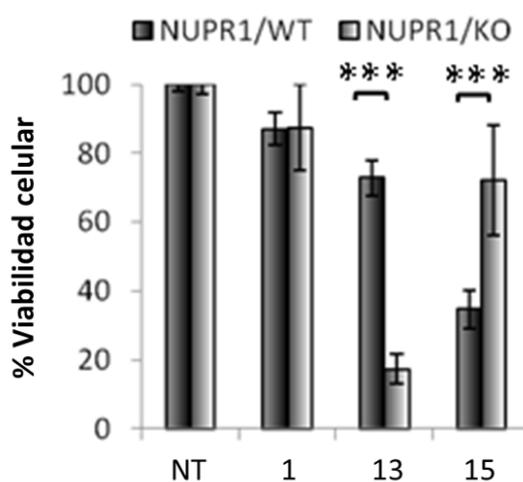
células/pocillo y tratadas con los compuestos durante 6 días tras lo que se estudió su % de viabilidad mediante el método colorimétrico “*CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*” tal y como ha sido descrito en materiales y métodos. Tras el tratamiento, el reactivo MTS del kit *Celltiter* fue añadido, y tras 3 horas de incubación, se procedió a lectura de la absorbancia de cada pocillo a 490 y 700 nm. En las gráficas se muestra el % de viabilidad celular en función del compuesto. NT: Células no tratadas o control negativo. Oxa: Células tratadas con el quimioterápico Oxaliplatino a una concentración de 60nM. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres experimentos independientes y el p-valor sumido: \*  $\leq 0.1$ ; \*\*  $\leq 0.05$ ; \*\*\*  $\leq 0.0001$ ).

Los resultados obtenidos al tratar a las células MiaPaca2 con una menor concentración de los compuestos (10 $\mu$ M) durante más tiempo (Figura R3.2.1.4), son similares a los que se habían obtenido con menor tiempo de tratamiento a mayor concentración de los compuestos (Figura R3.2.1.2). De nuevo se pudo observar cómo los compuestos con las diferencias más significativas en cuanto a la disminución del número de células viables respecto al control son los compuestos C1, C13 y C15, y más concretamente dentro de este grupo, los compuestos C13 y C15 son los que muestran las diferencias más acusadas. Estos dos compuestos mostraron una estabilidad mayor que el resto de los compuestos, y se muestran muy eficientes en reducir la viabilidad celular de las células tumorales, mostrando un porcentaje de células vivas de 10 $\pm$ 3% en el caso del compuesto C13, y de un 26 $\pm$ 7% en el caso del compuesto C15, comparado con el 100% de células vivas de las células sin tratar (p-valor $\leq$ 0.01). De hecho, estos valores en el número de células vivas son comparables a los obtenidos tras el tratamiento de las células con Oxaliplatino, fármaco ampliamente utilizado en los tratamientos quimioterápicos actuales, en el que se obtuvo un valor de células vivas de 10 $\pm$ 2% con un p-valor $\leq$ 0.01.

Todos los resultados anteriores sugerían firmemente que los compuestos C1, C13 y C15 mostraban una importante citotoxicidad frente a las células tumorales MiaPaca-2 afectando significativamente a su viabilidad, por lo que la siguiente cuestión a estudiar fue investigar si ese efecto tóxico es llevado a cabo a través de algún mecanismo que implicara a la proteína NUPR1, es decir, si esa disminución en el número de células viables de las células tumorales estaba causada por la interacción de la proteína y los compuestos.

## RESULTADOS

Aunque ya quedó demostrado con los estudios biofísicos previos que existe interacción entre la proteína NUPR1 y los compuestos, y que las células MiaPaca2 mueren en presencia de los mismos ha quedado demostrado con los experimentos de citotoxicidad, queríamos en esta parte del estudio unir ambas cuestiones para analizar si la muerte de las células tumorales era consecuencia de la interacción de la proteína con los compuestos. Para ello, se llevó a cabo el mismo experimento de citotoxicidad que en el punto anterior, pero usando en este caso dos líneas celulares distintas, por un lado se utilizaron células *knocked-out* (ko) para la proteína NUPR1 obtenidas de un modelo de ratón de adenocarcinoma ductal de páncreas modificado genéticamente para no expresar NUPR1, y por otro, sus células equivalentes *wild-type* (wt) para NUPR1 que si expresan la proteína. Con esto se pretendió analizar si este efecto citotóxico es dependiente de la proteína NUPR1, o, dicho de otra manera, si la sensibilidad de las células a los compuestos depende de la afinidad entre NUPR1 y los compuestos. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura (Figura R3.2.1.5)



**Figura R3.2.1.5:** Estudios de citotoxicidad celular de células primarias de modelo de ratón con adenocarcinoma ductal de páncreas modificado genéticamente para no expresar la proteína NUPR1 (*ko*), y sus respectivas células *wt* tratadas con los compuestos C1, C13 y C15 a una concentración de 10  $\mu$ M durante 6 días. Ambas líneas celulares fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 10000 células/pocillo y el % de viabilidad celular calculado mediante el kit *CellTiter*. Tras el tratamiento con los compuestos, el reactivo MTS del kit *CellTiter* fue añadido, y tras 3 horas de incubación, se procedió a la medida de la absorbancia a 490nm. En las gráficas se muestra el % de viabilidad de ambas líneas celulares en función del

## RESULTADOS

compuesto. NT: Células no tratadas o control negativo. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres medidas independientes (p-valor: \*  $\leq 0.1$ ; \*\*  $\leq 0.05$ ; \*\*\*  $\leq 0.01$ ).

Como se muestra en la gráfica anterior (Figura R3.2.1.5), en el caso del compuesto C1 no se observaron diferencias en cuanto al número de células viables entre las células con y sin expresión de NUPR1 (*WT* vs. *KO*) tras el tratamiento con el compuesto, lo que implica que el compuesto afecta por igual a ambos tipos de células.

Lo contrario se observó en los casos de los compuestos C13 y C15 en los que si se apreciaban diferencias en el efecto citotóxico de los compuestos entre las células que expresan la proteína y las que no la expresan (*WT* vs. *KO*).

En el caso del compuesto C13 se observó una disminución de células viables mas acusada en el caso de las células *KO* (independientemente de la expresión de la proteína NUPR1) comparada con las células que si expresan la proteína, por lo que este compuesto afecta más las células que no expresan NUPR1. El compuesto C13 disminuyó el número de células *KO* para la proteína NUPR1 hasta un  $17\pm 4\%$  (p-valor  $\leq 0.01$ ), mientras que en las células *WT* está disminución en el número de células viables unicamente llegó al  $74\pm 9\%$ , p-valor  $\leq 0.01$ ).

Lo contrario se observó para el compuesto C15, el cual afecta mas a las células que expresan la proteína NUPR1 (*WT*) que a las que no la expresan (*KO*), ya que, como se observa en la gráfica, este compuesto reduce la viabilidad celular al  $35\% (\pm 6\%)$ , p-valor  $\leq 0.01$  en las células con expresión de la proteína NUPR1 (*WT*), mientras que en las células sin expresión de la misma (*KO*), la viabilidad unicamente queda reducida en un  $72\% \pm 16\%$ , (p-valor  $\leq 0.01$ ).

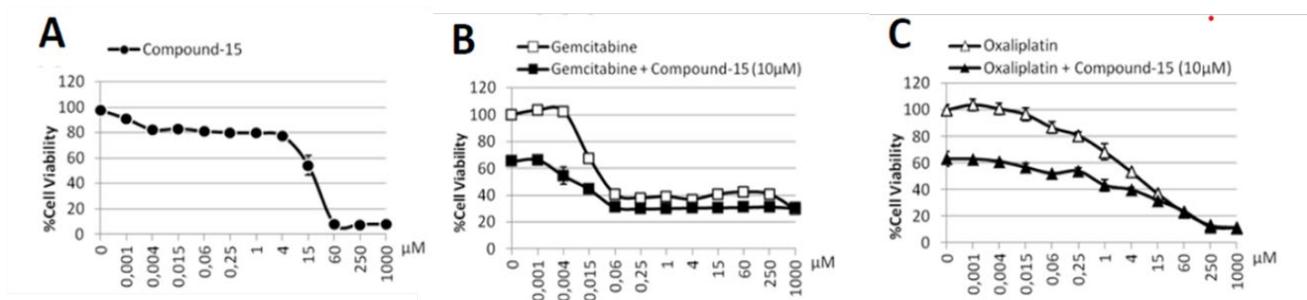
Estas diferencias observadas, sugieren que, aunque el compuesto C15 muestra un efecto citotóxico de las células independiente de NUPR1 (alrededor del 35%), también es observado un significativo efecto dependiente de NUPR1 (alrededor del 37%).

Nuestra conclusión tras estos resultados fué que en el compuesto C15 la inhibición de la viabilidad en células tumorales es llevada a cabo, al menos en parte, por una vía dependiente de la proteína NUPR1, mientras que el compuesto C13 muestra un gran efecto citotóxico, pero por una vía independiente de la expresión de la proteína NUPR1.

## RESULTADOS

Lo mismo ocurrió para el compuesto C1, que, aunque mostró gran capacidad citotóxica para las células tumorales, no se observaron diferencias significativas entre las células con o sin expresión de NUPR1 (p-valor:  $* \leq 0.1$ ), lo que sugiere que su mecanismo de acción es independiente de la expresión de la proteína, por lo que fue descartado en este punto. Dado que nuestro objetivo inicial era encontrar compuestos que se unieran a la proteína NUPR1 para evitar las múltiples funciones tumorales de esta en la célula, parece que, en este punto del trabajo, es el compuesto C15 el que más expectativas cumple.

Como acabamos de ver, todos los experimentos anteriores apuntaban al compuesto C15 como el compuesto más prometedor de los 15 (C1-C15) seleccionados inicialmente por el cribado HTS, por lo que se quiso profundizar más en el comportamiento de este compuesto, más concretamente en su comportamiento en combinación con fármacos antitumorales comerciales. Para ello se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad sobre células MiaPaca2 del compuesto C15 combinado con fármacos de quimioterapia estándar, para ver si este compuesto podía aumentar la sensibilidad de las células a estos últimos. Fueron llevados a cabo con el kit *CellTiter* tal y como se ha descrito en materiales y métodos. El tratamiento de las células, mantenido durante 3 días consistió en concentraciones crecientes del compuesto C15 solo, a concentraciones de 1nM a 1mM; los quimioterápicos Gemcitabina u Oxaliplatino, a concentraciones desde 1 nM hasta 1 mM; o la mezcla de los anteriores con el compuesto C15 a una concentración de 10  $\mu$ M. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura (Figura R3.2.1.6).



**Figura R3.2.1.6:** Estudio de viabilidad de las células tumorales MiaPaca2 tratadas durante 3 días con A) cantidades crecientes del compuesto C-15 (de 1nM a 1mM), B) cantidades crecientes de Gemcitabina (de 1nM a 1 mM) añadiendo o no el compuesto, C) cantidades crecientes de Oxaliplatino (de 1nM a 1 mM) añadiendo o no el compuesto.

## RESULTADOS

C15 a una concentración de 10 $\mu$ M; C) cantidades crecientes de Oxaliplatino (de 1nM a 1mM) añadiendo o no el compuesto C15 a una concentración de 10  $\mu$ M. En todos los casos, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 10000 células/pocillo y el % de viabilidad celular calculado mediante el kit *CellTiter* tal y como está descrito en materiales y métodos. En las gráficas se muestra el % de viabilidad celular en función de la concentración del tratamiento en cada caso. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Para analizar las concentraciones de los distintos tratamientos que conseguían una disminución de la viabilidad celular del 50% se ajustaron gráficamente las curvas obtenidas (Figura R3.2.1.6) y se obtuvieron los valores de los IC50 o concentración inhibitoria semimáxima. Los resultados son los que se muestran en la siguiente tabla (Tabla R3.2.1.7)

	<b>C15</b>	<b>Gemcitabina</b>	<b>Gemcitabina + C15</b>	<b>Oxaliplatino</b>	<b>Oxaliplatino + C15</b>
<b>IC50</b>	15 $\mu$ M	0.04 $\mu$ M	0.004 $\mu$ M	4 $\mu$ M	0.25 $\mu$ M

**Tabla R3.2.1.7:** Concentración inhibitoria semimáxima (IC50) del compuesto C15, la Gemcitabina, la combinación Gemcitabina más compuesto C15, el Oxaliplatino, y la combinación Oxaliplatino más compuesto C15, obtenidos en los experimentos de viabilidad celular de las células MiaPaca2 sometidas durante 3 días a dichos tratamientos.

Como quedó reflejado en los experimentos anteriores (Figura R3.2.1.6 y Tabla R3.2.1.7), las células tumorales MiaPaca2 veían aumentada su sensibilidad al añadir 10 $\mu$ M del compuesto C15 a los tratamientos quimioterápicos actualmente utilizados para el tratamiento del adenocarcinoma ductal de páncreas, la Gemcitabina y el Oxaliplatino.

Tanto para el caso de la Gemcitabina como para el Oxaliplatino, se observó un aumento de la sensibilidad de las células tumorales MiaPaca2 al añadir al tratamiento el compuesto C15 a 10 $\mu$ M respecto a los quimioterápicos solos. Si nos fijamos por ejemplo en la concentración de Gemcitabina necesaria para reducir las células tumorales a la mitad, vemos que es de 40 nM (IC50= 40). El mismo resultado se obtiene con la combinación de 4nM de Gemcitabina con 10  $\mu$ M del compuesto C15, lo que corrobora el aumento de la sensibilidad de las células, haciéndolas diez veces más sensibles con este último. En el

## RESULTADOS

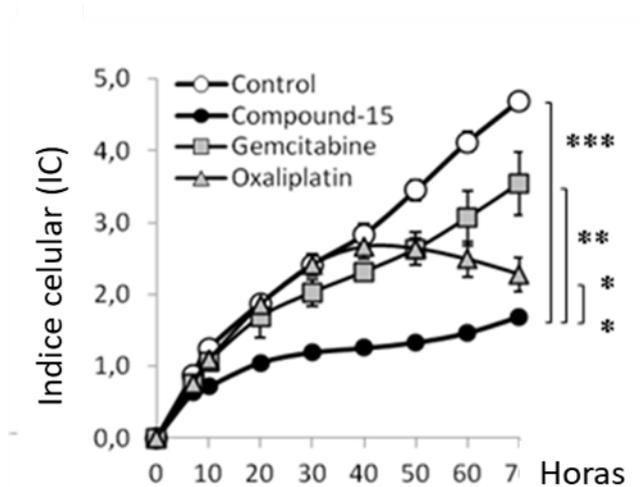
caso del Oxaliplatino, 4 $\mu$ M de Oxaliplatino conseguían reducir al 50% la viabilidad celular, mientras que este valor se reducía a 0.25  $\mu$ M con la adición de 10 $\mu$ M del compuesto C15, por lo que también conseguía aumentar significativamente la sensibilidad de este fármaco.

### 3.2.2 ESTUDIOS CELULARES A TIEMPO REAL: *iCELLigence* assays

Dados los prometedores resultados del compuesto C15 en los que se observaron valores de IC50 comparables con los obtenidos para dos de los antineoplásicos más utilizados para el tratamiento del adenocarcinoma ductal de páncreas, se decidieron llevar a cabo más experimentos para estudiar la velocidad con la que este actúa sobre la viabilidad de las células tumorales. Para ello se llevaron a cabo estudios citotoxicidad celular a tiempo real, utilizando el sistema *iCELLigence* que permite monitorizar la viabilidad celular durante todo el experimento. Este sistema utiliza placas con 16 pocillos con una matriz de biosensores de microelectrodos de oro que miden la impedancia cuando las células se adhieren a los microelectrodos provocando una corriente alterna. Las células adheridas actúan como aislante en la superficie del electrodo y cambian el medio iónico del mismo aumentando la impedancia. Por lo tanto, cuanto mayor es la adhesión de células, más aumenta la impedancia. Los resultados del sistema *iCELLigence* se expresan en función del índice celular (IC), que es una función del número de células y la proporción de células en diferentes intervalos de tiempo, siendo  $CI=0$  cuando no hay células o cuando estas no se adhieren a la superficie del pocillo, y aumentando conforme aumenta el número de células adheridas (Şener et al., 2017). Al medir el campo eléctrico generado en este proceso, el sistema puede utilizarse en experimentos de proliferación, viabilidad, morfología y migración celular.

Durante la incubación de las células MiaPaca2 con los distintos tratamientos, que fueron de 10 $\mu$ M de compuesto C15, 60 nM de Gemcitabina, o 4 $\mu$ M de Oxaliplatino, durante 3 días, el valor de la impedancia de cada pocillo fue monitorizado durante todo ese periodo. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura (Figura R3.2.2.1)

## RESULTADOS



**Figura R3.2.2.1:** Estudios de viabilidad a tiempo real de las células MiaPaca2 tratadas con 10 $\mu$ M de compuesto C15, 60 nM de Gemcitabina, 4 $\mu$ M de Oxaliplatino, o sin tratamiento (control). En todos los casos las células fueron sembradas a 40000 células/pocillo e incubadas durante 3 días, en los cuales la impedancia de cada pocillo fue monitorizada en función del tiempo con el sistema *iCELLigence* según las instrucciones del fabricante. La gráfica de la figura muestra el índice celular en función del tiempo (p-valor \* $\leq$ 0.1, \*\* $\leq$ 0.05 y \*\*\* $\leq$ 0.001). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Los resultados obtenidos (Figura R3.2.2.1) muestran como en el caso de las células tumorales no tratadas (control) el número de células, representadas por el índice celular, aumenta linealmente con el tiempo de incubación, sin observarse ninguna disminución del crecimiento de las mismas. En los casos de las células tumorales tratadas con los compuestos neoplásicos habituales sí que se observa una disminución en el número de células a las 72h de incubación respecto al control. Este efecto es mucho más marcado en el caso del Oxaliplatino, en el que se observa un crecimiento lineal de las células al principio del tratamiento, hasta las 35h tras el tratamiento, momento en el cual se observa un acusado descenso en el número de células del cultivo. En el caso de las células tumorales tratadas con el compuesto C15, se observa claramente como el compuesto C15 induce una fuerte detención del crecimiento celular inmediatamente después de su adicción respecto al control, ya detectable a las 8h del inicio del tratamiento (p-valor  $\leq$ 0.01), y mucho más fuerte que el observado en el caso del Oxaliplatino o la Gemcitabina (p-valor  $\leq$ 0.05).

## RESULTADOS

Nuestros resultados sugieren que el efecto del compuesto C15 es más rápido comparado con el de las drogas estándar Gemcitabina y Oxaliplatino, incluso aunque el número de células finales sea comparable en el segundo caso.

### 3.2.3 ESTUDIOS DE CICATRIZACIÓN HERIDAS (Wound Healing Assay)

Tras la comprobación en experimentos previos de la existencia de interacción entre la proteína NUPR1 y algunos de los compuestos en células tumorales y de que, en algunos casos, esta interacción era capaz de bloquear la unión de la proteína a su ligando biológico MSL1, se abordó la siguiente cuestión planteada en este trabajo. Esta cuestión fue estudiar si ese bloqueo de la interacción natural de NUPR1, era capaz de atenuar las propiedades protumorales de la misma, es decir, de provocar alguna variación en la actividad biológica natural que la proteína mostraba unida a sus ligandos biológicos en las células MiaPaca-2. Con este objetivo se llevaron a cabo los primeros experimentos de citotoxicidad en líneas celulares como se ha descrito anteriormente, comprobando la capacidad citotóxica de varios de los compuestos sobre las células MiaPaca-2. Después se continuó con una serie de experimentos para evaluar el comportamiento de las mismas tras el tratamiento con los compuestos.

