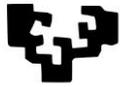
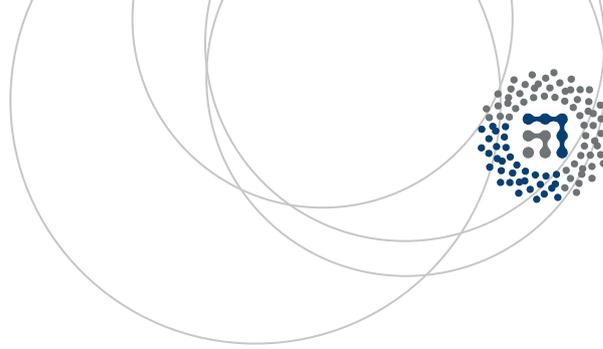


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua / Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Efecto de los *hits* de un cribado HTS en la estructura y función de mutantes de nucleofosmina asociados a leucemia mieloide aguda

Egilea/Autor:
Maria Sendino Mouliet
Zuzendaria/Director/a:
María Ángeles Urbaneja Arrue

1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1. SOBREENPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	5
3.2. MEDIDAS DE FLUORESCENCIA	6
3.3. DICROISMO CIRCULAR (CD)	7
3.4. CALORIMETRÍA DE BARRIDO DIFERENCIAL (DSC)	7
3.5. EFECTO DEL COMPUESTO C1 EN CÉLULAS QUE EXPRESAN NPM1MUTA	8
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
4.1. ANÁLISIS <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO DE C1 EN LA ESTABILIDAD TÉRMICA DEL DOMINIO C-TERMINAL	8
4.2. ANÁLISIS DEL EFECTO DE C1 <i>IN VIVO</i>	13
5. CONCLUSIONES	14
6. BIBLIOGRAFÍA	15

ABREVIATURAS:

AML (leucemia mieloide aguda); BCA (ácido bicineónico); C1 (N-(5-bromo-2-piridinil)-2-metil-5-oxo-7-fenil-4-(2-piridinil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-3-quinolinacarboxamida); CD (dicroísmo circular); Crm1 (exportina1); Ct (carboxilo terminal); ΔC_p (capacidad calorífica); ΔH (variación de la entalpía); DMSO (dimetilsulfóxido); DSC (calorimetría de barrido diferencial); DTT (ditiotreitól); EDTA (ácido etilendiaminotetraacético); GST (glutación S-transferasa); HTS (High throughput screening); IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido); λ (longitud de onda); LB (luria broth); LMB (leptomycin B); NES (señal de exportación nuclear); NLS (señal de localización nuclear); NoLS (señal de localización nucleolar); NPM1, NO38 y B23 (nucleofosmina); mutA (mutante A); OMS (organización mundial de la salud); PES (polietersulfona); PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo); r.p.m. (revoluciones por minuto); SYPRO (SYPRO Orange); t_{50} (tiempo necesario para producir un incremento de la señal del 50%); TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina); TEV (virus del grabado del tabaco); T_m (temperatura media experimental del proceso de desnaturalización de la proteína); tris (tris(hidroximetil)aminometano); WT (salvaje); YFP (proteína amarilla fluorescente).

1. INTRODUCCIÓN

La nucleofosmina (NPM1, B23, NO38 o numatrina) es una proteína abundante en el nucléolo que participa en numerosos procesos de crecimiento celular, como el ensamblaje y transporte de ribosomas al citoplasma^{1,2}. Además, juega un papel fundamental en la regulación de varios supresores tumorales e interviene en la duplicación del centrosoma, así como en la replicación, recombinación, transcripción y reparación del DNA^{1,2}. También se localiza en el citoplasma, donde presenta actividad como chaperona^{1,2}. Para poder cumplir con sus funciones esta proteína se transporta continuamente entre el citoplasma y el núcleo, y del nucleoplasma al nucléolo, para lo que dispone de señales de importación y exportación nuclear, y de retención nucleolar a lo largo de su secuencia¹⁻⁷.