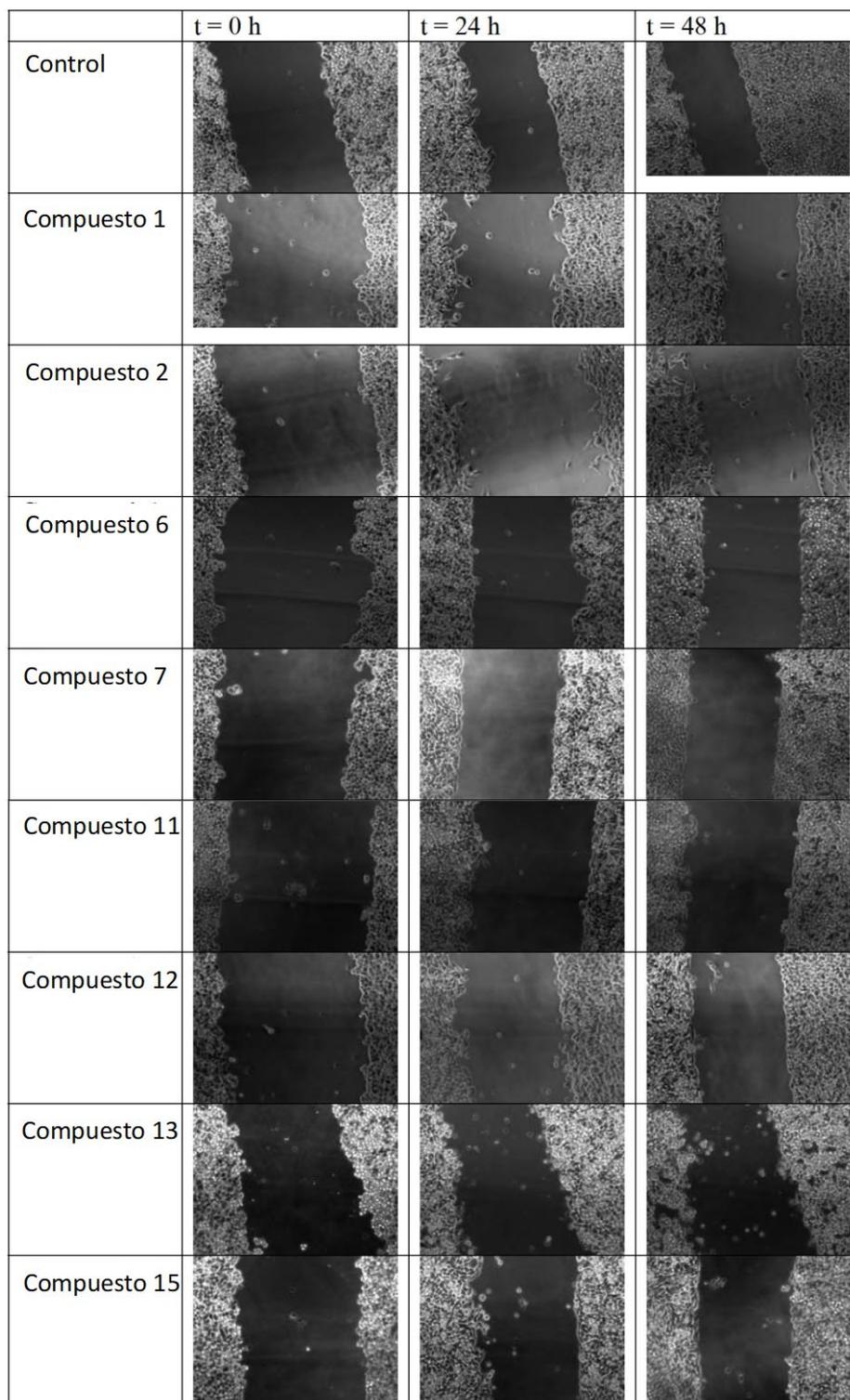
Una característica de las células tumorales en general y de las células MiaPaca en particular, es su gran capacidad de migración, mucho mayor que las células sanas, lo que las hace especialmente “hábil” para propagarse e invadir tejidos diferentes al tejido original dando lugar a las metástasis. Esta pérdida del contacto célula-célula para alejarse de su lugar de origen, es considerado un proceso clave para la diseminación del tumor, propiedad que, en el caso del adenocarcinoma ductal de páncreas, parece estar atribuida, al menos en parte, a la proteína NUPR1 (Sandi et al., 2011b). Por este motivo, resultó interesante estudiar si los compuestos que se unen a NUPR1 impidiendo la unión a sus ligandos biológicos, afectan también a esta capacidad de migración de las células MiaPaca2.

Para ello, se llevaron a cabo experimentos de cicatrización de “heridas inducidas” en los que, con las células MiaPaca2 crecidas en pocillos al 80-90% de confluencia, se realizó

## RESULTADOS

una “herida” que provocó un punto de discontinuidad en la placa con una punta de pipeta estéril. En este punto las células tumorales fueron tratadas con 10 $\mu$ M de aquellos compuestos en los que previamente se había observado actividad citotóxica, los compuestos C1, C2, C6, C7, C11, C12, C13 y C15. La capacidad de las células tratadas de migrar a través de la brecha en función del tiempo se monitorizó mediante la captación de las imágenes de las brechas a distintos tiempos (t = 0, 24 y 48h) a través de una cámara digital acoplada al microscopio de fluorescencia invertido Leica DM. Y a través del software de imágenes del propio microscopio MetaMorph MM AF se midió la distancia entre los extremos de las heridas a los distintos tiempos, que permitirá calcular la eficiencia del cierre de las heridas inducidas, que a su vez es proporcional a la capacidad de migración de las células de dichos cultivos. Los resultados se expresan como el porcentaje de herida que se ha cerrado a las 24h y 48h respecto al tiempo 0. Las imágenes obtenidas son las que se muestran a continuación (Figura R3.2.3.1).

## RESULTADOS



**Figura R3.2.3.1:** Ensayo de cicatrización de heridas (*Wound Healing Assay*) en células MiaPaca-2 tratadas con 10  $\mu$ M de los compuestos C1, C2, C6, C7, C11, C12, C13 y C15, y sin tratar en el caso del control que fue tratado únicamente con DMSO. Las células se mantuvieron a 37°C durante 2 días y las imágenes del avance de las células hacia el centro de

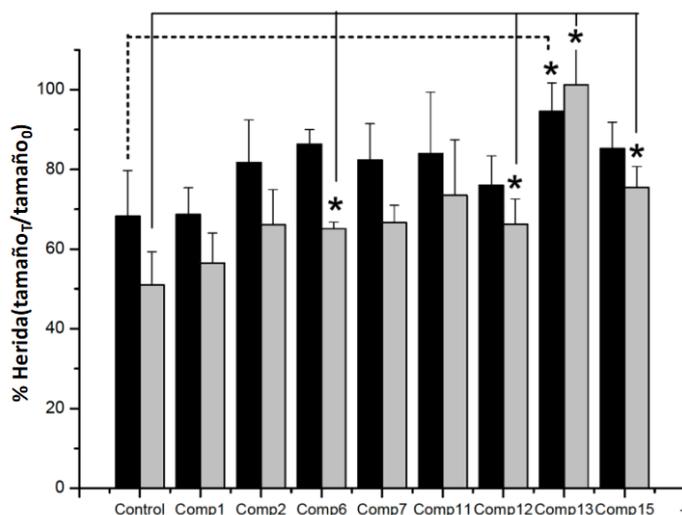
## RESULTADOS

la “herida inducida”, al inicio del tratamiento (tiempo 0) y a las 24 y 48h, fueron obtenidas mediante una cámara digital acoplada al microscopio de fluorescencia Leica DM.

Los resultados anteriores muestran (Figura R3.2.3.1), cómo en el caso del control, es decir las células de adenocarcinoma ductal de páncreas MiaPaca-2 sin tratar con ninguno de los compuestos, se observó claramente una disminución de la separación entre ambos extremos de las células a lo largo del tiempo, ya que, al ser células tumorales sin tratar, mantenían intacta su capacidad de migración. En el caso de las células tratadas con los compuestos se observó en todos los casos como la “herida inducida” se cierra en menor medida o más despacio que en el caso de las células sin tratar, lo que sugiere que estos compuestos logran frenar en mayor o menor medida la capacidad de propagación de las células tumorales. Cabría destacar los compuestos C13 y C15 donde se observó que la “herida” permanecía prácticamente como al inicio del experimento incluso a las 48h de tratamiento, por lo que estos dos compuestos parecen modular en mayor medida esta característica de las células tumorales de extensión a los tejidos vecinos y generación de metástasis.

Las imágenes anteriores (Figura R3.2.3.1) fueron tratadas mediante el software de análisis del microscopio MetaMorph MM AF y el software ImageJ para estudiar la amplitud de las “brechas” a distintos tiempos que se observaban en las células tumorales tratadas con los compuestos. Inicialmente, se calculó la distancia media entre ambos lados de la brecha, que es inversamente proporcional a la capacidad de migración de las células, y posteriormente se aplicó el test estadístico t-Student asumiendo una significancia estadística de  $p < 0.05$ . La idea era comparar esta capacidad de migración entre las células tratadas con los compuestos con la capacidad de migración de las células en su estado natural (controles), o, dicho de otra manera, comprobar si había alguna diferencia significativa en la capacidad de invadir otros tejidos y producir metástasis entre las células tratadas y las células control. Los resultados obtenidos fueron los mostrados en la siguiente gráfica (Figura R3.2.3.2).

## RESULTADOS



**Figura R3.2.3.2:** Ensayo de cicatrización de heridas (*Wound Healing Assay*) en células MiaPaca-2 tratadas con los compuestos C1, C2, C6, C7, C11, C12, C13 y C15 a una concentración de 10  $\mu$ M, excepto en el caso del control, que fue únicamente tratado con DMSO. Se utilizó el software de análisis MetaMorph MM AF y el software ImageJ para estudiar la migración de las células tratadas con cada uno de los compuestos, y esta fue expresada como el % de la anchura de la brecha respecto al tamaño original (distancia media entre las monocapas) tanto a las 24h (barras negras) como a las 48h (barras grises) de tratamiento. Las barras indican la media entre la anchura de la brecha en cada tiempo y el tamaño inicial. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos llevados a cabo por triplicado. Las barras más largas indican una reducción menor del tamaño de la “herida inducida”, o lo que es lo mismo, una migración celular disminuida. Se utilizó el test estadístico t-Student de dos colas, paired t-test con el control al mismo tiempo, ya sea 24 o 48h, asumiendo una significación estadística de  $p < 0.05$ .

Como ya se observaba en las imágenes de la figura anterior (Figura R3.2.3.1) y se corrobora tras el tratamiento de las imágenes (Figura R3.2.3.2), quedó demostrada una diferencia estadísticamente significativa entre el tamaño de la “herida inducida” en el caso de las células en su estado natural sin tratar (control), y el tamaño de la brecha de las células tratadas con los compuestos C6, C12, C13 y C15 a las 48h de tratamiento. En los demás casos estas diferencias no llegaron a ser significativas. De nuevo, los resultados más relevantes fueron para los compuestos C13 y C15, donde el tratamiento afectó de una forma muy marcada disminuyendo la migración espacial de estas células tumorales MiaPaca2. En el compuesto C13 el tratamiento inhibió la migración casi por completo a la vez que inducía cambios en la morfología celular. Sin embargo, en el caso de células

## RESULTADOS

tratadas con el compuesto C15, estas migraban únicamente un 25% de la distancia entre las monocapas (tamaño brecha) significativamente menor que la migración de las células libres de tratamiento a las 48h, que migraban un 50%. Además, el efecto es más rápido en el compuesto C13, ya que a las 24h ya se ven diferencias estadísticamente significativas respecto al control, mientras que en el compuesto C15 tienen que pasar 48h para observarse estas diferencias. Si nos fijamos en el C1, que era uno de los compuestos que mostraban una actividad citotóxica sobre las células MiaPaca2 más acusada, vemos que su efecto en la migración celular de las células tumorales es prácticamente nulo, comportándose de una forma muy similar a las células tumorales sin tratar.

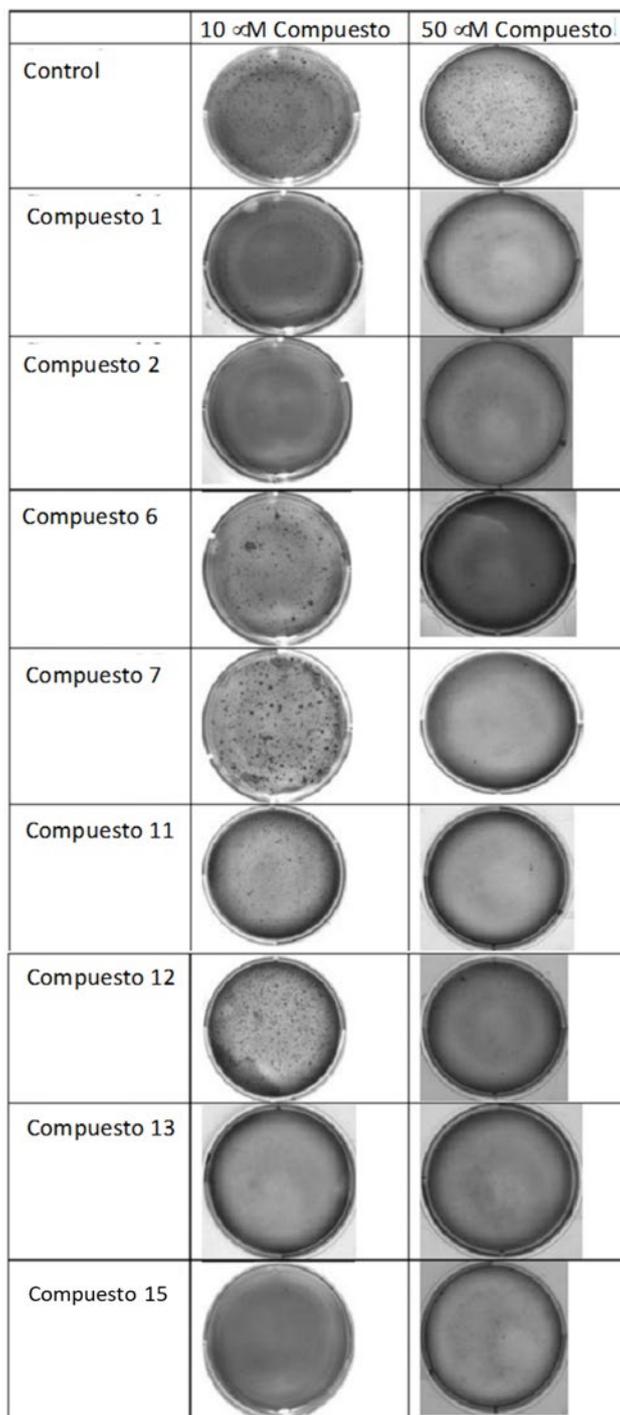
### 3.2.4 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE COLONIAS EN SOFT AGAR

Otra característica importante de las células tumorales, que no se observa en células sanas y que está relacionada con su capacidad tumorigénica y su potencial para metastatizar propagándose a otros órganos y tejidos distintos al tumor primario, es su capacidad para crecer independientemente y formar colonias a partir de una célula aislada sin anclarse a ningún sustrato, es decir, a ninguna superficie sólida (Borowicz et al., 2014). Así, resulta interesante estudiar si dicha característica, necesaria para el proceso de carcinogénesis de las células tumorales, se ve afectada en las células tumorales pancreáticas por acción de nuestros compuestos. Para ello, se llevaron a cabo estudios de sobrevivencia clonogénica o ensayos de formación de colonias, capaces de evaluar la capacidad de supervivencia in vitro de una única célula para crecer y formar una colonia en un ambiente de crecimiento independiente de anclaje, agar en este caso.

Para llevar a cabo estos estudios de formación de colonias en agar, las células MiaPaca2 fueron tratadas con los compuestos en los que se había observado actividad citotóxica en experimentos previos, los compuestos C1, C2, C6, C7, C11, C12, C13 y C15 a concentraciones de 10 y 50 $\mu$ M, o, DMSO en el caso del control. Tras la incubación durante 48h, las células fueron resuspendidas a una densidad de 7000 células/ pocillo en placas de 6 pocillos conteniendo una capa de agar al 0,3% superior colocada sobre otra capa de agar al 0.6% inferior. Tras mantenerlas en cultivo durante 21 días, las colonias fueron teñidas con cristal violeta, visualizadas con el microscopio Leica DMI 6000B, y analizadas posteriormente con el software MMAF (MetaMorph) para contar el número

## RESULTADOS

de colonias formadas compuestas por más de 20 células. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (Figura R3.2.4.1).



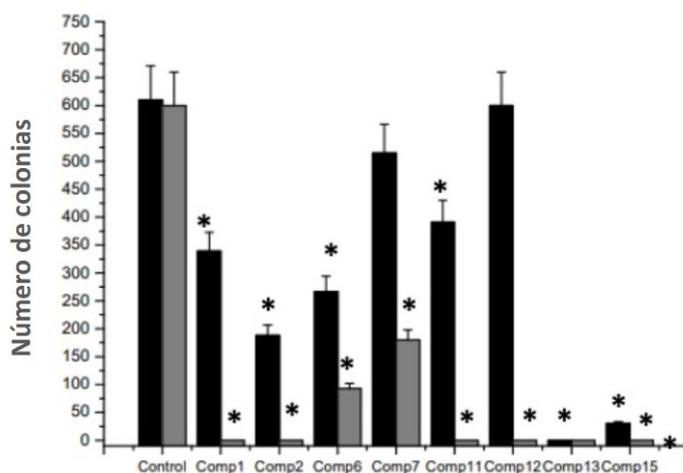
**Figura R3.2.4.1:** Evaluación de la clonogenicidad o capacidad de una célula aislada para formar colonias sin unirse a un sustrato de las células MiaPaca2 en presencia de los compuestos C1, C2, C7, C11, C12, C13 y C15. Las células, tratadas con los mismos a una concentración de 10 y 50  $\mu$ M durante 24h, fueron

## RESULTADOS

sembradas en una capa de agar al 0.3%, colocada sobre una capa de agar inferior al 0.6%. Las células fueron incubadas durante 48h tras lo que se procedió a la captura de las imágenes de las colonias formadas con el sistema de microscopia Leica DMI 6000B y el trasiluminador Safe Imager.

Los resultados obtenidos (Figura R3.2.4.1) muestran como las células de adenocarcinoma ductal de páncreas en su forma nativa, es decir, sin estar expuestas a ningún tratamiento como ocurre con nuestro control, mantienen intacta esta característica de la clonogenicidad de las células tumorales y son capaces de crecer, dividirse y formar colonias a partir de una célula independiente sin anclarse a ninguna superficie sólida, tal y como se aprecia en gran número de colonias formadas en el control. Sin embargo, esta capacidad de las células tumorales se vio disminuida con el tratamiento de la mayoría de los compuestos. En la mayoría de los casos (excepto en los compuestos C7 y C12), a una concentración de compuesto de 10  $\mu$ M, esta capacidad se ve claramente disminuida y el número de colonias formadas es claramente inferiores a las formadas en las células control. A 50 $\mu$ M únicamente se observan formación de colonias en las células tratadas con los compuestos C6 Y C7, aunque el número de estas es menor que el caso del control.

Tras el análisis de las imágenes y el contaje del número de las colonias de más de 20 células formadas en cada caso, con el software de análisis del microscopio MetaMorph MM AF se obtuvieron los siguientes resultados (Figura R3.2.4.2).



**Figura R3.2.4.1:** Evaluación de la clonogenicidad o capacidad para formar colonias sin unirse a una superficie sólida de las células MiaPaca2 en presencia de los compuestos C1, C2, C7, C11, C12, C13 y C15. Las células tratadas con los mismos a

## RESULTADOS

una concentración de 10  $\mu\text{M}$  (barras negras) y 50  $\mu\text{M}$  (barras grises) fueron sembradas en una capa de agar al 0.3%, colocada sobre una capa de agar inferior al 0.6%. Las células fueron incubadas durante 48h tras lo que las colonias formadas fueron captadas y analizadas con el software de análisis MetaMorph MM AF para contar el número de colonias formadas en cada caso. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos llevados a cabo por triplicado. Se aplicó el test estadístico t-student con una  $p < 0.05$ .

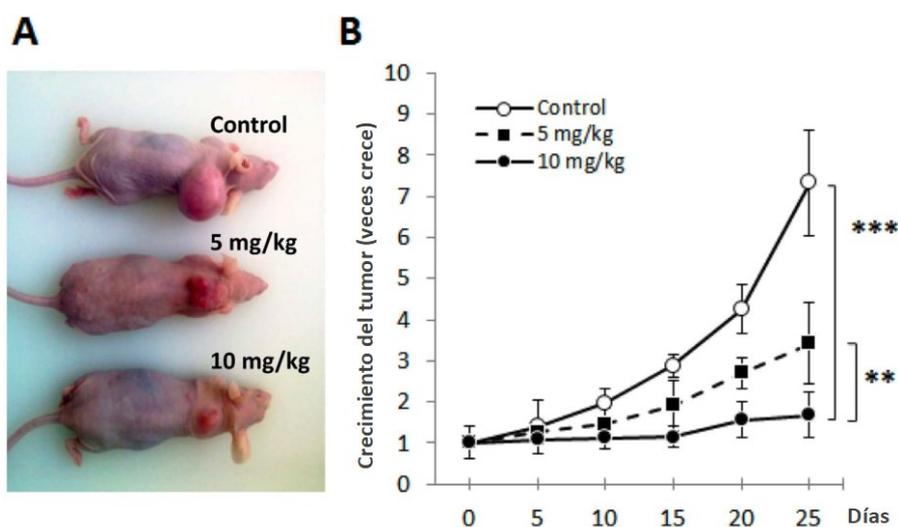
Como se ve claramente en la figura anterior (Figura R3.2.4.2), en la mayoría de los compuestos, excepto los compuestos C-7 y C-12, ya se aprecia una disminución estadísticamente significativa en el número de colonias formadas tras el tratamiento de las células con los compuestos a una concentración de 10 $\mu\text{M}$ . Cuando se aumenta la concentración de los compuestos a 50 $\mu\text{M}$ , estas diferencias son observadas en todos los casos. Si nos fijamos los compuestos más firmemente candidatos a quimioterápicos contra el adenoma ductal de páncreas, como son el compuesto C13 y el compuesto C15, se observa claramente como el número de colonias en las células tratadas con los mismos respecto a las células sin tratar ha disminuido hasta prácticamente cero, incluso a una concentración de los mismos de 10 $\mu\text{M}$ .

#### **4. EXPERIMENTOS “IN VIVO” EN ANIMALES MODELO**

En vista de todos los resultados experimentales previos de este trabajo y en un paso más para intentar demostrar la eficacia de los compuestos en el tratamiento de adenocarcinoma ductal de páncreas, se llevaron a cabo experimentos en un modelo más complejo como puede ser el modelo de ratón. Para estos experimentos se eligió al compuesto más prometedor, al compuesto C15 como el candidato ideal, ya que este compuesto había demostrado su interacción con la proteína NUPR1 tanto a nivel intracelular como extracelular, a la vez que era capaz de bloquear la interacción de esta con su ligando biológica MSL1 interfiriendo sobre algunas de las propiedades protumorales de la proteína. Todo ello sugería que se trata de un candidato interesante para los estudios en animales, y para probar si los resultados obtenidos en líneas células tumorales se reproducían en un organismo animal, donde existen multitud de variables que no existen en los estudios a nivel celular.

## RESULTADOS

Para llevar a cabo estos experimentos, se utilizaron ratones inmunodeficientes NMRI-NUDE a los que se les instauró un tumor a partir de la inoculación subcutánea de células tumorales pancreáticas humanas MiaPaca2 (xenoinjertos humanos derivados de PDAC implantados en ratones inmunodeficientes). Una vez que el tumor alcanzó un tamaño de 400 mm<sup>3</sup>, los ratones se dividieron en 3 grupos para ser tratados diariamente con el compuesto C15 a concentraciones de 5 y 10 mg/Kg en dos de los grupos, o un volumen equivalente de suero fisiológico en el caso del control. Los tratamientos fueron mantenidos un total de 4 semanas, tras lo cual los ratones fueron sacrificados. Para monitorizar el crecimiento de los tumores a lo largo del tiempo, el peso y el volumen de los mismos fueron medidos cada 5 días obteniéndose los resultados mostrados a continuación (Figura R4.1).



**Figura R4.1:** Experimentos “in vivo” en ratones inmunodeficientes en los que se implanta un tumor de páncreas humano mediante la inoculación de células de adenocarcinoma ductal de páncreas MiaPaca2. Los ratones son divididos en tres grupos, dos de los cuales son tratados diariamente con dos dosis distintas del compuesto C15, de 5 y 10 mg/Kg, mientras que el tercer grupo el tratado con una cantidad equivalente de suero fisiológico. El tratamiento se mantiene durante 4 semanas A) Imágenes representativas de los tumores de xenoinjertos humanos en los ratones tratados con las distintas concentraciones del compuesto C15 o sin tratar (control) a las 2 semanas del inicio del experimento B) Crecimiento del tumor para cada grupo de ratones tratados durante 4 semanas con diferentes concentraciones del compuesto C15 (5 mg/Kg y 10 mg/Kg), o sin tratar en el caso del control

## RESULTADOS

En los resultados mostrados en las imágenes anteriores (Figura R4.1.A) se observó como los tumores aumentaron de tamaño de manera exponencial tras dos semanas ( $1530 \pm 184 \text{ mm}^3$ ) a partir de la inducción del tumor en los ratones control. Sin embargo, al tratar a los ratones con el compuesto C15, este crecimiento disminuye. Se observa como con la administración de la dosis más baja de compuesto C15, 5 mg/kg, el volumen tumoral aumenta solo un 50% comparado con el control durante el mismo periodo de tiempo ( $767 \pm 196 \text{ mm}^3$ ; p-valor  $\leq 0.01$ ), siendo esta diferencia más acusada todavía en el caso del tratamiento de los ratones con la concentración más alta del compuesto, 10 mg/Kg. En este último caso se observa como el crecimiento del tumor fue rápidamente y casi completamente interrumpida ( $558 \pm 192 \text{ mm}^3$ ; p-valor  $\leq 0.01$ ), incluso al final del tratamiento.

Lo mismo se observa en la gráfica anterior (Figura R4.1.B), donde se vio como el crecimiento del tumor aumenta exponencialmente en el tiempo en el caso del ratón sin tratar (control). Sin embargo, este crecimiento se reduce significativamente en el caso de los ratones tratados con el compuesto C15 incluso a una dosis de 5 mg/Kg. Se observa que, con una mayor dosis de compuesto, de 10 mg/Kg, el crecimiento del tumor prácticamente se detiene. Además, se vio como esta disminución del crecimiento del tumor se produce de una manera temprana, siendo ya perceptible a los 5 días desde el inicio del tratamiento. Se aplicó el test estadístico de análisis de la varianza para las repeticiones de las medidas para demostrar estadísticamente estas diferencias en el crecimiento del tumor. Así quedó demostrado que existe diferencia estadísticamente significativa en cuanto al crecimiento del tumor entre los ratones tratados con C15 a cualquiera de sus concentraciones y los ratones tratados con placebo (p-valor  $*** \leq 0.01$ ). Así mismo se demostró una diferencia estadísticamente significativa (p-valor  $* \leq 0.1$ ) entre ambas dosis de compuesto C15, siendo más eficaz la dosis de 10 mg/Kg.

Estos resultados sugieren de una manera contundente, que uno de nuestros compuestos, concretamente el compuesto C15, es capaz de detener el crecimiento de un tumor desarrollado en ratones a partir de células tumorales pancreáticas humanas.

# **DISCUSIÓN**

### **1. CRIBADO DE ALTO RENDIMIENTO (HTS) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES LIGANDOS DE LA PROTEÍNA NUPR1**

El estudio del perfil de desnaturalización térmica de una proteína o un complejo proteína-ligando, nos puede ayudar a estudiar los cambios de conformación tras la interacción, tal y como ha sido demostrado en estudios previos (Senisterra et al., 2012) (Cejel et al., 2003) Aplicado al diseño de nuestros experimentos, los cambios en la fluorescencia extrínseca detectados al aplicar un gradiente de temperatura para producir la desnaturalización de la proteína NUPR1, permitió monitorizar los cambios conformacionales en la misma. Y, teniendo en cuenta que la desnaturalización sólo ocurrirá si previamente se ha plegado la proteína, y que la proteína NUPR1 nativa es una proteína intrínsecamente desestructurada, podemos deducir con estos experimentos si ha tenido lugar la interacción entre la proteína y los distintos ligandos en un paso previo a la desnaturalización. Utilizamos esto como un método de cribado en la búsqueda de potenciales compuestos que interaccionen con nuestra proteína diana.

En la puesta a punto del método de cribado, se comparó la fluorescencia emitida al llevar a cabo una desnaturalización térmica de la sonda (ANS o *SyproOrange*) libre o unida a la proteína NUPR1, lo que permitió la elección de la sonda ANS debido a su mayor señal de fluorescencia (Figura R1.1). La diferencia en el perfil de fluorescencia observada entre la proteína NUPR1 y la proteína unida a ANS, indica que, de alguna manera y previo a la desnaturalización, el ANS se ha unido a las partes hidrofóbicas de nuestra proteína diana produciendo un cambio de conformación en la misma, lo que concuerda con numerosos estudios como el publicado por Semisotnov GV et al. (Semisotnov et al., 1991) Dichos estudios concluyen afirmando que el ANS es una sonda que se une de forma no covalente mediante fuerzas de Van der Waals a las regiones hidrofóbicas de la proteína y que, en general, se comporta aumentando su intensidad de fluorescencia al unirse a las mismas. El ANS en medios polares presenta un rendimiento cuántico muy bajo y por tanto poca emisión de fluorescencia. En cambio, en medios hidrofóbicos, como por ejemplo sucede cuando se desnaturaliza la proteína y los grupos hidrofóbicos van emergiendo y quedando expuestos al solvente, el fluoróforo ANS se unirá a estos grupos produciéndose un aumento del rendimiento cuántico y con él, un aumento de la emisión de fluorescencia a 500 nm previa excitación a 390 nm. Aunque en el caso de proteínas intrínsecamente

## DISCUSIÓN

desestructuradas, como en es nuestro caso, la situación es un poco diferente como veremos a continuación.

En este punto queda demostrado que la sonda ANS se une a la proteína diana NUPR1, resultando una buena elección para monitorizar los cambios en la fluorescencia de los siguientes experimentos.

El comportamiento de los controles negativos, consistentes en una mezcla formada por la proteína NUPR1, la sonda ANS y DMSO en el tampón de trabajo, es de vital importancia ya que todo el cribado de la quimioteca va a consistir en una comparación entre los perfiles de fluorescencia entre dichos controles y los perfiles de desnaturalización de los posibles complejos formados entre la proteína NUPR1 y los compuestos de la quimioteca. El perfil de desnaturalización térmica de estos controles negativos se puede observar en la Figura R1.2. Al tratarse del estudio del perfil de desnaturalización de una proteína intrínsecamente desestructurada, es decir, sin estructura secundaria estable y definida, es de esperar que la fluorescencia evolucione como en la figura citada anteriormente. Esto es debido a que la proteína ya se encuentra prácticamente desnaturalizada en su conformación nativa y no se va a producir ningún cambio en la conformación de la misma al aumentar la temperatura, por lo que la polaridad del medio no cambia y el ANS no se une a más grupos hidrofóbicos de los que se unía en un principio, no aumentando por tanto la fluorescencia emitida. Todo esto hace que no observemos ningún cambio en la señal de fluorescencia o, mejor dicho, que observemos el cambio mínimo esperado debido al agotamiento propio de los compuestos fluorescentes.

Como hemos dicho anteriormente, la base del cribado de nuestra quimioteca reside en la capacidad de seguir los cambios conformacionales de la proteína NUPR1 al producirse la desnaturalización térmica de la misma mediante cambios en la fluorescencia extrínseca. Esta desnaturalización sólo va a ocurrir si previamente se ha plegado la proteína o ha habido un cambio de conformación de cualquier tipo tras la unión del compuesto. Toda esta hipótesis de trabajo, se llevó a cabo en base a los trabajos previos de Encinar et al (Encinar, Mallo, Mizyrycki, Giono, Gonzalez-Ros, et al., 2001) y Aguado et al (Aguado-Llera et al., 2013b) en los que se pone de manifiesto mediante estudios de dicroísmo circular (CD) y resonancia magnética nuclear (RMN) que la proteína NUPR1 se presenta mayormente desplegada, pero en los que se muestran evidencias también de una lábil estructura local que podría ser estabilizada por la interacción con sus ligandos biológicos

## DISCUSIÓN

(J. L. Neira et al., 2016) Estas interacciones proteína-ligando pueden promover pequeñas reestructuraciones y plegamientos en la misma, que serán detectables al comparar el perfil de fluorescencia del complejo formado respecto a la proteína sola. Por lo tanto, si nuestra proteína diana NUPR1 interacciona con alguno de los compuestos de la quimioteca formando un complejo estable, se producirá, tras la desnaturalización térmica, un cambio en el perfil de fluorescencia en nuestro experimento, mientras que, si esa interacción no tuviera lugar, el perfil de fluorescencia no presentaría diferencias respecto al perfil de la proteína NUPR1 aislada (controles negativos). Una estrategia similar ha sido utilizada en trabajos previos para identificar compuestos de pequeñas moléculas actuando como inhibidores de la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C (Abian et al., 2013), inhibidores de la flavodoxina de *Helicobacter Piloni* (Cremades et al., 2009) y chaperonas farmacológicas de la fenilalanina hidroxilasa humana (Pey et al., 2008)

Aplicando esta aproximación a nuestra colección de compuestos se observó como el perfil de fluorescencia tras la desnaturalización térmica fue similar a los controles en la mayoría de los compuestos testados (Figura R1.3.b y Figura R1.4). Es decir, no se observaron cambios en la señal de fluorescencia al llevar a cabo la desnaturalización térmica, lo que sugiere que no ha habido ningún cambio en la estructura de la proteína, por lo que el ANS no ha presentado cambios en la intensidad de su fluorescencia. Esto sugiere la ausencia de interacción con NUPR1 y la formación de complejos estables con la misma en este grupo de compuestos, por lo que la proteína seguía en su estado intrínsecamente desestructurado nativo después de la adición de los compuestos. Consideramos que este grupo de compuestos no interaccionan con NUPR1 y quedaron por tanto descartados del estudio.

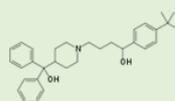
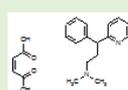
Por el contrario, en otro grupo de compuestos (Figura R1.3.b y Figura R1.4), si se apreciaban cambios importantes, tanto en la forma del perfil de fluorescencia tras la desnaturalización térmica, como en la intensidad de la fluorescencia emitida con respecto a los controles (NUPR1 libre), es decir, se observada la aparición de una señal de fluorescencia ausente en los controles. Estos cambios en el perfil de desnaturalización térmica se deben a que al aumentar la temperatura y producirse la desnaturalización de la proteína, los grupos hidrofóbicos quedan más expuestos al medio, permitiendo al ANS unirse a ellos y provocar cambios en la fluorescencia emitida. Al ser NUPR1 una proteína intrínsecamente desestructurada que está en desplegada en estado nativo, esta

## DISCUSIÓN

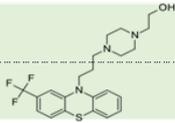
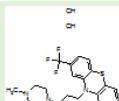
desnaturalización solo es posible si previamente la proteína ha formado un complejo con los compuestos testados. Estas diferencias en el perfil de fluorescencia son más acusadas en 15 de los compuestos (C1-C15), que quedaron seleccionados a partir de este punto del estudio (Figura R1.5).

Estos resultados sugieren que estos 15 compuestos que se muestran en la siguiente tabla (Tabla R1.6 y Tabla D1.1) tienen un efecto estabilizador sobre NUPR1, uniéndose a ella y formando un complejo estable, que podría impedir la unión de la proteína NUPR1 a sus ligandos biológicos. Incluso esta interacción podría bloquear la acción de esos complejos biológicos, como la destacada acción protumoral asociada a la proteína por la conocida participación de NUPR1 en numerosos procesos del desarrollo del tumor (Iovanna *et al.*, 2002). Por todo lo anterior, estos compuestos fueron seleccionados como potenciales ligandos de NUPR1 y ensayados en experimentos posteriores para confirmar y caracterizar esa interacción.

### - Antihistamínicos → Antagonistas receptor histamina H1

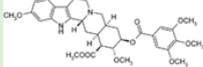
Compuesto-1	<u>Terfenadina</u> $C_{32}H_{41}NO_2$	
Compuesto-10	<u>Pheniramine maleate</u> $C_{20}H_{24}N_2O$	

### - Antipsicóticos, ansiolíticos → Antagonistas dopamina, serotonina

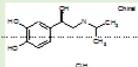
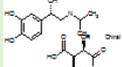
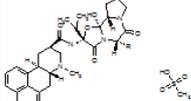
Compuesto-2	<u>Flufenazina</u> <u>Dihidrocloruro</u> $C_{22}H_{28}Cl_2F_3N_3OS$	
Compuesto-15	<u>Trifluoperazine dihydrochloride</u> $C_{21}H_{26}Cl_2F_3N_3S$	

## DISCUSIÓN

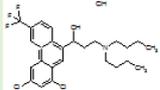
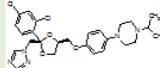
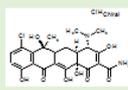
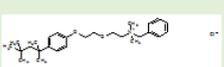
### - Antihipertensivos → Inhibición adrenérgica

Compuesto-4	<u>Reserpina</u> $C_{33}H_{49}N_2O_9$	
Compuesto-8	<u>Levonordefrin</u> $C_9H_{15}NO_3$	

### - Vasodilatadores → Agonista beta-adrenérgico

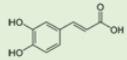
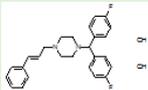
Compuesto-5	<u>(-)-Isoproterenol Hydrochloride</u>	
Compuesto-9	<u>(+)-Isoproterenol (+)-bitartrate salt</u> $C_{15}H_{23}NO_9$	
Compuesto-12	<u>Dihydroergotoxine mesylate</u> $C_{29}H_{38}N_5O_8SR$	

### - Antiinfecciosos → Antisépticos, antifúngicos, antibacterianos, tratamiento malaria

Compuesto-7	<u>Halofantrine hydrochloride</u>	
Compuesto-11	<u>Terconazole</u> $C_{26}H_{31}Cl_2N_5O_3$	
Compuesto-13	<u>Benzethonium chloride</u>	
Compuesto-14	<u>Chlortetracycline hydrochloride</u> $C_{222}H_{24}Cl_2N_2O_8$	

## DISCUSIÓN

### - Otros: antioxidante, bloqueante de calcio

Compuesto-3	Ácido cafeico	
Compuesto-6	Flunarizine dihydrochloride	

**Tabla D1.1:** Nombre, fórmula, estructura y acción terapéutica de los 15 compuestos (C1-C15) seleccionados como potenciales ligandos de la proteína NUPR1 mediante el cribado de alto rendimiento de la quimioteca Prestwick.

En la tabla anterior (Tabla D1.1) se muestran los 15 compuestos seleccionados (C1-C15) en el cribado HTS agrupados según su acción terapéutica, ya que dichos compuestos son utilizados actualmente como antihistamínicos, antihipertensivos, antipsicóticos, vasodilatadores, antiinfecciosos, antioxidantes o bloqueantes de calcio.

Por último, señalar que todos los compuestos de la quimioteca son fármacos o profármacos aprobados por algún organismo oficial, por lo que podemos afirmar que en el cribado llevado a cabo en este trabajo se han ensayado un número considerable de compuestos de alta variabilidad química y farmacológica, buena biodisponibilidad y seguros para uso humano.

## 2. CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DEL COMPLEJO FORMADO POR LA PROTEÍNA NUPR1 Y LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS

### 2.1 CALORIMETRÍA ISOTÉRMICA DE TITULACIÓN (ITC): CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE LOS COMPLEJOS NUPR1-COMPUESTO

El aumento del grado de plegamiento de la proteína NUPR1, o dicho de otra manera, el aumento de estabilidad de la misma al unirse los diferentes compuestos observada en la desnaturalización térmica llevada a cabo en el cribado HTS, es una prueba de que podría existir esa interacción, pero no es suficiente para clasificar dichos compuestos en función

## DISCUSIÓN

de su afinidad por la proteína, ya que este aumento de estabilidad podría ser debido a distintos motivos, incluso a interacciones inespecíficas entre la proteína y el compuesto. No hay que olvidar que la desnaturalización térmica es una evidencia indirecta de la unión de los compuestos a la proteína. Aunque ambos términos están muy relacionados, no existe entre ellos una correlación directa, pudiendo darse el caso tanto de interacciones inespecíficas entre ambas moléculas a pesar de observarse un resultado positivo en los experimentos de desnaturalización térmica; como de compuestos que muestran la misma afinidad, pero distinto efecto estabilizador sobre la proteína y por lo tanto distinto perfil de desnaturalización (Cimpmperman *et al.*, 2008).

Por este motivo es necesario el uso otras técnicas que nos proporcionen más información acerca de la interacción entre la proteína NUPR1 y los compuestos. Así pues, para el estudio termodinámico de la interacción, o más concretamente, de las constantes de afinidad de los distintos compuestos con la proteína, elegimos la técnica de calorimetría isotérmica de titulación (ITC), una de las técnicas más utilizadas para caracterizar las interacciones entre moléculas biológicas debido a su gran exactitud y precisión (Cooper & Johnson, 1994). Los experimentos de ITC permiten la caracterización biofísica de la interacción entre gran variedad de biomoléculas.

Un experimento de ITC es en realidad una titulación en la que, el compuesto cuya afinidad se quiere estudiar, es inyectado en la muestra que contiene la proteína en una serie de pequeñas alícuotas hasta que la reacción de interacción entre ambas biomoléculas alcanza el equilibrio. Si existe reacción de interacción entre las dos moléculas y se produce la formación de un complejo estable entre ellas, cada inyección de compuesto produce un pulso de calor, que se verá reflejado en los termogramas obtenidos. En nuestro caso, tal y como se muestra en la Figura R2.1.1, sí que se observó un intercambio de calor tras las sucesivas adiciones de las alícuotas de los compuestos C1–C15, excepto en el caso del compuesto C11, por lo que todos los compuestos excepto este último, reaccionan en mayor o menor medida con la proteína NUPR1, reafirmando los resultados del cribado inicial. Además, se observó que en todos los casos (excepto en el C11), este calor es de signo negativo, lo que indica que se trata de reacciones de carácter exotérmico. A partir de los termogramas, y una vez integrado el calor respecto al tiempo, y normalizada por la concentración el área de cada pico, se obtienen las curvas ITC (Figura R2.1.2), lo que

## DISCUSIÓN

ratifica la existencia de la interacción entre la proteína NUPR y los distintos compuestos, y la formación del complejo NUPR1-compuesto.