NPM1 adquiere una estructura cuaternaria pentamérica. Cada monómero está compuesto por 294 aminoácidos organizados en tres dominios. El dominio N-terminal o *core* responsable de la oligomerización está formado por los primeros 122 residuos dispuestos en forma de barril β (Figura 1.1) y contiene dos motivos ricos en leucina que sirven como señales de exportación nuclear (NES). A continuación se dispone un *linker* de conformación flexible que contiene la señal de localización nuclear (NLS) y en el extremo C-terminal los últimos 50 residuos se agrupan formando un pequeño núcleo hidrofóbico compuesto por tres α -hélices (Figura 1.2), cuya estructura terciaria genera un dominio de unión nucleolar (NoLS)^{1,2}.

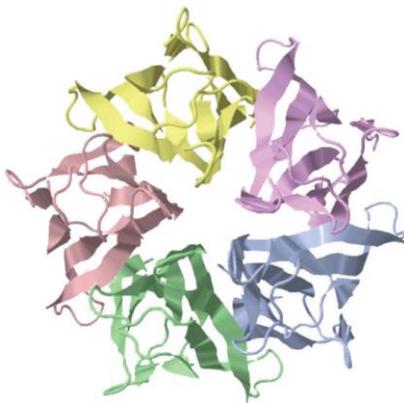


Figura 1.1. Estructura pentamérica del dominio N-terminal NPM1 de *Xenopus laevis*¹.

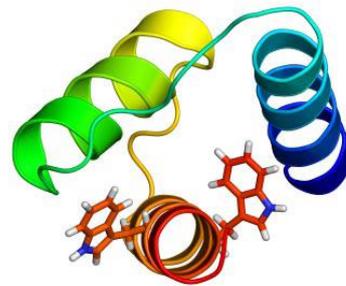


Figura 1.2. Estructura del dominio C-terminal de NPM1 mostrando W288 y W290².

La nucleofosmina, relacionada con diversas patologías tumorales, está sobreexpresada en tumores sólidos de orígenes histológicos diversos⁴ y su gen *NPM1* presenta diversas mutaciones en tumores de origen hematológico^{4,7}, como la leucemia mieloide aguda (AML), en la que aproximadamente el 30% de los pacientes sufre alguna mutación en dicho gen⁶⁻⁸. Se han descrito cerca de 50 variantes mutantes de NPM1 en AML^{1,9}, siendo el más común el

denominado mutante A (NPM1mutA) en el que la inserción de un segmento de 4 nucleótidos (TCTG), conlleva un cambio del marco de lectura y la consiguiente pérdida de los residuos W288 y W290^{6,7} (Figura 1.3) esenciales en el plegamiento del dominio C-terminal y en la unión al nucléolo³.

```

NPM1 :      GATCTCTG . . . GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAA GAAAATAG
            286D L W      Q W R K S L STOP
NPM1mutA:  GATCTCTGTCTGGCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG
            286D L C L A V E E V S L R K STOP
  
```

Figura 1.3. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del segmento del C-terminal salvaje y mutante A. Triptófanos 288 y 290 (verde) y motivo de exportación nuclear generado (rojo)⁶.

Esta mutación genera también un nuevo motivo de exportación nuclear. La adquisición de esta nueva NES favorece la interacción de la nucleofosmina con la exportina Crm1 (Figura 1.4), y por lo tanto la direccionalización y acumulación de la NPM1 mutada en el citoplasma de las células leucémicas^{1,7,9}. El hecho de que los mutantes sean capaces de oligomerizar con NPM1 salvaje provoca que aun siendo mutaciones heterocigóticas NPM1 salvaje también se acumule mayoritariamente en el citoplasma⁵⁻⁷. Esta deslocalización de la NPM1 probablemente perturbe varias vías celulares ya sea por pérdida de funciones en el nucléolo o por ganancia y aparición de nuevas funciones en el citoplasma^{1,2,4,8}. La localización citoplasmática de NPM1 que se da en AML es una característica exclusiva de este tipo de patología lo que ha llevado a la OMS a clasificar la AML con NPM1 mutada como una entidad provisional en la clasificación de tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides^{1,8}.