Otra aplicación del ITC permite obtener información acerca de la fuerza de la interacción entre la proteína y los compuestos ya que proporciona las constantes de afinidad/disociación ( $K_a$ /  $K_d$ ) entre ambas moléculas, a la vez que proporciona también otras constantes termodinámicas como la entalpía ( $\Delta H$ ), la entropía ( $\Delta S$ ) y la estequiometría ( $n$ ) del complejo resultante. Finalmente, la integración de todos estos datos termodinámicos,  $K_d$ ,  $\Delta H$ , y  $n$  del complejo resultante proporcionan un perfil termodinámico completo de la interacción molecular (Pierce et al., 1999).

En la Tabla R2.1.3 donde se muestran las variables termodinámicas obtenidas de las interacciones entre NUPR1 y los compuestos C1-C15, se observa que, aunque con pequeñas variaciones entre los distintos compuestos, todas las constantes de afinidad se encuentran en un bajo rango, del orden de micromolar, que es precisamente lo que caracteriza a las interacciones de las proteínas intrínsecamente desordenadas. Este tipo de proteínas se suele caracterizar por interacciones de baja afinidad y alta especificidad, dando lugar a uniones reversibles y a la formación de complejos difusos (Olsen *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2015). Por todos los datos anteriores, estos compuestos parecen representar un buen punto de partida para la optimización de la afinidad.

Los valores termodinámicos obtenidos en la interacción entre NUPR1 y los compuestos seleccionados C1-C15, concuerdan con los obtenidos en otros estudios, como el publicado por Encinar et al., Malicet et al, o Aguado-Llera et al. (Encinar *et al.*, 2001) (Aguado-Llera *et al.*, 2013) Según estos autores, la proteína NUPR1 y su ligando biológico MSL1, interaccionan entre sí con una constante de asociación del rango de  $3\mu\text{M}$ , y estos, interaccionan con el DNA con una afinidad también del orden de micromolar, similar a la afinidad de los compuestos seleccionados como potenciales ligandos de NUPR1 obtenida con los experimentos de ITC (Tabla R2.1.3).

A partir de los datos termodinámicos obtenidos directamente de los experimentos de ITC, se pueden calcular otros parámetros termodinámicos útiles para el estudio de la reacción de formación del complejo como la  $K_d$ , la entropía ( $\Delta S$ ) o la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) según las siguientes fórmulas:

## DISCUSIÓN

$$K_d = 1 / K_a$$

$$\Delta G = -RT \ln K_a$$

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

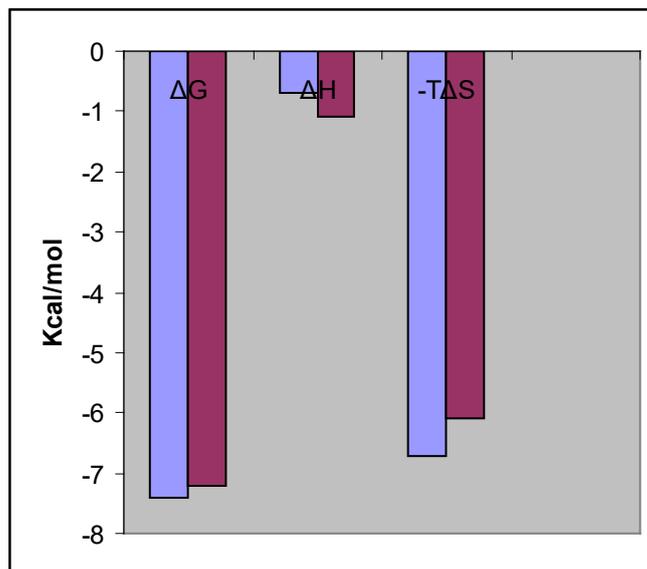
donde R es la constante de los gases en cal/mol.K (R=1.987 cal/mol.K) y T la temperatura en grados kelvin (T=298 K).

Así pues, aplicando las fórmulas anteriores a los compuestos C13 y C15, obtenemos los valores termodinámicos que se muestran a continuación:

**Compuesto-13:**  $\Delta H = -0,7$  Kcal/mol;  $-T\Delta S = -6,7$  Kcal/mol;  $\Delta G = -7,4$  Kcal/mol

**Compuesto-15:**  $\Delta H = -1,1$  Kcal/mol;  $-T\Delta S = -6,1$  Kcal/mol;  $\Delta G = -7,2$  Kcal/mol

Representando gráficamente los valores obtenidos:



**Figura D2.1.1:** Parámetros termodinámicos obtenidos mediante calorimetría isotérmica de titulación (ITC): entalpía ( $\Delta H$ ); y parámetros termodinámicos calculados: energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) y entropía ( $-T\Delta S$ ) en Kcal/mol para la interacción de la proteína NUPR1 con el compuesto C13 (barras azules) y el compuesto C15 (barras moradas). Las fórmulas utilizadas en los cálculos fueron:  $\Delta G = -RT \ln K$ ;  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ .

## DISCUSIÓN

Como se deduce de la figura anterior (Figura D2.1.1), tanto la interacción de la NUPR1 con el compuesto C13 como su interacción con el compuesto C15 son reacciones espontáneas ( $\Delta G < 0$ ), no apreciándose diferencias importantes entre ambas reacciones. El compuesto C13 muestra una unión dirigida entrópicamente, ya que en él se observa una pequeña contribución de la entalpía ( $\Delta H = -0.7$  Kcal/mol) y una gran contribución entrópica favorable ( $-T\Delta S = -6,7$  Kcal/mol) a la energía de Gibbs de la interacción ( $\Delta G = -7,4$  Kcal/mol). Un perfil de interacción muy similar se ve para el Compuesto 15 ( $\Delta H = -1.1$  Kcal/mol;  $-T\Delta S = -6,1$  Kcal/mol;  $\Delta G = -7,2$  Kcal/mol). En ambos casos, la gran contribución entrópica favorable refleja una importante ganancia de entropía debida a la desolvatación de superficies hidrófobas al producirse la unión, ya que la proteína NUPR1 es una proteína intrínsecamente desestructurada que está mayoritariamente desplegada en su forma nativa. Aunque una pequeña pérdida de entropía será debida al pequeño ordenamiento asociado a la formación del complejo, esta será pequeña, puesto que la entropía es globalmente favorable, de lo que se deduce que el complejo resultante seguirá siendo un complejo probablemente desordenado o “difuso” tras la interacción de la proteína con los distintos compuestos.

### **2.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA (SF): ESTUDIO DE LA MODIFICACIÓN DEL ENTORNO DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS DE NUPR1 TRAS LA INTERACCION CON LOS COMPUESTOS**

La espectroscopía de fluorescencia proporciona información acerca de la estructura terciaria de una proteína entorno a sus aminoácidos aromáticos, y es capaz de detectar cualquier cambio en el entorno de los mismos que se produzca al interaccionar esta con otra biomolécula, ya sea por la interacción directa con el aminoácido aromático o porque, aún interaccionando alejado de este, provoque un cambio conformacional global que lo afecte (Heyduk *et al.*, 2002). Por ello, consideramos que esta técnica resulta muy útil para continuar el estudio de las interacciones entre la proteína NUPR1 y los compuestos C1-C15 seleccionados en el cribado HTS inicial.

En este punto hay que señalar dos características importantes en la proteína NUPR1. Por un lado, se trata de una proteína en cuya composición contiene únicamente dos aminoácidos aromáticos, concretamente dos tirosinas en las posiciones 30 y 36 (Tyr30 y

## DISCUSIÓN

Tyr36), no contando con ningún triptófano en su estructura. Y, por otro lado, NUPR1 es una proteína intrínsecamente desestructurada sin estructura secundaria-terciaria definida. Con estas dos premisas, nuestra hipótesis al aplicar esta técnica estaba basada en que, si los compuestos seleccionados eran capaces de unirse a NUPR1 formando un complejo estable y eran capaces de producir algún tipo de plegamiento en la misma, podrían producir un cambio conformacional de su estructura terciaria (algún cambio estructural, por pequeño que sea) que podría alterar el entorno de los aminoácidos aromáticos, modificando de este modo los espectros de emisión de fluorescencia. Así, en caso de haberse producido la interacción, se observarían diferencias entre los espectros de fluorescencia de los complejos NUPR1-Compuestos y la suma de los espectros de fluorescencia de los componentes individuales (NUPR1 y los compuestos por separado). Por el contrario, en el caso de que dichos espectros coincidieran y no se apreciaran diferencias importantes, sólo indicaría que el entorno de los aminoácidos aromáticos no había resultado modificado, bien porque no se hubiese producido la interacción, o bien porque esta interacción no afectara a los mismos.

Aplicando esta hipótesis, y comparando ambos espectros de fluorescencia (espectro del complejo NUPR1-Compuesto y espectro de NUPR1 + espectro del Compuesto) en todos los casos, se diferenció un grupo de compuestos en los que si se observaron diferencias apreciables entre ambos espectros, y que estaba formado por compuestos C2, C3, C10, C11, C14 y C15 (Figura R2.2.1). Así pues, queda confirmada la existencia de interacción de estos compuestos con la proteína, y la modificación de la estructura terciaria de la misma tras la interacción. Además, si observamos estas diferencias en los espectros, se trata de variaciones en la intensidad de la fluorescencia manteniéndose los máximos de emisión más o menos constantes en todos los casos, como cabría esperar de proteínas en las que sólo existen tirosinas como residuos aromáticos (Lakowicz, 2006) ((Lakowicz, J.R. 1999). También hay que señalar, atendiendo a las diferencias en los espectros, que en todos los casos se ha producido una disminución de la intensidad de fluorescencia en del complejo respecto a sus componentes individuales, lo que se podría relacionar con un plegamiento de la proteína

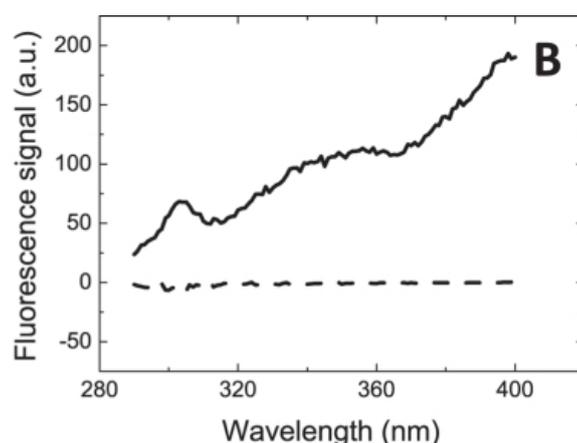
Podemos pensar por tanto que la estructura terciaria de la proteína NUPR1 ha sido modificada tras la interacción los compuestos C2, C3, C10, C11, C14 y C15 y que se han formado complejos estables entre la proteína NUPR1 y dichos compuestos.

## DISCUSIÓN

Lo contrario ocurría en el caso de los compuestos C1, C4, C5, C6, C7, C8, C9 y C13 (Figura R2.2.2) donde no se observan diferencias significativas en la emisión de fluorescencia entre el espectro de fluorescencia de los complejos NUPR1-Compuesto, y la suma de los espectros individuales (NUPR1+compuestos), lo que indica que no se ha modificado el entorno de las Tyr en la interacción. Esto podría deberse a dos razones: o a la ausencia de interacción de estos compuestos con la proteína NUPR1; o a que, habiendo interacción, esta se produce en alguna zona de la proteína alejada de las tirosinas, no afectando a las mismas al cambiar la configuración global de la proteína tras la interacción.

Finalmente, si el compuesto es fluorescente y presenta fluorescencia superior a la de la proteína NUPR1, como ocurre con C12 (Figura R2.2.3), no se obtienen datos concluyentes.

En el caso de los compuestos C13 y C15 se obtuvieron también los espectros de fluorescencia diferenciales. Estos se llevaron a cabo mediante la diferencia entre el espectro de fluorescencia de los complejos NUPR1-C13 o NUPR1-C15 y la suma de los espectros individuales de la proteína y los espectros de los compuestos C13 o C15 respectivamente, tal y como se muestra en la siguiente figura (Figura D2.2.1).



**Figura D2.2.1:** Espectros diferenciales de fluorescencia de los compuestos C13 y C15, obtenidos mediante la diferencia entre el espectro de fluorescencia del complejo NUPR1-C13 o NUPR1-C15 y la suma de los espectros de

## DISCUSIÓN

fluorescencia individuales de la proteína NUPR1 y el compuesto C13 (línea discontinua) o el compuesto C15 (línea continua).

En la figura anterior (Figura D2.2.1) se observa claramente como en el caso del compuesto C15, el espectro diferencial distinto de cero refleja cambios en el entorno alrededor de algún residuo aromático de NUPR1 tras la interacción y, por tanto, la certeza de la interacción del compuesto con la proteína. En el caso del compuesto C13, este espectro diferencial resulta ser cero, no pudiendo corroborar en este caso la existencia de interacción entre dicho compuesto y la proteína NUPR1, tal y como se había quedado reflejado en las Figuras R2.2.1 y R2.2.2.

### **2.3 RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN): ESTUDIO DE LOS RESIDUOS DE NUPR1 IMPLICADOS EN LA INTERACCIÓN CON LOS COMPUESTOS**

Otra de las técnicas utilizadas en este trabajo para la caracterización biofísica de los complejos NUPR1-compuesto resultantes, en este caso para definir las regiones concretas de la proteína NUPR1 en la que se producía la unión de los compuestos, fue la resonancia magnética nuclear (RMN).

La frecuencia de resonancia o desplazamiento químico (ppm), es decir, la posición de la señal de un núcleo activo en el espectro RMN, es determinada por su entorno químico local, de manera que, si este entorno químico cambia, también lo hará la señal de RMN, ya sea en la posición de dicho núcleo en el espectro, o en la amplitud de su señal. Dicho esto, y aplicándolo a nuestro estudio, si alguno de los compuestos seleccionados (C1-C15) interacciona con la proteína NUPR1, los residuos concretos implicados en la interacción cambiarán de entorno químico tras la unión, produciéndose un cambio en la señal de RMN de dichos residuos. Este cambio puede ser caracterizado usando las variaciones en el desplazamiento químico o frecuencia de resonancia, o las variaciones en la amplitud de las señales de resonancia en un espectro de correlación heteronuclear 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  (HSQC). Por el contrario, los residuos que no se encuentren en la zona de interacción, mantendrán intacto su entorno químico, por lo que su señal en el espectro no se modificará. Esto nos permite saber los residuos concretos de la proteína en los que están interaccionando los compuestos.

## DISCUSIÓN

En nuestro caso, la adición de los compuestos C1-C15 a la proteína NUPR1 no produjo ningún cambio en las frecuencias de resonancia y las variaciones en la amplitud de las señales fueron muy pequeñas. El hecho de que la variación en la amplitud de la señal sea pequeña, podría deberse al intercambio de las moléculas de compuesto entre los estados libre y acomplejado con la proteína (estado intermedio dentro de la escala de tiempo de RMN). Además, esta falta de variación en la frecuencia de resonancia hace pensar que la proteína permanece en su mayoría desordenada (dentro de la escala de tiempo de RMN) incluso después de la unión del compuesto, como ya había quedado reflejado en los experimentos de ITC donde las constantes de afinidad del orden de  $\mu\text{M}$  y gran contribución entrópica a la reacción de formación del complejo así lo manifestaban. Por lo tanto, los efectos observados en la desnaturalización térmica de los experimentos de cribado HTS iniciales debido a cierto plegamiento de la proteína tras la interacción con el compuesto, deben ser locales y restrictivos a regiones concretas de la proteína. Únicamente en el caso del compuesto C1 no se aprecia ninguna variación en el espectro de RMN, ni siquiera una mínima variación en la amplitud de resonancia, lo que podría deberse a que se trate de una interacción tan débil que no produzca ningún cambio, o a que C1 no se una directamente a la proteína NUPR1, sino que lo haga a través de algún otro compuesto intermediario.

El hecho de que no observemos cambios en las frecuencias de resonancia tras la adición de los ligandos contradice lo observado en otros estudios descriptivos de interacciones entre pequeñas moléculas e IDPs o regiones intrínsecamente desordenadas de proteínas, en los que sí que se han descrito cambios en los desplazamientos químicos de la proteína que interacciona, aunque en todos los casos estos cambios han sido muy pequeños (Iconaru et al., 2015), (Krishnan et al., 2014). En uno de ellos en concreto se describen únicamente variaciones en la dimensión de  $^1\text{H}$ , pero no en la dimensión del  $^{15}\text{N}$  (Iconaru et al., 2015). Además, es importante destacar que en todos estos estudios, al igual que en este trabajo, la cantidad de ligando añadido fue siempre mayor que la cantidad de la IDP para asegurar la formación del complejo.

Sin embargo, a pesar de no observarse variaciones en la frecuencia de resonancia, sí que fueron observadas ligeras variaciones (excepto en el caso del C1) en la amplitud de resonancia de algunos residuos muy concretos de la proteína. De estos residuos, que varían un poco para cada compuesto, hay dos que resultaron afectados en muchas de las

## DISCUSIÓN

interacciones, y por tanto con un papel fundamental en la interacción NUPR1-Compuesto: estos residuos son los aminoácidos Ala33 y Thr68 (Tabla R2.3.2). Merece la pena resaltar también que, el hecho de que las variaciones en la intensidad de resonancia, aunque muy pequeñas, fueran observadas en los mismos residuos de la proteína, sugiere que el mecanismo de unión entre ambas biomoléculas es específico.

Esto concuerda con algunos estudios previos, en los que se pone de manifiesto la región de unión de la proteína NUPR1 en su interacción con MSL1, uno de sus ligandos biológicos naturales, y que comprende entre otras las siguientes regiones de la proteína: Leu24-Asp28, Tyr30, Ala33-His34, y Lys65-Thr68 (Aguado-Llera et al., 2013b). Todos estos residuos se encuentran alejados en la estructura primaria de la proteína, pero deben estar muy cerca entre sí tras su unión a MSL1, aunque se desconoce la estructura secundaria-terciaria concreta resultante. Estos residuos implicados en la unión de NUPR1 a sus ligandos biológicos descritos en trabajos previos, coinciden en su mayoría con los residuos en los que se observan cambios en el espectro RMN en este trabajo (Tabla R2.3.2), lo que indica un comportamiento similar entre los compuestos seleccionados y los ligandos biológicos de la proteína. Los resultados sugieren que los compuestos seleccionados en este trabajo interactúan con la proteína NUPR1 en las mismas regiones en las que lo hacen sus ligandos biológicos naturales (MSL1), sin inducir ninguna estructura rígida ordenada en la proteína y manteniéndose la estructura “fuzzy” o desordenada tras la interacción.

En la tabla anteriormente citada (Tabla R2.3.2) se observa un residuo cuya resonancia se ve afectada por la interacción de todos los compuestos con la proteína: la Thr68. Y es este residuo precisamente el que está implicado en la unión de NUPR1 al DNA y en la interacción de NUPR1 a DNA+MSL1) (Aguado-Llera et al., 2013b), aunque, como hemos señalado anteriormente, esta interacción entre NUPR1 y su ligando biológico MSL1, sí que induce un pequeño cambio en el desplazamiento químico en las resonancias de este residuo de la proteína. Otra región en la que se observan variaciones en la amplitud de los picos de resonancia por la unión de algunos de los compuestos, concretamente los compuestos C3, C6, C8, C9 y C12, es la región de los residuos alrededor de la posición 30 (Ala 34, Leu30) que es precisamente la zona donde están las dos Tyr (Tyr30 y Tyr36) de la proteína, y es precisamente también la zona de NUPR1 que se ve afectada por la unión de la misma a la protimosina alfa, MSL1 y DNA (Malicet, Giroux, et al., 2006b).

## DISCUSIÓN

Por todos los resultados obtenidos en los espectros de RMN, creemos que la proteína NUPR1 permanece en su mayoría desordenada tras la formación de los complejos con los distintos compuestos, debido a la ausencia de cambios significativos en el desplazamiento químico en ninguno de los residuos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Aguado et al. (Aguado-Llera et al., 2013b) por lo que pensamos que NUPR1 presenta regiones de interacción según forme complejos con los compuestos o el DNA, manteniéndose en ambos casos la estructura desordenada de la proteína (*fuzzy complex*) tal y como muestran los experimentos de RMN. Además, creemos que estas interacciones son específicas, debido a que los residuos implicados son los mismos en todos los compuestos, y similares también a los implicados en la unión de NUPR1 a alguno de sus ligandos biológicos.

Es decir, todos los estudios sugieren que los compuestos interaccionan con la proteína en los mismos residuos que sus ligandos biológicos sin inducir ninguna estructura rígida en NUPR1.

También se intentó obtener espectros de dicroísmo circular (DC) de los complejos para obtener más información, pero desafortunadamente, la presencia de DMSO que absorbe intensamente a longitudes de onda por debajo de 225nm, impidió la obtención de cualquier medida fiable.

### **2.4 METODOS COMPUTACIONALES: DINÁMICA MOLECULAR Y ACOPLAMIENTO (DOCKING) MOLECULAR**

#### **Estudio bioinformático de la secuencia de la proteína:**

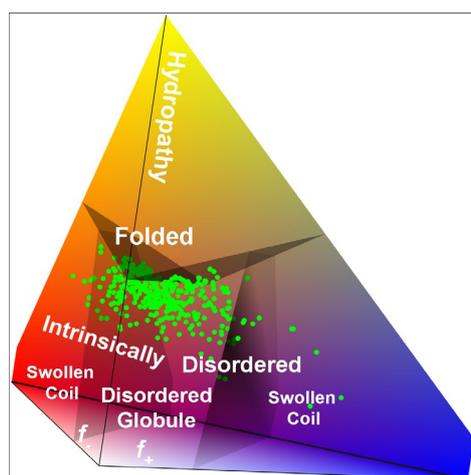
Los métodos computacionales o “*in silico*” basados en el análisis de la estructura primaria, es decir, de la secuencia de aminoácidos de las proteínas, aplicados al estudio de las posibles interacciones de las mismas con otras biomoléculas, vienen a complementar los datos obtenidos mediante otras aproximaciones como fluorescencia, RMN o ITC.

## DISCUSIÓN

En el caso de la proteína NUPR1, no debemos olvidar que se trata de una proteína intrínsecamente desordenada. Si hacemos referencia al espacio conformacional de los polipéptidos en estado nativo, las dos principales características físicas que diferencian las proteínas IDPs de las proteínas plegadas son la alta carga y la baja hidrofobicidad de las primeras con respecto a las segundas, es decir, las IDPs se caracterizan por un número mayor de aminoácidos cargados y de baja hidrofobicidad (Uversky *et al.*, 2015). Así, la alta carga de los residuos permite las repulsiones carga-carga que compiten con las interacciones hidrofóbicas de la proteína plegada, mientras que la baja hidrofobicidad permite que haya más residuos expuestos al disolvente, lo que facilita la conformación desplegada de la proteína. Por lo tanto, ambas características son requisitos importantes para la ausencia de estructura regular, y para que la proteína se encuentre desplegada bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, otras características como la longitud de la proteína, la carga neta o el punto isoeléctrico, no son diferentes entre las IDPs y las proteínas plegadas (VN *et al.*, 2000). En el estudio bioinformático de la secuencia de la proteína NUPR1 mediante el servidor ExpASy, se observa que NUPR1 cumple con ambas características típicas de las IDPs, tanto la baja hidrofobicidad como el alto contenido en aminoácidos cargados. Aunque su hidrofobicidad es mayor que la hidrofobicidad media de las típicas IDPs, es mucho menor que la hidrofobicidad de las proteínas globulares plegadas (VN *et al.*, 2000). Por otro lado, los datos obtenidos sobre el número de residuos cargados positiva y negativamente indican que NUPR1 es un poli-anfolito medianamente cargado situado entre los anfolitos débiles y los fuertes (Das & Pappu, 2013) descrito como un glóbulo desordenado según el diagrama de fases 3D de Mao *et al.* (Mao *et al.*, 2010)

El diagrama de fases 3D de Mao *et al.* 2010 clasifica a las proteínas, atendiendo a la hidropatía y los porcentajes de residuos cargados positiva y negativamente en dos grupos: proteínas plegadas o proteínas intrínsecamente desordenadas. Este segundo grupo lo clasifica a su vez en 2 subgrupos distintos ya que las IDPs pueden estar colapsadas (como glóbulo fundido) o extendidas (como hélice hinchada o glóbulo pre-fundido) (Figura D2.4.1).

## DISCUSIÓN



**Figura D2.4.1:** Diagrama de estados de Mao et al. Los tres ejes representan el porcentaje de residuos cargados positivamente ( $f_+$ ), el porcentaje de residuos cargados negativamente ( $f_-$ ) y la hidropatía, todos ellos calculados según la composición de aminoácidos de la estructura primaria de la proteína. El valor de la hidropatía divide la pirámide en dos partes, la superior, donde estarían situadas las proteínas plegadas, y la inferior, con valores de hidropatía bajos donde están situadas las proteínas intrínsecamente desordenadas. A su vez, estas últimas se dividen en glóbulos desordenados o hélices engrosadas según los porcentajes de aminoácidos cargados negativa y positivamente.

En el caso de NUPR1, dada su carga media y su hidrofobicidad media, encaja bien dentro de la región que define las IDPs-glóbulo desordenado o IDPs-globulo fundido, en el diagrama de Mao et al.

Además, el radio hidrodinámico determinado por RMN fue de  $22 \pm 3$  Amstrongs, ligeramente menor que el valor teórico esperado para la proteína NUPR1, lo que viene a corroborar los experimentos anteriores indicando que la proteína es posiblemente un poco más compacta de lo esperado teóricamente (glóbulo desordenado). Por tanto, se puede esperar para la proteína una forma aproximadamente globular con algunos residuos parcialmente protegidos del solvente, al menos transitoriamente.

Por todo ello, NUPR1 puede ser considerada como una proteína intrínsecamente desordenada, pero con una forma aproximadamente globular un poco más compacta de lo esperado teóricamente (Mao et al., 2010).

## DISCUSIÓN

En la Figura R2.4.1 se muestra el carácter hidrofóbico de cada uno de los residuos de la proteína NUPR1, calculado de acuerdo con la escala de hidrofobicidad de Kyte-Doolittle, y utilizando una ventana de 5 residuos para evaluar la hidrofobicidad local alrededor de cada residuo de aminoácido considerando la contribución de los dos residuos adyacentes a cada lado de la secuencia.

Esta escala, caracteriza el carácter hidrofóbico de las secuencias de proteínas, y permite una aproximación de la ubicación de cada residuo en la conformación global de la misma, ya que los residuos más hidrofóbicos se localizarán en el interior de la proteína, siendo los residuos menos hidrofóbicos los que se encuentran en contacto con el disolvente. En nuestro caso, la mayoría de los residuos muestran índices de hidrofobicidad por debajo de cero, lo que concuerda con la característica de baja hidrofobicidad de las IDPs en general.

En la figura mencionada anteriormente (Figura R2.4.1), se aprecia como los picos más prominentes, es decir, los residuos más hidrofóbicos, se corresponden con los residuos afectados por la unión de los compuestos a la proteína NUPR1 según los experimentos de RMN, con un margen de dos residuos como máximo. En particular, los dos máximos valores de hidrofobicidad corresponden al residuo 31, localizado entre la Leu29 y la Ala33, y al aminoácido clave cuya resonancia se ve modificada por la unión de todos los compuestos, la Thr68. Se pueden observar también otros dos picos importantes en el patrón de hidrofobicidad entre los residuos 8-9 y el residuo 39, que se corresponden con la Ser9, Ala10 y Gly38, aminoácidos en los que también se observan variaciones en sus espectros RMN al llevarse a cabo la interacción proteína-compuesto. Se aprecia claramente como los picos más prominentes o de mayor hidrofobicidad, coinciden claramente con aquellos residuos de la proteína NUPR1 cuyas resonancias se veían afectadas por la unión de los compuestos, según los resultados observados en RMN

Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante el análisis de la secuencia de NUPR1 junto con los resultados de RMN, revelan que la hidrofobicidad es la característica física determinante que dirige la interacción de los compuestos con la proteína. También es importante señalar que las variaciones en RMN no fueron observadas para todos los residuos de las zonas teóricamente identificadas como zonas hidrofóbicas, sino que estas variaciones fueron identificadas solo en un pequeño y restringido subconjunto de estas.

## DISCUSIÓN

Por todo esto, creemos que la interacción entre la proteína NUPR1 y los distintos compuestos tiene lugar a través de las regiones hidrofóbicas, pero los resultados sugieren que esta interacción es específica y es llevada a cabo únicamente por unos aminoácidos concretos dentro del grupo de aminoácidos hidrofóbicos.

Aunque los datos anteriores son claros, no significa que la composición del resto de aminoácidos tenga poca importancia. Por ejemplo, es posible intercambiar la posición de la Ala33 y la Thr68 y obtener una curva cuantitativa y cualitativamente idéntica a la obtenida aquí. Sin embargo, la unión del ligando se vería altamente afectada en este caso.

Respecto a los estudios de probabilidad de orden de cada uno de los residuos de la proteína NUPR1, calculado mediante tres métodos distintos que relacionan el orden con la capacidad dinámica de cada residuo, cabe señalar que, como se ve en la Figura R2.4.2, aunque usando distintas aproximaciones de cálculo y sin ser normalizadas entre ellas, todos los predictores señalan que existen únicamente dos zonas en la proteína: la que comprende los residuos 27-38, que contiene a los residuos Leu29 y Ala33 y de forma marginal a Gly38; y la zona que comprende los residuos 64-72, que contiene el residuo clave Thr68 y de forma marginal His62 que, aun siendo zonas que no están ordenadas en la proteína, tienen tendencia a convertirse en regiones ordenadas bajo condiciones favorables. Recordemos que según el parámetro de predicción de orden  $S^2$  calculado con los métodos anteriores, los residuos se clasifican en residuos estables ( $S^2 \geq 0,75$ ), dependientes del contexto ( $0,65 < S^2 < 0,75$ ), o desordenados  $0,65 < S^2$ .

Respecto a las predicciones de la probabilidad de unión de cada residuo de la proteína NUPR1 mediante la transición desorden-orden (Figura R2.4.3), se observa en ambos métodos utilizados, que las zonas que más probablemente estén implicadas en la unión a los compuestos sean las centradas alrededor de la Ala33 y de la Thr68, lo que coincide con los resultados anteriormente obtenidos, es decir con las regiones de la proteína que, aun siendo desordenadas, tienden a pasar al orden bajo condiciones adecuadas, como por ejemplo la unión de un ligando.

Estos datos coinciden de nuevo con los datos de los experimentos de RMN, es decir, que los residuos de la proteína con más probabilidad de participar en la interacción con un

## DISCUSIÓN

ligando coinciden con los residuos de la proteína cuyas resonancias se ven modificadas por la interacción de los compuestos.

Como conclusión global y para resumir todas las predicciones obtenidas mediante el análisis de la secuencia de la proteína NUPR1, señalar que todos los datos sugieren la existencia de dos regiones principales que muestran una alta hidrofobicidad, un cierto grado de orden, y una posible tendencia intrínseca a participar en la unión a otras biomoléculas. Estas regiones son la zona de la Ala33 y la zona de la Thr68, resultados que coinciden con los obtenidos en los experimentos de RMN.

Además, del estudio bioinformático de la secuencia de la proteína NUPR1, podemos deducir que la hidrofobicidad es el principal determinante en la interacción de NUPR1 con los distintos compuestos, y que los residuos de la proteína implicados tienen una conformación particular restringida en disolución, aunque no sabemos el tipo de estructura secundaria o terciaria implicada. En particular, los residuos de la proteína que interactúan selectivamente con los compuestos según los experimentos de RMN están localizados en los picos de las gráficas de hidropatía de la proteína NUPR1 con un margen de 1-2 residuos a ambos lados.

### **Modelaje de la estructura de los complejos formados por la proteína NUPR1 y los compuestos seleccionados:**

Respecto al modelaje de la estructura de los complejos formados por NUPR1 y los compuestos C1-C15 mediante acoplamiento molecular o *docking*, se observa como las uniones de la mayoría de los compuestos a la proteína NUPR1 son energéticamente favorables. Los datos más favorables se obtienen en los compuestos C2 y C15, con unas energías de unión del orden de -6.5 Kcal/mol, valor similar al obtenido y validado experimentalmente para polifenoles u otros ligandos con múltiples anillos en complejos formados por los mismos con proteínas plegadas en estado nativo (Evoli et al., 2014) (Pantusa et al., 2014).

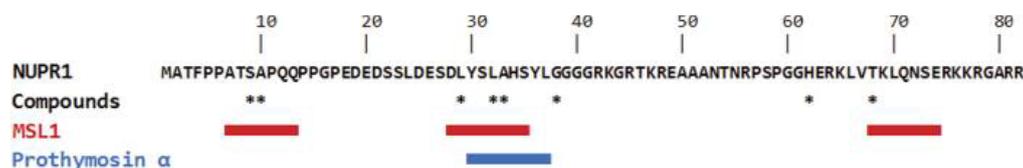
Los experimentos mostrados en la Figura R2.4.4 revelan de nuevo la importancia crucial del residuo Thr68, concretamente de su cadena lateral, en la interacción de NUPR1 con

## DISCUSIÓN

todos los compuestos. Se trata de un residuo fundamental en la interacción de la proteína NUPR1, pero los experimentos muestran también cómo no es suficiente con este residuo que proporciona el sitio de anclaje a la proteína, sino que es necesaria también la cooperación de otros residuos de la proteína para que se produzca la interacción y quede fijado el ligando. Esto refuerza de nuevo la idea de que no solo es importante el aminoácido específico que proporciona el sitio de anclaje, sino también la presencia concomitante de los residuos de proteína que lo rodea, y que estabilizan aún más la interacción.

En las simulaciones de acoplamiento molecular llevadas a cabo, las regiones más próximas al residuo clave Thr68, son Leu37 y Gln31, las cuales son adyacentes a los aminoácidos aromáticos Tyr36 y Tyr30, que son los únicos residuos fluorescentes de NUPR1, lo que puede explicar los cambios observados en los espectros de fluorescencia de NUPR1 tras la adición de algunos de los compuestos (Figura R2.2.1).

Es conocido por estudios previos que ambas tirosinas están también involucradas en la unión de la protimosina  $\alpha$  (Malicet, Giroux, et al., 2006b), y simulaciones de acoplamiento molecular previas sugieren que las Tyr también intervienen en la unión al DNA (Urrutia et al., 2014). Por lo tanto, todas las especies diferentes de ligandos, incluidas biomoléculas grandes simples y pequeños compuestos orgánicos, parecen unirse a las mismas regiones de NUPR1 (Figura D2.4.2).



**Figura D2.4.2:** Regiones “calientes” de la proteína NUPR1: En la parte de arriba de la secuencia de aminoácidos se muestra la secuencia de la proteína NUPR1 humana. Los residuos cuya señal de resonancia se vio modificada por la presencia de alguno de los 15 compuestos C1-C15 están señalados con un asterisco en la parte de debajo de la secuencia. La región afectada por la unión de prothymosin  $\alpha$  fue monitorizado por cambios de fluorescencia (Malicet, Giroux, et al., 2006b). Las regiones afectadas por la unión a MSL1 fue monitoreado por controlados por cambios en los espectros RMN (Aguado-Llera et al., 2013b).

## DISCUSIÓN

Como sugiere la figura anterior (Figura D2.4.2), tanto las interacciones de NUPR1 con sus ligandos biológicos MSL1 o protimosina- $\alpha$ , como las interacciones de NUPR1 con los compuestos objeto de este trabajo, son llevadas a cabo por los mismos residuos de la proteína, que incluyen a la Leu29 (no en la protimosina), Ala33 y Thr68, resultado residuos claves en la interacción y reforzando la idea de estar ante una interacción específica.

Usando una gran variedad de las herramientas computacionales disponibles, desarrolladas específicamente para el análisis de secuencias de IDPs y usando diferentes métodos predictivos, se ha llegado a la conclusión de que la estabilización inducida por el entorno (residuos adyacentes a los implicados directamente en la unión) dentro de una porción específica de la proteína NUPR1, refuerzan aún más la unión de esta proteína con sus ligandos. En particular, la Ala33 y Thr68 destacan claramente como residuos centrales en las dos regiones clave de la proteína involucradas en la unión de los compuestos, aunque necesitan la contribución de residuos adicionales de la proteína para garantizar el anclaje.

### **3. ESTUDIOS *IN VITRO* CON CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS HUMANAS**

Los experimentos llevados a cabo hasta este punto del trabajo, todos ellos basados en herramientas biofísicas o computacionales, habían mostrado clara evidencia de la interacción de la mayoría de los compuestos seleccionados mediante el cribado HTS inicial (C1-C15) con la proteína NUPR1 a nivel extracelular o *ex vivo*. Sin embargo, una vez demostrada la unión de un ligando a una proteína, son necesarios más estudios fenotípicos para evaluar la bioactividad potencial de estos complejos, ya que la interacción entre ambas moléculas es un prerrequisito necesario para la modulación de la actividad biológica de la proteína por parte del ligando, pero esta unión no implica necesariamente la existencia de este efecto regulador por parte del ligando.

Así que para completar la información obtenida por las técnicas anteriores y profundizar en la interacción de la proteína con los compuestos a nivel celular, fue necesario llevar a cabo diversos estudios celulares y animales que corroboraran dicha interacción entre NUPR1 y los compuestos C1-C15 a nivel *in vivo*.

## DISCUSIÓN

Lo que se trató de demostrar con estos experimentos es la hipótesis principal de este trabajo, es decir, que la unión de los compuestos a la proteína NUPR1, modularía la unión de la misma a sus ligandos biológicos, alterando por tanto las propiedades protumorales que los complejos biológicos tienen en las células tumorales.

### **3.1 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN NUPR1-LIGANDO A NIVEL INTRACELULAR: ENSAYO DE LIGACIÓN POR PROXIMIDAD *IN SITU* (PLA: *PROXIMITY LIGATION ASSAY*)**

La primera cuestión planteada, tras la comprobación de que la interacción de la mayoría de los compuestos a la proteína NUPR1 era posible a nivel extracelular, fue si esta interacción era posible también a nivel intracelular.

Los resultados de los experimentos anteriores muestran claramente la capacidad de la mayoría de los compuestos de interaccionar con la proteína NUPR1 a nivel extracelular pero, ¿son capaces estos compuestos de interaccionar a nivel intracelular e interferir en la interacción intracelular natural entre NUPR1 y sus ligandos biológicos? O más interesante aún, los compuestos seleccionados ¿tienen alguna actividad biológica en la célula?, por ejemplo, ¿son capaces de alterar alguna propiedad de las células tumorales pancreáticas utilizadas en este trabajo?

Para responder a la primera cuestión, fueron llevados a cabo ensayos de ligación por proximidad *in situ* o ligación de proteínas (PLA) con el objetivo de determinar si dicha interacción se produce también a nivel intracelular y es capaz de bloquear la interacción de la proteína NUPR1 con alguno de sus ligandos biológicos, en este caso MLS1. Esta interacción bloquearía la acción protumoral de la que el complejo biológico se sabe es responsable (Gironella *et al.*, 2009). Esto podría considerarse un paso previo a la segunda cuestión, que se aborda posteriormente en este trabajo, y que consiste en el estudio de la posible modificación de la actividad biológica de la proteína por la acción de los compuestos, es decir el estudio de la posible acción antitumoral de los compuestos seleccionados.

La técnica PLA, descrita por primera vez en 2002 (Fredriksson *et al.*, 2002) y utilizada en numerosos trabajos (Aguado-Llera *et al.*, 2013), combina la biología molecular con la

## DISCUSIÓN

inmunohistoquímica y permite visualizar, detectar *in situ* e incluso cuantificar proteínas o, como en este trabajo, interacciones entre dos proteínas en líneas celulares adherentes. En nuestro caso fue utilizada para estudiar la acción de los compuestos seleccionados sobre la interacción de la proteína NUPR1 con su ligando biológico MLS1, estudiando si los compuestos, que hemos probado anteriormente que se unen a la proteína a nivel extracelular, son capaces de bloquear esta interacción e inhibir las acciones protumorales del complejo NUPR1-MLS1.

Para llevar a cabo esta técnica es necesario que las proteínas NUPR1 y MSL1 se encuentren unidas a nivel intracelular, cosa que ocurre si se somete a la célula a un daño celular (Gironella et al., 2009) (Aguado-Llera et al., 2013b). Para causar este daño celular se incubaron las células con Oxiplatino, fármaco alquilante utilizado como antineoplásico que interacciona con el DNA formando puentes intra e intercatenarios que conllevan la interrupción en la síntesis del DNA y el bloqueo de la división celular. Esto provoca la sobreexpresión de ambas proteínas y la formación del complejo reparador del DNA NUPR1-MSL1.

Tal y como muestran los ejemplos de las Figuras R3.1.2 y R3.1.3, destaca un grupo de compuestos, formado por los compuestos C2, C3, C9, C10, C12, C13 y C15, en los que se observa una disminución significativa de la señal de fluorescencia en las células tratadas con los mismos, respecto a la señal de fluorescencia de las células sin tratar (control positivo). Esto indica que son capaces de unirse a NUPR1 e inhibir, por lo menos parcialmente, su interacción con su ligando biológico MSL1, sugiriendo que MSL1 y dichos compuestos compiten por el mismo sitio de unión en NUPR1, lo que concuerda con los datos obtenidos en los experimentos de RMN y dinámica molecular llevados a cabo previamente. Para el resto de los compuestos, los experimentos muestran que no son capaces de inhibir la interacción entre ambas proteínas ya que no hay reducción significativa de la señal de fluorescencia respecto al control. Esto podría ser debido a dos razones: o bien porque realmente los compuestos no son capaces de unirse a la proteína NUPR1 a nivel intracelular, ya sea porque el compuesto no puede entrar en la célula o porque hay algo en el interior de la célula que impide su interacción (hay que recordar que aunque ha quedado demostrada su interacción *in vitro*, lo cierto es que las condiciones intracelulares son mucho más complejas); o podría deberse a que, aunque el compuesto sea incapaz de inhibir la interacción de la proteína NUPR1 con MSL1, fuera capaz de

## DISCUSIÓN

inhibir su interacción con otro de sus ligandos biológicos, y bloquear así alguna otra de sus funciones protumorales en la célula.