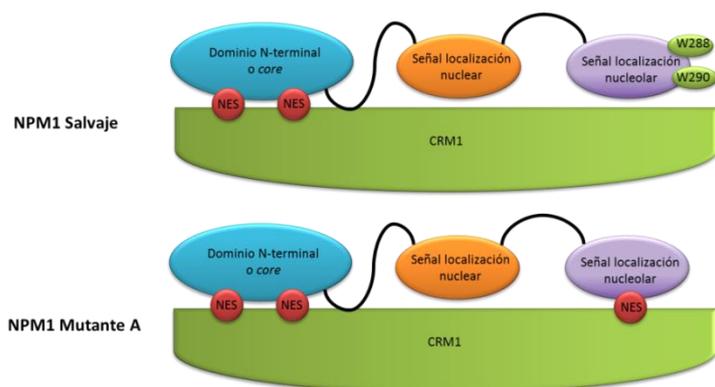


Figura 1.4. El tráfico de NPM1 salvaje está controlado por tres motivos principales; dos NES localizados en el core, una NLS localizada en el linker y una NoLS en la que intervienen W288 y W290. La mutación A implica la pérdida de los triptófanos de la NoLS y la ganancia de una NES adicional que facilita la exportación mediada por Crm1 (figura modificada de Falini B et al 2009)⁵.

Diferentes estudios de mutagénesis han demostrado que el plegamiento del dominio C-terminal está estrechamente ligado a la localización celular de la proteína. Grummitt et al. 2008 demostraron que la sustitución de los residuos F268 y F276, o los residuos W288 y W290 por alaninas impide el plegamiento del dominio y por lo tanto su unión a ácidos nucleicos³. Por otro lado, Falini et al. 2006 comprobaron que tras reinsertar los residuos de triptófano en la

secuencia del mutante, el dominio adquiere un plegamiento similar al de la proteína salvaje y consecuentemente se da la relocalización mayoritaria en el nucléolo⁹. Por tanto, el dominio C-terminal puede considerarse como diana farmacológica en el tratamiento de la AML y la búsqueda de chaperones farmacológicos que estabilicen la conformación plegada de dicho dominio puede abrir una vía para el desarrollo de terapias^{1,5}.

Como primer paso, y en colaboración con el departamento de biomedicina de la Universidad de Bergen (Noruega), se ha realizado un cribado con metodología HTS de una biblioteca de compuestos naturales (MyriaScreen Diversity Collection). Se han identificado 25 compuestos que estabilizan el dominio C-terminal (manuscrito en preparación).

2. OBJETIVOS

Validación del efecto del compuesto N-(5-bromo-2-piridinil)-2-metil-5-oxo-7-fenil-4-(2-piridinil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-3-quinolinacarboxamida (Figura 2.1) (Sigma Aldrich) (el cual a partir de ahora se denominará C1) seleccionado del cribado HTS, analizando la estabilidad térmica en ausencia y presencia de los *hits* seleccionados en el dominio C terminal y en NPM1 de secuencia completa.

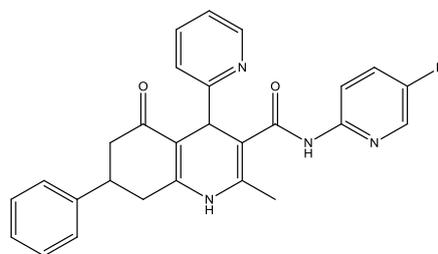


Figura 2.1. N-(5-bromo-2-piridinil)-2-metil-5-oxo-7-fenil-4-(2-piridinil)-1,4,5,6,7,8-hexahidro-3-quinolinacarboxamida

Análisis semicuantitativo de la localización nucleolar y de agregados de nucleofosmina en células HeLa transfectadas con YFP-NPM1 y YFP-NPM1mutA en ausencia y presencia del compuesto citado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sobreexpresión y purificación de proteínas

El inserto con la secuencia deseada (NPM1 salvaje de secuencia completa (NPM1) o los últimos 50 aminoácidos C-terminales de NPM1 salvaje fusionados a GST (NPM1Ct)) fue clonado en el plásmido pET8c-6HTEV, que incluye una etiqueta de histidinas y confiere resistencia a ampicilina. La sobreexpresión de proteína fue llevada a cabo en la cepa de *E. coli* BL21(DE3), para cuya transformación se utilizó el método del choque térmico. Tras mantener en hielo durante 30 min una alícuota de células BL21(DE3) quimiocompetentes y 1 μ L del