En cualquier caso, nos interesa el primer grupo de compuestos, ya que uno de nuestros objetivos en este trabajo es el bloqueo de la reparación del DNA en las células tumorales tras el tratamiento con un antineoplásico para conseguir el aumento de sensibilidad a los fármacos de las células tumorales. El mecanismo de acción de muchos neoplásicos es precisamente el daño del DNA para provocar la muerte celular, por lo que es interesante que este DNA no se repare para permitir a la célula entrar en apoptosis, lo que podría conseguirse impidiendo la formación del complejo NUPR1-MSL1.

### **3.2 ESTUDIOS CELULARES: EFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS TUMORALES CON LOS COMPUESTOS SELECCIONADOS**

Una vez demostrada la capacidad de interacción de varios de los compuestos con la proteína NUPR1 tanto a nivel extra como intracelular y la interferencia de esa interacción en la unión natural entre la proteína y alguno de sus ligandos biológicos, queda dar respuesta a la segunda cuestión planteada, ¿Tiene alguna actividad biológica en la célula el complejo formado por la proteína y los compuestos? ¿Tienen capacidad esos complejos de alterar algunas de las propiedades protumorales naturales de NUPR1? Para tratar de dar respuesta a esta cuestión fueron llevados a cabo varios experimentos para evaluar el efecto del tratamiento de las células tumorales con los compuestos y su repercusión biológica.

#### **3.2.1 ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR**

Para investigar esta cuestión, es decir, la posibilidad de que la interferencia de los compuestos en la unión de la proteína NUPR1 a sus ligandos biológicos pudiera alterar alguna propiedad de las células tumorales pancreáticas, se llevaron a cabo distintos estudios, entre los que se encuentran los estudios de citotoxicidad celular. En ellos se pretende estudiar si el tratamiento de las células con los compuestos alteraba en alguna medida la supervivencia de las células tumorales.

## DISCUSIÓN

Tras el tratamiento de las mismas con concentraciones crecientes de hasta 120 $\mu$ M de los compuestos (C1-C15), se detectó un grupo de compuestos capaces de disminuir la viabilidad de las células MiaPaca2 a una concentración razonablemente baja para evitar posibles efectos secundarios en células sanas. Los compuestos en los que esta alteración es más notable son los compuestos C1, C13 y C15, en los que se observa una importante disminución en el número de células viables tras el tratamiento con los mismos, comparado con las células sin tratar (control) (Figura R3.2.1.1). Esto queda reflejado en las bajas concentraciones inhibitorias semimáximas o IC50 (concentración de compuesto necesaria para producir un descenso en el número de células del 50%) observadas en dichos compuestos para todos los tiempos ensayados (24, 48 y 72h). A la misma conclusión se llegó estudiando la viabilidad de las células MiaPaca2 tratadas con los compuestos a una concentración fija de 30 $\mu$ M, siendo los compuestos citados anteriormente los que más y más rápido disminuyen la viabilidad de las células MiaPaca2 (Figura R3.2.1.2). Una de las cosas a tener en cuenta en el diseño de una droga es que esta tenga una dosis efectiva, definida como la dosis mínima capaz de producir el efecto deseado de la droga, lo mas baja posible para evitar los posibles efectos adversos de la droga sobre células no tumorales. Esto minimizará los efectos secundarios debido a la necesidad de dosis de fármacos mas reducidas. Los compuestos C1, C13 y C15 cumplen este requisito de ser muy citotóxicos a dosis bajas del compuesto por lo que se convierten en buenos candidatos para el tratamiento del adenocarcinoma ductal de páncreas.

Los mismos resultaron se observaron al tratar a las células tumorales con dosis mas bajas de compuesto (10 $\mu$ M) y durante mas tiempo (6 días) (Figura R3.2.1.4). Y además, en el caso de los compuestos C13 y C15, se observó un comportamiento, en lo que se refiere a viabilidad celular, similar al observado al tratar las células tumorales con un antineoplásico estandar como es el oxaliplatino (Kornmann *et al.*, 2000) .

En el caso del compuesto C1, estas diferencias en la viabilidad celular respecto al control no son tan acusadas como se había visto en los experimentos anteriores, lo que podría ser explicado por la alta desviación estandar de las repeticiones de los experimentos encontradas en este último experimento, que hace que la variabilidad sea muy grande y el test no resulte estadísticamente significativo . Por lo que los resultados con el compuesto C1 no fueron del todo concluyentes.

Con los experimentos llevados a cabo anteriormente en este trabajo quedó demostrado que muchos de los compuestos interaccionan con NUPR1 tanto a nivel extracelular como

## DISCUSIÓN

a nivel intracelular, y con los experimentos de citotoxicidad celular de esta parte del trabajo ha quedado claro que las células tumorales mueren más en presencia de los compuestos que en las células sin tratar. Así pues, la siguiente cuestión planteada sería si esa muerte de las células es debida directamente a la interacción de los compuestos con la proteína NUPR1. Para estudiar esta cuestión, es decir, si el efecto citotóxico de estos compuestos sobre las células MiaPaca2 es debido a su interacción y la formación de un complejo con la proteína NUPR1, se realizaron experimentos de viabilidad celular en dos líneas celulares: células de modelo de ratón con adenocarcinoma ductal de páncreas que expresan NUPR1, y células *OK* para la proteína (células que no expresan NUPR1) tratadas con los compuestos C13 y C15. En estos ensayos se observaron importantes diferencias entre el compuesto C13 y el compuesto C15 (Figura R3.2.1.5), lo que sugiere una diferencia en la especificidad de ambos compuestos por la proteína NUPR1 y una diferencia en el mecanismo de acción citotóxico de estos compuestos en las células tumorales. Se observa como las células que no expresan la proteína NUPR1 son resistentes al compuesto C15, mientras que las células que expresan la proteína son muy sensibles a este compuesto. Sin embargo, en el caso del compuesto C13, se observa como las células que expresan NUPR1 son mucho menos sensibles al compuesto que las células que no la expresan. Estos resultados sugieren que el compuesto 15 podría inhibir la viabilidad celular por una vía dependiente de NUPR1 mientras que el compuesto C13 es altamente tóxico para las células pero este efecto es independiente de NUPR1, siendo su efecto dependiente de otras vías de señalización. Por esta razón el compuesto C13 no cumple los requisitos de candidato a droga para el adenocarcinoma ductal de páncreas cuyo mecanismo de acción sea a través de NUPR1 planteado en este trabajo.

En los experimentos llevados a cabo hasta este punto del trabajo destaca sobre los demás el compuesto C15, ya que es el único que inhibe la viabilidad celular por una vía dependiente de la proteína NUPR1. El tratamiento de células PDAC con el compuesto C15 imita la deficiencia de NUPR1 en la célula, aunque probablemente no sea el único mecanismo de acción ya que en las células *ko* también se ven afectadas minimamente.

Para profundizar un poco más en la acción de este compuesto, se analizó la capacidad de este compuesto de modificar la sensibilidad de las células MiaPaca2 a los quimioterápicos utilizados habitualmente para el tratamiento del adenocarcinoma ductal de páncreas, la gemcitabina y el oxaliplatino. Los experimentos de viabilidad celular llevados a cabo con una combinación de ambos quimioterápicos junto con el compuesto C15 (Figura R3.2.1.6)

## DISCUSIÓN

muestran una reducción importante en el IC50, es decir, una reducción muy significativa de la concentración de fármaco necesaria para disminuir a la mitad la viabilidad de las células en el caso del tratamiento de las células con la combinación de quioterápico estandar más compuesto C15, comparado con el tratamiento de las células únicamente con cualquiera de los dos quimioterápicos (Tabla R3.2.1.7). Queda demostrado por tanto que la sensibilidad de los quimioterápicos utilizados en la práctica clínica para tratar en adenocarcinoma ductal de páncreas aumenta con la adición al tratamiento del compuesto C15 a baja concentración.

En este punto, y para probar la especificidad de los compuestos seleccionados para las células tumorales, se podría comparar el efecto citotóxico de los compuestos en las células MiaPaca2 con su efecto en células no tumorales (por ejemplo fibroblastos). En nuestro caso, este experimento no se llevó a cabo ya que se diseñaron experimentos para medir la eficacia y la toxicidad de los compuestos en ratones (ver apartado posterior).

### **3.2.2 ESTUDIOS CELULARES A TIEMPO REAL: iCELLigence assays**

Tras los resultados de viabilidad celular observados (Figura R3.2.1.6) en el tratamiento de las células MiaPaca2 con el compuesto C15 y dos de los fármacos antineoplásicos usados actualmente, la Gemcitabina y el Oxaliplatino, se intentó determinar la rapidez con la que estos tratamientos actuaban sobre las mismas. Para ello se utilizó el sistema *iCELLigence*, que utiliza un sistema basado en la impedancia producida por las células adheridas a un biosensor, de manera que la señal aumenta al aumentar el número de estas células. Se trata de un analizador celular a tiempo real, que permite monitorizar estudios de proliferación celular, viabilidad, invasión y citotoxicidad (Şener et al., 2017) en cada momento del experimento.

Ya se había determinado en experimentos previos de viabilidad celular el efecto de la Gemcitabina, el Oxaliplatino o el compuesto C15 sobre las células tumorales pancreáticas, y ahora se trataba de analizar la velocidad con que esos compuestos actúan. Tras el análisis de los datos observados en la Figura R3.2.2.1, se puede afirmar en el caso de las células tratadas con C15 una frenación de la proliferación celular mucho más rápida que en los casos de las células tratadas con los quimioterápicos Gemcitabina y

## DISCUSIÓN

Oxaliplatino, aunque el número final de células sea similar en algún caso. Este efecto es notable ya a las 8 horas del tratamiento con C15, mientras que no es significativo hasta las 20h en el caso de la Gemcitabina, o las 38h en el caso del Oxaliplatino, lo que da una idea de la eficacia de los distintos tratamientos.

### 3.2.3 ESTUDIOS DE CICATRIZACIÓN HERIDAS (Wound Healing Assay)

Para investigar la siguiente cuestión planteada, es decir, la posibilidad de que la interferencia de los compuestos en la unión de la proteína NUPR1 a sus ligandos biológicos pudiera alterar alguna de las propiedades protumorales de los complejos biológicos de las células tumorales pancreáticas, se llevaron a cabo distintos estudios en células tumorales tratadas con dichos compuestos.

La invasión y metástasis de las células tumorales es la causa principal del desenlace fatal de las enfermedades oncológicas. Para llevar a cabo estos procesos, las células tumorales deben completar una serie de pasos muy complejos llamada “cascada metastásica” que incluye cambios en la adhesión, invasión local, intravasación, circulación, extravasación, supervivencia, proliferación y angiogénesis. La migración celular es un mecanismo complejo considerado como uno de los primeros pasos para que se produzca la metástasis del tumor. En este proceso, las células tumorales metastásicas adquieren la característica de alterar sus interacciones adhesivas con otras células o componentes de la matriz extracelular, perdiendo la adhesión entre ellas para poder migrar del tumor primario e instaurarse en otro órgano o tejido, requisito previo para la liberación de células invasoras de los carcinomas (Gassmann *et al.*, 2004) (Behrens *et al.*, 1993). Así que una cualidad importante de un agente quimioterápico es que sea capaz de disminuir esa capacidad de migración de las células tumorales y disminuir por tanto su capacidad de metastatizar.

De hecho, en el caso del cáncer de páncreas existen estrategias terapéuticas para contrarrestar la invasión y diseminación metastásica de las células tumorales pancreáticas que incluyen también la inhibición de las señales que ponen en marcha ese mecanismo metastático (Mimeault *et al.*, 2010a). Por ejemplo, el tratamiento de células de cáncer de páncreas con TGF-beta, se ha observado que induce la expresión de genes asociados al proceso metastático, a la vez que se reduce la expresión de Ecadherina, molécula asociada

## DISCUSIÓN

a la adhesión célula-célula, lo que provoca una mayor capacidad invasiva a las células de cáncer de páncreas en respuesta al TGF-beta (Mimeault et al., 2010b), (Kabashima *et al.*, 2009). Por lo que un tratamiento que redujese también esa adhesión célula-célula, como podría ser el caso de nuestros compuestos C13 y C15, podría ser de utilidad en el tratamiento del cáncer de páncreas metastásico.

En los experimentos de cicatrización de heridas (*Wound Healing Assay*) en células de adenocarcinoma ductal de páncreas tras el tratamiento con los compuestos que habían resultado ser citotóxicos en experimentos anteriores (Figura R3.2.3.1 y R3.2.3.2), vuelven a destacar los compuestos C13 y C15 como los compuestos con más capacidad de disminuir la migración celular, logrando en el caso del C13 bloquear casi totalmente ese avance celular. Además de verse afectado también, tanto el tamaño de las células como la degradación de las mismas tras su tratamiento con dichos compuestos, sobre todo en el caso del compuesto C13. Estos resultados sugieren que los compuestos C13 y C15 son capaces de mantener las interacciones célula-célula, que evitan la migración celular y la propagación de las mismas a otros órganos o tejidos, por lo que podríamos afirmar que estos compuestos tienen cierta acción anti-metastática en células de adenocarcinoma ductal de páncreas.

### **3.2.4 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE COLONIAS EN SOFT AGAR**

La capacidad de una célula de crecer sin anclarse a ninguna superficie sólida es una capacidad propia de las células transformadas o células tumorales, ausente en células sanas, y que está íntimamente relacionado con la carcinogénesis. El ensayo de formación de colonias en soft agar estudia esta capacidad *in vitro* y se considera uno de los experimentos más estrictos para evaluar la transformación maligna de las células tumorales. Además, permite la evaluación semicuantitativa de esta capacidad tras someter a las células a un tratamiento antineoplásico (Borowicz et al., 2014). La idea de estudiar el efecto de un compuesto nuevo o unas condiciones determinadas, en esta capacidad de crecer de manera aislada de las células tumorales, ya había sido utilizada con anterioridad en varios trabajos, como en el de Horibata et al. (Horibata *et al.*, 2015), donde se utilizaba esta técnica para evaluar el efecto en la proliferación y migración celular de un nuevo inhibidor para el cáncer de mama, además de en otros estudios.

## DISCUSIÓN

Al aplicar esta técnica a nuestros compuestos, queda demostrado como la capacidad de las células transformadas de formar colonias sin anclarse a ninguna superficie sólida, disminuye al tratar las células con la mayoría de los compuestos, destacando de nuevo los compuestos C13 y C15 como los compuestos que más bloquean esta capacidad de las células tumorales. Esto se produce incluso a bajas concentraciones, observándose un número de colonias formadas de prácticamente cero. Se puede afirmar, por tanto, que estos compuestos disminuyen la capacidad tumorigénica de las células de adenocarcinoma ductal de páncreas.

Teniendo en cuenta estos dos últimos puntos del trabajo, se confirma que, al menos en el caso de los compuestos C13 y C15, aparte de ser capaces de interactuar con la proteína NUPR1 tanto a nivel extracelular como intracelular y bloquear la interacción de la proteína con alguno de sus ligandos biológicos (MSL1), son capaces de bloquear o reducir alguna de las propiedades protumorales que lleva a cabo la proteína NUPR1 al unirse a sus ligandos biológicos, es decir, que se confirma que serían capaces de bloquear la unión de NUPR1 a dichos ligandos, bloqueando por tanto la interacción proteína-proteína, uno de los objetivos principales de este trabajo.

#### **4. EXPERIMENTOS “IN VIVO” EN ANIMALES MODELO**

Los modelos animales con un xenoinjerto de tumor humano son ampliamente utilizados para llevar a cabo estudios de respuesta preclínicos de nuevas drogas, ya que se trata de animales fáciles de conseguir mediante la implantación de células de tumor humano en ratones inmunodeficientes. Se trata de un escalón más respecto al estudio en líneas celulares y un estado preclínico en el desarrollo de nuevas drogas, aunque con las limitaciones propias del modelo, como las diferencias propias de la especie(Lee et al., 2018)(Kelland, 2004)(Cheon & Orsulic, 2011).

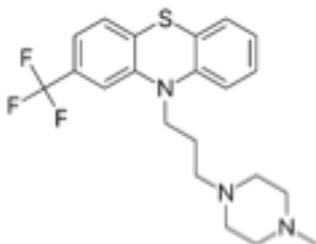
En este trabajo se utilizaron ratones con xenoinjerto de un adenocarcinoma ductal de páncreas humano, generados a partir de la inoculación de células MiaPaca2 a ratones inmunodeprimidos. El tratamiento de estos ratones con el compuesto C15, que era el compuesto que mejores resultados había mostrado en todos los experimentos previos,

## DISCUSIÓN

arrojaron resultados muy prometedores y concluyentes. Los ratones fueron tratados diariamente con el compuesto C15, y se pudo observar como este compuesto es capaz de detener prácticamente el crecimiento del tumor a una concentración de 10 mg/Kg, y de disminuir significativamente su crecimiento a una concentración de 5 mg/Kg (Figura R4.1). Queda demostrado por tanto el impacto biológico del compuesto C15, siendo capaz de detener el crecimiento de un xenoinjerto de adenocarcinoma ductal de páncreas en un ratón inmunodeficiente.

Así pues, según todos los datos obtenidos, el compuesto C15 interfiere la interacción NUPR1-MSL1 provocando la inhibición del crecimiento celular, la migración celular y reduciendo la quimioresistencia imitando una deficiencia en la proteína NUPR1 a nivel celular, y deteniendo el crecimiento de un tumor derivado de células tumorales pancreáticas a nivel animal.

El compuesto C15 es la **TRIFLUOROPERACINA** (C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>S):



La Trifluoroperacina es un antipsicótico y ansiolítico, un antagonista de los receptores de dopamina utilizado en la actualidad para el tratamiento de la esquizofrenia, la psicosis y los trastornos de ansiedad. También está justificado su uso como antiemético.

Estos son los usos tradicionales del fármaco, pero hay también numerosos estudios en los que se relaciona este compuesto con tratamientos contra el cáncer.

Un ejemplo es el estudio llevado a cabo por Chi-Tai Yeh et al. (Yeh et al., 2013). En este trabajo se demuestra como la trifluoroperacina, un antagonista del receptor de dopamina D2 (D2DR), es capaz de inhibir el crecimiento de las células madre tumorales, además de revertir la resistencia a los fármacos de estas células cuando se combina con gefitinib

## DISCUSIÓN

o cisplatino. De hecho han sido descritos también otros antagonistas del receptor de dopamina D2DR utilizados como antipsicóticos, como la tioridacina, como tratamientos efectivos como terapias anticáncer por mostrar inhibición de las células madre tumorales al inducir difenrecciación en las mismas (Sachlos et al., 2012).(Lu et al., 2015).

También ha sido demostrado el efecto de la trifluoroperacina en otras líneas celulares de tumores como en el estudio de Baodong Wang *et al.* donde queda demostrada la actividad inhibitoria del compuesto contra las células mesangiales *in vivo* e *in vitro*, y además asocia este efecto con la detección del ciclo celular en la fase G1 por inactivación de las vías de señalización PI3K/AKT y JNK/MAPK. Estas conclusiones posicionan a la trifluoroperacina como un compuesto eficaz para el tratamiento de procesos proliferativos mesangiales (B. Wang et al., 2017).

Cabe señalar que, en otros estudios, como en el trabajo de Ashleigh Pulkoski-Gross et al (Pulkoski-Gross et al., 2015), se demuestra la capacidad de la trifluoroperacina para bloquear la invasión de líneas celulares de cáncer humano, al reducir su potencial angiogénico e invasivo de dichas células a través del receptor D2 de la dopamina modulado por la vía de la  $\beta$ -catenina (Pulkoski-Gross et al., 2015).

Otro ejemplo de la acción de la trifluoroperacina como compuesto con actividad antitumoral se puede ver en el trabajo de See-Hyoung Park et al. en el que se demuestra la acción conjunta del tratamiento con Bepridil y trifluoroperacina para inhibir la supervivencia de las células triple negativas en el cáncer de mama y suprimir el crecimiento de dichos tumores (Park et al., 2016).

Basándonos en estudios anteriores y en nuestro propio trabajo, podríamos proponer el uso de la trifluoroperacina como fármaco antineoplásico, probablemente en combinación con otros fármacos, en el tratamiento de adenocarcinoma ductal de páncreas.

# **DISCUSSION GENERAL**

### **1. INTEGRACION DE TODOS LOS RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LOS COMPLEJOS NUPR1-COMPUESTOS: BASES MOLECULARES DE LAS REGIONES DE INTERACCIÓN DE NUPR1**

En la primera parte de este trabajo se ha profundizado en la interacción de la proteína NUPR1 con los compuestos C1-C15 a nivel biofísico, llegando a establecerse las posibles bases moleculares de las regiones de interacción de la proteína.

Como conclusión global podemos sugerir que el principal determinante de la interacción de NUPR1 con los distintos compuestos testados es la hidrofobicidad de los residuos, aunque con un mecanismo específico ya que son unos residuos concretos los que interaccionan con los mismos, según los datos obtenidos de RMN. Además, estos residuos de la proteína implicados en la interacción de todos los compuestos, que tienen una conformación parcialmente restringida en solución (aunque no sabemos qué clase de estructura secundaria tienen), son los mismos observados en la interacción de NUPR1 con sus ligandos biológicos, tal y como se demuestra en el caso de la interacción de NUPR1 con MSL1 (Aguado-Llera et al., 2013), por lo que el mecanismo de acción de los compuestos para unirse a NUPR1 podría ser explicado en términos de una competición entre ambos por la misma región hidrofóbica localmente restringida. Esto provocaría una competición entre ambos ligandos, el ligando biológico por un lado y el compuesto ensayado por otro, de manera que la actividad protumoral desarrollada naturalmente en la célula tumoral por la interacción de la proteína con sus ligandos biológicos podría ser regulada en caso de producirse la interacción de la proteína con los compuestos y bloquearse la interacción biológica.

Las afinidades entre NUPR1 y los compuestos también resultaron ser del orden de las constantes de afinidad de sus ligandos biológicos ( $\mu\text{M}$ ), lo que refuerza la idea de un mecanismo competitivo entre ambos tipos de ligandos. Además, el rango de estas constantes de afinidad coincide con el orden de afinidad de interacciones de otras proteínas intrínsecamente desestructuradas o IDPs. A su vez, los experimentos de ITC y RMN llevados a cabo sugieren también que el complejo resultante en todos los casos es un complejo “difuso” o “fuzzy”, sin una estructura muy definida, y que dichas regiones desordenadas facilitan la unión, en contraste con hallazgos experimentales recientes en los que las regiones “fuzzy” parecen obstaculizar la unión (Gruet et al., 2016). En los

## DISCUSIÓN GENERAL

experimentos de ITC, la gran contribución de la entropía frente a la contribución de la entalpía en la energía libre de Gibbs refleja un alto grado de desorden debido a la desolvatación de las superficies hidrofóbicas frente a un pequeño aumento del orden por la formación del compuesto, lo que refuerza la idea de los complejos desordenados resultantes.

Por lo tanto, los compuestos ensayados se unen, guiados por interacciones principalmente hidrofóbicas, a los mismos residuos de la proteína NUPR1 y con la misma afinidad que los ligandos biológicos, resultando en ambos casos un complejo “*fuzzy*” o difuso.

Además, las simulaciones de dinámica molecular muestran que las regiones más cercanas al residuo clave Thr68 son Leu37 y Gln31, que son adyacentes a Tyr36 y Tyr30 (los únicos residuos fluorescentes en NUPR1), por lo que los datos obtenidos en la simulación podrían explicar los cambios en los espectros de fluorescencia de NUPR1 observados experimentalmente tras la adición de los compuestos. Ambas Tyr están también involucradas en la interacción de NUPR1 a otro de sus ligandos biológicos, la protimosina- $\alpha$  (Malicet, Giroux, et al., 2006b), y estudios previos de dinámica molecular muestran también su papel, junto con regiones vecinas, en la interacción con el DNA (Urrutia et al., 2014).

Podríamos pensar en este punto que moléculas más grandes con alta hidrofobicidad, podrían estar más involucradas en las regiones de interacción de NUPR1 cerca de Thr68 y alrededor de los residuos 28-38, por lo que podrían resultar mejores para unirse a la proteína y bloquear su acción protumoral dentro de la célula.

Cabe mencionar a su vez, que trabajos previos sobre el diseño de pequeñas drogas contra otras IDPs, posiciona también a las interacciones hidrofóbicas como las principales responsables de la interacción, y, como ocurre en el caso de NUPR1, los aminoácidos aromáticos parecen ser de vital importancia en la interacción (Iconaru et al., 2015).

### **2. NUEVA ESTRATEGIA QUE PERMITE DIRIGIR COMPUESTOS CONTRA IDPs QUE PERMANECEN DESORDENADAS TRAS UNIRSE A SUS LIGANDOS BIOLÓGICOS**

En este trabajo, se ha desarrollado una aproximación útil para la identificación y la caracterización de ligandos o drogas que interaccionen con proteínas intrínsecamente desestructuradas (IDPs). Esta aproximación está basada en una combinación de técnicas biofísicas, cálculos *in silico* y estudios *in vivo* en células y organismos más complejos. Dado que la proteína NUPR1 permanece desordenada tras la unión a MSL1 (Aguado-Llera et al., 2013) y DNA (Encinar, Mallo, Mizyrycki, Giono, Gonzalez-Ros, et al., 2001) formando compuestos desordenados o “fuzzy” con estas biomoléculas, nuestra hipótesis de partida fue que esta capacidad de NUPR1 para formar complejos difusos con otras biomoléculas, le conferiría la capacidad de unirse a moléculas pequeñas formando complejos con un grado similar de desorden.

La principal conclusión de nuestro trabajo fue la identificación de un compuesto, el compuesto C15 o trifluoperacina, capaz de actuar frente al adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC). Además de la eficacia y especificidad mostrada por el compuesto de forma aislada, este nuevo compuesto ha demostrado ser útil también en combinación con fármacos antitumorales usados actualmente en el tratamiento del cáncer de páncreas, como el Oxaliplatino y la Gemcitabina.

Pero de manera más general, hemos demostrado que es posible la identificación de compuestos de bajo peso molecular que interaccionen con proteínas intrínsecamente desestructuradas (IDPs), bloqueando la interacción de las mismas con otras proteínas, lo que supone el bloqueo de las interacciones proteína-proteína (IPPs) en una IDP. Así, hemos demostrado que las interfaces desordenadas entre IDPs son “dianas farmacológicas”, eligiendo para demostrarlo a la proteína NUPR1, una IDP implicada en varias vías de señalización en células tumorales.

El diseño de fármacos de bajo peso molecular para inhibir las interacciones proteína-proteína (IPPs) en las proteínas intrínsecamente desestructuradas plantea varios retos, como se ha comentado al inicio. Por un lado, no existen estructuras proteicas bien definidas para la modelización molecular y el desarrollo basado en estructuras; por otro, grandes interfaces de las uniones proteína-proteína deben ser bloqueadas por pequeñas

## DISCUSIÓN GENERAL

interfaces de interacción con las pequeñas moléculas ensayadas; y por último, la gran cantidad de interfaces de interacción proteína-proteína que es necesario inhibir, ya que las proteínas intrínsecamente desestructuradas suelen participar en numerosas interacciones biomoleculares.

Hasta ahora se han considerado tres enfoques en el desarrollo de fármacos contra las IDP. El primero explota el hecho de que las IPP en las que intervienen IDP pueden modularse mediante compuestos orgánicos, ya que una IDP experimenta, en casi todos los casos, una transición de desorden a orden al unirse a su ligando, normalmente ordenado (Cheng et al., 2006; Iconaru et al., 2015); Por lo tanto, en estos casos, el compuesto orgánico se diseña contra la interfaz del complejo totalmente estructurado, y compite por la misma superficie de interacción que la pareja proteica natural.

El segundo enfoque se centra en estabilizar la conformación desplegada de la IDP, por lo que el compuesto se une y desplaza el equilibrio conformacional hacia la especie desplegada (Follis et al.,; Hammoudeh et al., 2009)

Y en el tercer enfoque, se selecciona una molécula pequeña para que se una a la región reguladora desordenada específica de una proteína bien plegada e inhiba la enzima a través de un mecanismo alostérico (Krishnan et al., 2014).

Teniendo en cuenta que, en este trabajo, el ligando natural considerado para NUPR1 es MSL1, que es también una IDP y que, curiosamente, ambos interactúan guardando sus conformaciones desordenadas (Aguado-Llera et al., 2013) se ha desarrollado un cuarto enfoque para el diseño de fármacos contra IDPs que incluye algunas características de los métodos anteriores: una molécula pequeña forma un "complejo difuso" con la diana IDP y compite por la misma región polipeptídica, como lo hace el ligando biológico de una IDP.

El impacto biológico final del compuesto descubierto, la trifluoroperacina, es indiscutible, ya que es capaz de disminuir el crecimiento de un tumor derivado de células de adenocarcinoma ductal de páncreas humano en un modelo de ratón. Esto demuestra que nuestra estrategia para identificar compuestos de unión a NUPR1 es correcta. Sin embargo, aunque la trifluoroperacina ha sido seleccionada correctamente como ligando que interacciona con NUPR1 mediante la aplicación rigurosa de herramientas tanto biofísicas como computacionales, no podemos obviar que su actividad biológica aquí

## DISCUSIÓN GENERAL

descrita podría depender también de la unión a otros ligandos diferentes a NUPR1 tal y como queda reflejado en la Figura R3.2.1.5, donde se ve que una parte de la actividad citotóxica de este compuesto es independiente de la proteína NUPR1. Esto coincide con la capacidad que tiene este compuesto de afectar a diversas vías tumorales (Wu et al., 2016). Creemos que debido a la dificultad inherente de demostrar la interacción de una molécula pequeña con una proteína poco poblada en su conformación plegada (ya sea *in vitro* o en la célula), los ensayos fenotípicos celulares o *in vivo* diseñados apropiadamente para evaluar la actividad biológica son un paso clave para detectar la interacción entre el compuesto y su proteína diana.

# **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

En este trabajo se indagó en el descubrimiento de nuevos fármacos contra la proteína intrínsecamente desordenada (IPD), NUPR1, proteína clave en el adenocarcinoma ductal de páncreas, mediante el uso de distintas técnicas biofísicas, cálculos *in silico*, y estudios *in vivo* en células y organismos más complejos. Los resultados obtenidos se pueden resumir en las siguientes conclusiones.

1. El cribado de alto rendimiento (*High Throughput Screening*: HTS), basado en la variación del perfil de desnaturalización térmica de la proteína NUPR1 en presencia del compuesto respecto al perfil de desnaturalización térmica de la proteína libre, implica que el compuesto ha inducido un efecto estabilizador en la proteína formando un complejo con ella, por lo que resulta ser un método eficaz para la selección de pequeñas moléculas que interaccionen con la IDP NUPR1.
2. La mayoría de los compuestos ensayados se unen, guiados por interacciones principalmente hidrofóbicas a los mismos residuos de la proteína NUPR1, los residuos Ala33 y Thr68 (tratándose por tanto de interacciones específicas), y con la misma afinidad que sus ligandos biológicos (del orden de  $\mu\text{M}$ ), lo que sugiere un mecanismo de reacción basado en la competitividad entre compuesto y ligando biológico.
3. Los complejos resultantes de la interacción de proteína NUPR1 con el compuesto son, al igual que los complejos biológicos de la proteína, complejos difusos o complejos “fuzzy” sin estructura secundaria definida, siendo los efectos observados en la desnaturalización térmica de los experimentos de HTS iniciales debidos a cierto plegamiento de la proteína tras la interacción con el compuesto, pero que deben ser locales y restrictivos a regiones concretas de la proteína.
4. Algunos de los compuestos seleccionados interaccionan con la proteína NUPR1 a nivel intracelular provocando la inhibición de la interacción de ésta con su ligando biológico MSL1, lo que consigue anular alguna de las propiedades protumorales de la proteína en la célula tumoral relacionadas con la formación de metástasis y la carcinogénesis.
5. Se ha logrado identificar un compuesto, la Trifluoperacina, capaz de actuar frente al adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC), tanto de forma aislada, como combinados para mejora la sensibilidad de las células tumorales pancreáticas a los tratamientos

## CONCLUSIONES

antineoplásicos utilizados actualmente en la práctica clínica como son el Oxaliplatino y la Gemcitabina.

**6.** La Trifluoroperacina interfiere en la interacción NUPR1-MSL1 provocando la inhibición del crecimiento celular, la migración celular y reduciendo la quimioresistencia, imitando una deficiencia en la proteína NUPR1 a nivel celular, y deteniendo el crecimiento de un tumor derivado de células tumorales pancreáticas a nivel animal.

**7.** Tomando como base la estructura del compuesto identificado será posible estudiar, diseñar y desarrollar nuevas moléculas químicas con el objetivo mejorar sus características farmacológicas (eficacia, especificidad y toxicidad).

**8.** De manera general, se ha desarrollado una estrategia para la identificación y caracterización de drogas que interaccionen con una proteína intrínsecamente desestructurada, bloqueando la interacción de las mismas con otras proteínas, lo que supone el bloqueo de las interacciones proteína-proteína de una IDP, y demostrando por tanto que las interfaces desordenadas entre las IDPs, tienen un interesante potencial como “dianas farmacológicas”.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Abian, O., Vega, S., Sancho, J., & Velazquez-Campoy, A. (2013). Allosteric Inhibitors of the NS3 Protease from the Hepatitis C Virus. *PLoS ONE*, 8(7).
- Aguado-Llera, D., Hamidi, T., Doménech, R., Pantoja-Uceda, D., Gironella, M., Santoro, J., Velázquez-Campoy, A., Neira, J. L., & Iovanna, J. L. (2013b). Deciphering the binding between Nupr1 and MSL1 and their DNA-repairing activity. *PLoS One*, 8(10), e78101.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 Suppl 1(SUPPL. 1), 5–16.
- Ashenden, S. K. (2018). Screening Library Design. *Methods in Enzymology*, 610, 73–96.
- Badea MG, Brand L. Time-resolved fluorescence measurements. *Methods Enzymol.* 1979;61:378-425. doi: 10.1016/0076-6879(79)61019-4
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Van Gunsteren, W. F., Dinola, A., & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics*, 81(8), 3684–3690.
- Behrens J. The role of cell adhesion molecules in cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 1993;24(3):175-84.
- Bodenhausen, G., & Ruben, D. J. (1980). Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 69(1), 185–189.
- Borowicz, S., van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, M. K., Tauler, J., Bikkavilli, R. K., & Winn, R. A. (2014). The Soft Agar Colony Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 92, 51998.
- Cano, C. E., & Iovanna, J. L. (2010). Stress Proteins and Pancreatic Cancer Metastasis. *The Scientific World JOURNAL*, 10, 1958–1966.
- Celej MS, Montich GG, Fidelio GD. Protein stability induced by ligand binding correlates with changes in protein flexibility. *Protein Sci.* 2003 Jul;12(7):1496-506.
- Carnero, A. (2006). High throughput screening in drug discovery. *Clinical & Translational Oncology : Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 8(7), 482–490.
- Chang, J. C., & Kundranda, M. (2017). Novel Diagnostic and Predictive Biomarkers in Pancreatic Adenocarcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 667.
- Chatterjee, S., & Burns, T. F. (2017). Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *International Journal of Molecular Sciences 2017, Vol. 18, Page 1978*, 18(9), 1978.
- Chen, C. Y.-C., & Tou, W. I. (2013). How to design a drug for the disordered proteins? *Drug Discovery Today*, 18(19–20), 910–915.
- Chen M, Xie S. Therapeutic targeting of cellular stress responses in cancer. *Thorac Cancer.* 2018 Dec;9(12):1575-1582. doi: 10.1111/1759-7714.12890.
- Cheng, Y., LeGall, T., Oldfield, C. J., Mueller, J. P., Van, Y. Y. J., Romero, P., Cortese, M. S., Uversky, V. N., & Dunker, A. K. (2006). Rational drug design via intrinsically disordered protein. *Trends in Biotechnology*, 24(10), 435–442.

## BIBLIOGRAFÍA

- Cheon, D. J., & Orsulic, S. (2011). Mouse Models of Cancer. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev.Pathol.3.121806.154244*, 6, 95–119.
- Choi, S. H., Mahankali, M., Lee, S. J., Hull, M., Petrassi, H. M., Chatterjee, A. K., Schultz, P. G., Jones, K. A., & Shen, W. (2017). Targeted Disruption of Myc-Max Oncoprotein Complex by a Small Molecule. *ACS Chemical Biology*, 12(11), 2715–2719.
- Cilia, E., Pancsa, R., Tompa, P., Lenaerts, T., & Vranken, W. F. (2013). From protein sequence to dynamics and disorder with DynaMine. *Nature Communications*, 4.
- Cilia, E., Pancsa, R., Tompa, P., Lenaerts, T., & Vranken, W. F. (2014). The DynaMine webserver: predicting protein dynamics from sequence. *Nucleic Acids Research*, 42(Web Server issue), W264.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.-L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., Bennouna, J., Bachet, J.-B., Khemissa-Akouz, F., Péré-Vergé, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., PRODIGE Intergroup. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 364(19), 1817–1825.
- Cooper, A., & Johnson, C. M. (1994). Isothermal titration microcalorimetry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 22, 137–150.
- Courjal, F., research, C. T.-C., & 1997, undefined. (1997). Comparative genomic hybridization analysis of breast tumors with predetermined profiles of DNA amplification. *AACR*.
- Cremades, N., Velázquez-Campoy, A., Martínez-Júlvez, M., Neira, J. L., Pérez-Dorado, I., Hermoso, J., Jiménez, P., Lanás, A., Hoffman, P. S., & Sancho, J. (2009). Discovery of specific flavodoxin inhibitors as potential therapeutic agents against *Helicobacter pylori* infection. *ACS Chemical Biology*, 4(11), 928–938.
- Czypionka, A., De Los Paños, O. R., Mateu, M. G., Barrera, F. N., Hurtado-Gómez, E., Gómez, J., Vidal, M., & Neira, J. L. (2007). The isolated C-terminal domain of ring 1B is a dimer made of stable, well-structured monomers. *Biochemistry*, 46(44), 12764–12776.
- Das, R. K., & Pappu, R. V. (2013). Conformations of intrinsically disordered proteins are influenced by linear sequence distributions of oppositely charged residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(33), 13392–13397.
- Disfani, F. M., Hsu, W. L., Mizianty, M. J., Oldfield, C. J., Xue, B., Keith Dunker, A., Uversky, V. N., & Kurgan, L. (2012). MoRFPred, a computational tool for sequence-based prediction and characterization of short disorder-to-order transitioning binding regions in proteins. *Bioinformatics*, 28(12), i75.
- Dosztányi, Z., Mészáros, B., & Simon, I. (2009). ANCHOR: web server for predicting protein binding regions in disordered proteins. *Bioinformatics*, 25(20), 2745.
- Downing, K. H. (2000). Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), 89–111.
- Dyson, H. J., & Wright, P. E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(3), 197–208.
- Encinar, J. A., Mallo, G. v, Mizyrycki, C., Giono, L., Gonzalez-Ros, J. M., Rico, M., Cánepa, E., Moreno, S., Neira, J. L., & Iovanna, J. L. (2001). Human p8 is a HMG-I/Y-like protein with DNA binding activity enhanced by phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2742–2751.

## BIBLIOGRAFÍA

- Entzeroth, M., Flotow, H., & Condrón, P. (2009). Overview of High-Throughput Screening. *Current Protocols in Pharmacology*, 44(1), 9.4.1-9.4.27.
- Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., & Pedersen, L. G. (1995). A smooth particle mesh Ewald method. *The Journal of Chemical Physics*, 103(19), 8577–8593.
- Evoli, S., Guzzi, R., & Rizzuti, B. (2014). Molecular simulations of  $\beta$ -lactoglobulin complexed with fatty acids reveal the structural basis of ligand affinity to internal and possible external binding sites. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 82(10), 2609–2619.
- Feig, C., Gopinathan, A., Neesse, A., Chan, D. S., Cook, N., & Tuveson, D. A. (2012). The Pancreas Cancer Microenvironment. *Clinical Cancer Research*, 18(16), 4266–4276.
- Feldmann, G., Beaty, R., Hruban, R. H., & Maitra, A. (2007). Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 14(3), 224–232.
- Follis, A. V., Hammoudeh, D. I., Wang, H., Prochownik, E. v., & Metallo, S. J. (2008). Structural Rationale for the Coupled Binding and Unfolding of the c-Myc Oncoprotein by Small Molecules. *Chemistry and Biology*, 15(11), 1149–1155.
- Garci, C., Vasseur, S., Giono, L. E., Canepa, E., Moreno, S., Charles DAGORN, J., & Lucio IOVANNA, J. (2001). Transforming growth factor  $\beta$ -1 enhances Smad transcriptional activity through activation of p8 gene expression. *Portlandpress.Com*, 357, 249–253.
- Gianni, S., Dogan, J., & Jemth, P. (2014). Distinguishing induced fit from conformational selection. *Biophysical Chemistry*, 189, 33–39.
- Gironella, M., Malicet, C., Cano, C., Sandi, M. J., Hamidi, T., Tauil, R. M. N., Baston, M., Valaco, P., Moreno, S., Lopez, F., Neira, J. L., Dagorn, J. C., & Iovanna, J. L. (2009). p8/nupr1 regulates DNA-repair activity after double-strand gamma irradiation-induced DNA damage. *Journal of Cellular Physiology*, 221(3), 594–602.
- Giroux, V., Malicet, C., Barthet, M., Gironella, M., Archange, C., Dagorn, J. C., Vasseur, S., & Iovanna, J. L. (2006). p8 Is a New Target of Gemcitabine in Pancreatic Cancer Cells. *Clinical Cancer Research*, 12(1), 235–241.
- Goruppi, S., & Iovanna, J. L. (2010). Stress-inducible protein p8 is involved in several physiological and pathological processes. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 285, Issue 3, pp. 1577–1581). J Biol Chem.
- Goruppi, S., & Kyriakis, J. M. (2004). The pro-hypertrophic basic helix-loop-helix protein p8 is degraded by the ubiquitin/proteasome system in a protein kinase B/Akt- and glycogen synthase kinase-3-dependent manner, whereas endothelin induction of p8 mRNA and renal mesangial cell hypertrophy require NFAT4. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 20950–20958.
- Goruppi, S., Patten, R. D., Force, T., & Kyriakis, J. M. (2007a). Helix-Loop-Helix Protein p8, a Transcriptional Regulator Required for Cardiomyocyte Hypertrophy and Cardiac Fibroblast Matrix Metalloprotease Induction. *Molecular and Cellular Biology*, 27(3), 993–1006.
- Grasso, D., Garcia, M. N., Hamidi, T., Cano, C., Calvo, E., Lomberk, G., Urrutia, R., & Iovanna, J. L. (2014). Genetic inactivation of the pancreatitis-inducible gene Nupr1 impairs PanIN formation by modulating KrasG12D-induced senescence. *Cell Death and Differentiation*, 21(10), 1633.

## BIBLIOGRAFÍA

- Gruet, A., Dosnon, M., Blocquel, D., Brunel, J., Gerlier, D., Das, R. K., Bonetti, D., Gianni, S., Fuxreiter, M., Longhi, S., & Bignon, C. (2016). Fuzzy regions in an intrinsically disordered protein impair protein-protein interactions. *FEBS Journal*, 283(4), 576–594.
- Güngör, C., Hofmann, B. T., Wolters-Eisfeld, G., & Bockhorn, M. (2014). Pancreatic cancer. *British Journal of Pharmacology*, 171(4), 849–858.
- Hamidi, T., Algül, H., Cano, C. E., Sandi, M. J., Molejon, M. I., Riemann, M., Calvo, E. L., Lomberk, G., Dagorn, J. C., Weih, F., Urrutia, R., Schmid, R. M., & Iovanna, J. L. (2012). Nuclear protein 1 promotes pancreatic cancer development and protects cells from stress by inhibiting apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(6), 2092.
- Hammoudeh, D. I., Follis, A. V., Prochownik, E. v., & Metallo, S. J. (2009). Multiple independent binding sites for small-molecule inhibitors on the oncoprotein c-Myc. *Journal of the American Chemical Society*, 131(21), 7390–7401.
- Hidalgo, M. (2010). Pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, 362(17), 1605–1617.
- Hoffmeister, A., Ropolo, A., Vasseur, S., ... G. M.-J. of biological, & 2002, undefined. (n.d.). The HMG-I/Y-related Protein p8 Binds to p300 and Pax2trans-Activation Domain-interacting Protein to Regulate thetrans-Activation Activity of the Pax2A and. *ASBMB*.
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38.
- Iconaru, L. I., Ban, D., Bharatham, K., Ramanathan, A., Zhang, W., Shelat, A. A., Zuo, J., & Kriwacki, R. W. (2015). Discovery of small molecules that inhibit the disordered protein, p27 Kip1. *Scientific Reports*, 5.
- Imming, P., Sinning, C., & Meyer, A. (2006). Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(10), 821–834.
- Iovanna, J., Mallmann, M. C., Gonçalves, A., Turrini, O., & Dagorn, J.-C. (2012). Current knowledge on pancreatic cancer. *Frontiers in Oncology*, 2, 6.
- Ishida, T., & Kinoshita, K. (2007). PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server issue), W460.
- Jacobsen, L. B., Calvin, S. A., Colvin, K. E., & Wright, M. J. (2004). FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods*, 33(2), 104–112.
- Jego, G., Hazoumé, A., Seigneuric, R., letters, C. G.-C., & 2013, undefined. (n.d.). Targeting heat shock proteins in cancer. *Elsevier*.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90.
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., Hong, S.-M., Fu, B., Lin, M.-T., Calhoun, E. S., Kamiyama, M., Walter, K., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Hartigan, J., ... Kinzler, K. W. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5897), 1801–1806.
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926–935.

## BIBLIOGRAFÍA

- Kelland, L. R. (2004). "Of mice and men": Values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *European Journal of Cancer*, 40(6), 827–836.
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., & Bajorath, J. (2004). Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 3(11), 935–949.
- Krishnan, N., Koveal, D., Miller, D. H., Xue, B., Akshinthala, S. D., Kragelj, J., Jensen, M. R., Gauss, C. M., Page, R., Blackledge, M., Muthuswamy, S. K., Peti, W., & Tonks, N. K. (2014). Targeting the disordered C terminus of PTP1B with an allosteric inhibitor. *Nature Chemical Biology*, 10(7), 558–566.
- Kornmann M, Fakler H, Butzer U, Beger HG, Link KH. Oxaliplatin exerts potent in vitro cytotoxicity in colorectal and pancreatic cancer cell lines and liver metastases. *Anticancer Res.* 2000 Sep-Oct;20(5A):3259-64.
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105–132.
- Lakowicz, J. R. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2nd Ed. Plenum Press, Nueva York
- Lee, N. P., Chan, C. M., Tung, L. N., Wang, H. K., & Law, S. (2018). Tumor xenograft animal models for esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Biomedical Science*, 25(1).
- Lengauer, T., & Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology*, 6(3), 402–406.
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O., & Shaw, D. E. (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 78(8), 1950–1958.
- Liu, Z., & Huang, Y. (2014). Advantages of proteins being disordered. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 23(5), 539–550.
- Lu, M., Li, J., Luo, Z., Zhang, S., Xue, S., Wang, K., Shi, Y., Zhang, C., Chen, H., & Li, Z. (2015). Roles of dopamine receptors and their antagonist thioridazine in hepatoma metastasis. *OncoTargets and Therapy*, 8, 1543.
- MacArron, R., Banks, M. N., Bojanic, D., Burns, D. J., Cirovic, D. A., Garyantes, T., Green, D. V. S., Hertzberg, R. P., Janzen, W. P., Paslay, J. W., Schopfer, U., & Sittampalam, G. S. (2011). Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nature Reviews Drug Discovery* 2011 10:3, 10(3), 188–195.
- Malicet, C., Dagorn, J. C., Neira, J. L., & Iovanna, J. L. (2006). p8 and Prothymosin Alpha : Unity is Strength.
- Malicet, C., Giroux, V., Vasseur, S., Dagorn, J. C., Neira, J. L., & Iovanna, J. L. (2006a). Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin  $\alpha$  complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2671–2676.
- Mallo, G. v, Fiedler, F., Calvo, E. L., Ortiz, E. M., Vasseur, S., Keim, V., Morisset, J., & Iovanna, J. L. (1997). Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32360–32369.
- Mao, A. H., Crick, S. L., Vitalis, A., Chicoine, C. L., & Pappu, R. v. (2010). Net charge per residue modulates conformational ensembles of intrinsically disordered proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18), 8183–8188.

## BIBLIOGRAFÍA

- McCleary-Wheeler, A. L., Lomberk, G. A., Weiss, F. U., Schneider, G., Fabbri, M., Poshusta, T. L., Dusetti, N. J., Baumgart, S., Iovanna, J. L., Ellenrieder, V., Urrutia, R., & Fernandez-Zapico, M. E. (2013). Insights into the epigenetic mechanisms controlling pancreatic carcinogenesis. *Cancer Letters*, 328(2), 212–221.
- Mcguffin, L. J. (2008). Intrinsic disorder prediction from the analysis of multiple protein fold recognition models. *Bioinformatics*, 24(16), 1798–1804.
- McPherson, K. S., & Korzhnev, D. M. (2021). Targeting protein–protein interactions in the DNA damage response pathways for cancer chemotherapy. *RSC Chemical Biology*, 2(4), 1167.
- Mészáros, B., Simon, I., & Dosztányi, Z. (2009). Prediction of Protein Binding Regions in Disordered Proteins. *PLOS Computational Biology*, 5(5), e1000376.
- Metallo, S. J. (2010). Intrinsically disordered proteins are potential drug targets. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14(4), 481.
- Mimeault, M., & Batra, S. K. (2010a). New promising drug targets in cancer- and metastasis-initiating cells. *Drug Discovery Today*, 15(9–10), 354.
- Mimeault, M., & Batra, S. K. (2010b). Novel Therapies Against Aggressive and Recurrent Epithelial Cancers by Molecular Targeting Tumor- and Metastasis-Initiating Cells and Their Progenies. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10(2), 137.
- Mini, E., Nobili, S., Caciagli, B., Landini, I., & Mazzei, T. (2005). Cellular pharmacology of gemcitabine. *Gemcitabine: Ten Years of Clinical Experience., 19-21 September, 2005: Monastier Di Treviso, Italy*, 17, v7–v12.
- Mishra, K. P., Ganju, L., Sairam, M., Banerjee, P. K., & Sawhney, R. C. (2008). A review of high throughput technology for the screening of natural products. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(2), 94–98.
- Mohammed, S., van Buren, G., & Fisher, W. E. (2014). Pancreatic cancer: Advances in treatment. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(28), 9354.
- Mustata, G., Follis, A. V., Hammoudeh, D. I., Metallo, S. J., Wang, H., Prochownik, E. v., Lazo, J. S., & Bahar, I. (2009). Discovery of Novel Myc-Max Heterodimer Disruptors with a 3-Dimensional Pharmacophore Model. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(5), 1247.
- Neira, J. L., Rizzuti, B., & Iovanna, J. L. (2016). Determinants of the pKa values of ionizable residues in an intrinsically disordered protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 598, 18–27.
- Neureiter, D., Jäger, T., Ocker, M., & Kiesslich, T. (2014). Epigenetics and pancreatic cancer: Pathophysiology and novel treatment aspects. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(24), 7830.
- Pantusa, M., Bartucci, R., & Rizzuti, B. (2014). Stability of trans -resveratrol associated with transport proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(19), 4384–4391.
- Park, S. H., Chung, Y. M., Ma, J., Yang, Q., Berek, J. S., & Hu, M. C. T. (2016). Pharmacological activation of FOXO3 suppresses triple-negative breast cancer in vitro and in vivo. *Oncotarget*, 7(27), 42110.
- Path, G., Opel, A., Knoll, A., Diabetes, J. S.-, & 2004, undefined. (2004). Nuclear protein p8 is associated with glucose-induced pancreatic  $\beta$ -cell growth. *Am Diabetes Assoc*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.
- Pey, A. L., Ying, M., Cremades, N., Velazquez-Campoy, A., Scherer, T., Thöny, B., Sancho, J., & Martinez, A. (2008). Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *Journal of Clinical Investigation*, 118(8), 2858–2867.
- Pierce, M. M., Raman, C. S., & Nall, B. T. (1999). Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 19(2), 213–221.
- Pronk, S., Páll, S., Schulz, R., Larsson, P., Bjelkmar, P., Apostolov, R., Shirts, M. R., Smith, J. C., Kasson, P. M., Van Der Spoel, D., Hess, B., & Lindahl, E. (2013). GROMACS 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics*, 29(7), 845–854.
- Pulkoski-Gross, A., Li, J., Zheng, C., Li, Y., Ouyang, N., Rigas, B., Zucker, S., & Cao, J. (2015). Repurposing the Antipsychotic Trifluoperazine as an Antimetastasis Agent. *Molecular Pharmacology*, 87(3), 501–512.
- Ree, A. H., Pacheco, M. M., Tvermyr, M., Fodstad, O., & Brentani, M. M. (2000). Expression of a novel factor, com1, in early tumor progression of breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 6(5), 1778–1783.
- Sachlos, E., Risueño, R. M., Laronde, S., Shapovalova, Z., Lee, J. H., Russell, J., Malig, M., McNicol, J. D., Fiebig-Comyn, A., Graham, M., Levadoux-Martin, M., Lee, J. B., Giacomelli, A. O., Hassell, J. A., Fischer-Russell, D., Trus, M. R., Foley, R., Leber, B., Xenocostas, A., ... Bhatia, M. (2012). Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells. *Cell*, 149(6), 1284–1297.
- Saldívar-González, F., Prieto-Martínez, F. D., & Medina-Franco, J. L. (2017). Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educacion Quimica*, 28(1), 51–58.
- Sandi, M. J., Hamidi, T., Malicet, C., Cano, C., Loncle, C., Pierres, A., Dagorn, J. C., & Iovanna, J. L. (2011a). p8 expression controls pancreatic cancer cell migration, invasion, adhesion, and tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 226(12), 3442–3451.
- Santofimia-Castaño, P., Rizzuti, B., Abián, O., Velázquez-Campoy, A., Iovanna, J. L., & Neira, J. L. (n.d.). Amphipathic helical peptides hamper protein-protein interactions of the intrinsically disordered chromatin nuclear protein 1 (NUPR1). *Elsevier*.
- Santofimia-Castaño, P., Rizzuti, B., Pey, Á. L., Soubeyran, P., Vidal, M., Urrutia, R., Iovanna, J. L., & Neira, J. L. (2017). Intrinsically disordered chromatin protein NUPR1 binds to the C-terminal region of polycomb RING1B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(31), E6332–E6341.
- Santofimia-Castaño, P., Rizzuti, B., Xia, Y., Abian, O., Peng, L., Velázquez-Campoy, A., Neira, J. L., & Iovanna, J. (2020). Targeting intrinsically disordered proteins involved in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(9), 1695–1707.
- Santofimia-Castaño, P., Xia, Y., Peng, L., Velázquez-Campoy, A., Abián, O., Lan, W., Lomberk, G., Urrutia, R., Rizzuti, B., Soubeyran, P., Neira, J. L., & Iovanna, J. (2019). Targeting the Stress-Induced Protein NUPR1 to Treat Pancreatic Adenocarcinoma. *Cells*, 8(11).
- Scarà, S., Bottoni, P., & Scatena, R. (2015). CA 19-9: Biochemical and clinical aspects. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 867, 247–260

## BIBLIOGRAFÍA

- Schmidtke, P., & Barril, X. (2010). Understanding and predicting druggability. A high-throughput method for detection of drug binding sites. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(15), 5858–5867.
- Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas', A. F., & Gilmanshin, R. I. (1991). Study of the “molten globule” intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*, 31(1), 119–128.
- Şener, L. T., Albeniz, G., Dinç, B., & Albeniz, I. (2017). iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(3), 1866.
- Senisterra, G., Chau, I., & Vedadi, M. (2012). Thermal denaturation assays in chemical biology. *Assay and Drug Development Technologies*, 10(2), 128–136.
- Shimizu Y, Kishimoto T, Ohtsuka M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Miyazaki M. CCAAT/enhancer binding protein-beta promotes the survival of intravascular rat pancreatic tumor cells via antiapoptotic effects. *Cancer Sci*. 2007 Nov;98(11):1706-13.
- Su, S. B., Motoo, Y., Iovanna, J. L., Xie, M. J., Mouri, H., Ohtsubo, K., Yamaguchi, Y., Watanabe, H., Okai, T., Matsubara, F., & Sawabu, N. (2001). Expression of p8 in human pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(2), 309–313.
- Tang, K., Zhang, Z., Bai, Z., Ma, X., Guo, W., & Wang, Y. (2011). Enhancement of gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer by co-regulation of dCK and p8 expression. *Oncology Reports*, 25(4), 963–970.
- Tompa, P. (2012). Intrinsically disordered proteins: a 10-year recap. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(12), 509–516.
- Tompa, P., Szász, C., sciences, L. B.-T. in biochemical, & 2005, undefined. (n.d.). Structural disorder throws new light on moonlighting. *Elsevier*.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, NA-NA.
- Ulrich, C. D. (2000). GROWTH FACTORS, RECEPTORS, AND MOLECULAR ALTERATIONS IN PANCREATIC CANCER: Putting It All Together. *Medical Clinics of North America*, 84(3), 697–705.
- Urrutia, R., Velez, G., Lin, M., Lomberk, G., Neira, J. L., & Iovanna, J. (2014). Evidence supporting the existence of a NUPR1-like family of helix-loop-helix chromatin proteins related to, yet distinct from, AT hook-containing HMG proteins. *Journal of Molecular Modeling*, 20(8).
- Uversky, V. N. (2011). Intrinsically disordered proteins from A to Z. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(8), 1090–1103.
- Uversky, V. N. (2013). A decade and a half of protein intrinsic disorder: biology still waits for physics. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 22(6), 693–724.
- Valacco, M. P., Varone, C., Malicet, C., Cánepa, E., Iovanna, J. L., & Moreno, S. (2006). Cell growth-dependent subcellular localization of p8. *Journal of Cellular Biochemistry*, 97(5), 1066–1079.
- Vasseur, S., Folch-Puy, E., Hlouschek, V., ... S. G.-J. of biological, & 2004, undefined. p8 improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti-inflammatory protein pancreatitis-associated protein I. *ASBMB*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Vasseur, S., Hoffmeister, A., Garcia, S., Bagnis, C., Dagorn, J. C., & Iovanna, J. L. (2002). p8 is critical for tumour development induced by rasV12 mutated protein and E1A oncogene. *EMBO Reports*, 3(2), 165.
- Vasseur, S., Vidal Mallo, G., Fiedler, F., Bödeker, H., Cánepa, E., Moreno, S., & Iovanna, J. L. (1999). Cloning and expression of the human p8, a nuclear protein with mitogenic activity. *European Journal of Biochemistry*, 259(3), 670–675.
- Villoutreix BO, Kuenemann MA, Poyet JL, Bruzzoni-Giovanelli H, Labbé C, Lagorce D, Sperandio O, Miteva MA. Drug-Like Protein-Protein Interaction Modulators: Challenges and Opportunities for Drug Discovery and Chemical Biology. *Mol Inform.* 2014 Jun;33(6-7):414-437.
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 378(9791), 607–620.
- VN, U., JR, G., & AL, F. (2000). Why Are “Natively Unfolded” Proteins Unstructured Under Physiologic Conditions? *Proteins*, 41(3).
- Wang, B., Zhou, X., Wang, Y., & Li, R. (2017). Trifluoperazine Inhibits Mesangial Cell Proliferation by Arresting Cell Cycle-Dependent Mechanisms. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 23, 3461.
- Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., & Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, 25(9), 1157–1174.
- Weibrecht, I., Leuchowius, K. J., Clausson, C. M., Conze, T., Jarvius, M., Howell, W. M., Kamali-Moghaddam, M., & Söderberg, O. (2010). Proximity ligation assays: A recent addition to the proteomics toolbox. In *Expert Review of Proteomics* (Vol. 7, Issue 3, pp. 401–409).
- Wells, J. A., & McClendon, C. L. (2007). Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein–protein interfaces. *Nature*, 450(7172), 1001–1009.
- Wilkins, D. K., Grimshaw, S. B., Receveur, V., Dobson, C. M., Jones, J. A., & Smith, L. J. (1999). Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry*, 38(50), 16424–16431.
- Wright, P. E., & Dyson, H. J. (2015). Intrinsically Disordered Proteins in Cellular Signaling and Regulation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(1), 18.
- Wu, C. H., Bai, L. Y., Tsai, M. H., Chu, P. C., Chiu, C. F., Chen, M. Y., Chiu, S. J., Chiang, J. H., & Weng, J. R. (2016). Pharmacological exploitation of the phenothiazine antipsychotics to develop novel antitumor agents—A drug repurposing strategy. *Scientific Reports*, 6.
- Yeh, C. T., Wu, A. T. H., Chang, P. M. H., Chen, K. Y., Yang, C. N., Yang, S. C., Ho, C. C., Chen, C. C., Kuo, Y. L., Lee, P. Y., Liu, Y. W., Yen, C. C., Hsiao, M., Lu, P. J., Lai, J. M., Wang, L. S., Wu, C. H., Chiou, J. F., Yang, P. C., & Huang, C. Y. F. (2013). Trifluoperazine, an Antipsychotic Agent, Inhibits Cancer Stem Cell Growth and Overcomes Drug Resistance of Lung Cancer.
- Zinke, I., Schütz, C. S., Katzenberger, J. D., Bauer, M., & Pankratz, M. J. (2002). Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *The EMBO Journal*, 21(22), 6162–6173.
- Zoete V, Grosdidier A, Michielin O. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. *J Cell Mol Med.* 2009 Feb;13(2):238-48.