plásmido correspondiente, las células se incubaron 90 s a 42°C, seguidos de 2 min en hielo. Las células se incubaron 45 min a 37°C en medio LB sin antibiótico para la expresión del gen que confiere resistencia a ampicilina. Posteriormente se sembraron en una placa de Petri con ampicilina a 100 µg/ml. Una única colonia fue crecida en medio LB con ampicilina a 37°C hasta una absorbancia de 0.4 unidades, tras lo cual la temperatura se bajó a 18°C. A una absorbancia de 0.7 unidades se añadió IPTG 1 mM para la sobreexpresión de proteína. El pellet correspondiente a dos litros de cultivo se resuspendió en 40 ml de tampón de lisis [tris 25 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, MgCl₂ 5 mM, glicerol 10% para NPM1 y 5% para NPM1Ct, PMSF 1 mM, TCEP 1 mM, pH 7.5] suplementado con inhibidores de proteasas (Complete EDTA-free, una pastilla por litro de cultivo) y lisozima (20 mg por litro de cultivo). Las muestras fueron sonicadas a 10 micrones de amplitud en dos tandas de 10 ciclos cada una (15 s ON / 20 s OFF) y centrifugadas a 40000 r.p.m. 45 min. Tras filtrar los sobrenadantes con filtros PES de 0.22 µm fueron inyectados a 1 ml/min en una columna Níquel-NTA HisTrap™ FF (Qiagen). Para la elución de la proteína de interés se realizó un gradiente de 0 a 100% de tampón de elución [misma composición que los tampones de lisis a excepción de la concentración de imidazol: 1 M para NPM1 y 500 mM para NPM1Ct] a 4 ml/min, en 30 min en el caso de NPM1 y 15 min para NPM1Ct. Las fracciones se seleccionaron en base a su pureza en geles SDS-PAGE 15%, se les añadió proteasa TEV (1 mg por cada 30-50 mg de proteína de interés) y se dializaron *overnight* en tampón de lisis para eliminar la cola de histidina. El dializado se concentró mediante un dispositivo Amicon (con un tamaño medio de poro de 10 KDa para NPM1 y 3 KDa para NPM1Ct) hasta 2 ml y se inyectaron en una columna de gel filtración Superdex 200 16/60 (GE Healthcare Life Sciences) en el tampón correspondiente [tris 25 mM, NaCl 100 mM, glicerol 10% para NPM1 y 5% para NPM1Ct, DTT 1 mM para NPM1 y 2 mM para NPM1Ct]. Las fracciones se seleccionaron en función de su pureza y pertenencia a un pico homogéneo y tras concentrarse hasta unos 10-20 mg/ml fueron alicuotadas, congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C. La concentración de proteína fue estimada mediante el método del ácido bicinconínico (BCA).

3.2. Medidas de fluorescencia

Los experimentos de fluorescencia se realizaron en tampón fosfato 50 mM pH 7.5, en un fluorímetro PTI controlado térmicamente por un sistema Peltier acoplado, en cubetas de cuarzo de paso óptico de 3 mm (Hellma). La concentración de proteína utilizada fue NPM1Ct 50 µM y NPM1 5-10 µM. El compuesto C1 (Sigma-Aldrich), disuelto en DMSO, se sometió a sonicación antes de incubarlo con la proteína. La relación proteína:C1 utilizada fue 1:3. La mezcla se incubó 30 min a 20°C. Los barridos de calentamiento se realizaron de 20 a 90°C y a

velocidad de calentamiento de 60°C/h. Se monitorizó la fluorescencia de emisión de la sonda SYPRO Orange (SYPRO) (Life technologies), concentración 5X, λ_{exc} , λ_{em} 490 y 575 nm, respectivamente, *slits* 5x5 y en modo corregido. Los espectros se realizaron a 20°C antes y después de los calentamientos en el rango de 500-700 nm. También se analizó la emisión de los residuos de triptófano, localizados en el dominio C-terminal, λ_{exc} , λ_{em} 295 y 350 nm, respectivamente, *slits* 5x5 y en modo corregido. Los espectros en este caso se llevaron a cabo en el rango 310-500 nm. Se realizaron controles en ausencia de compuesto (se reemplazó por el mismo volumen de DMSO) en iguales condiciones.

Asimismo se midió la emisión de fluorescencia de los residuos de triptófano a lo largo del tiempo. El tampón, la concentración de proteína, longitudes de onda, y *slits* utilizados fueron los mismos que los anteriormente mencionados. El tampón, en ausencia o presencia de compuesto C1 se calentó a la T_m determinada durante el proceso de desnaturalización de cada proteína. Tras alcanzar el equilibrio térmico se añadió la proteína y se midió el incremento en la emisión de fluorescencia a lo largo del tiempo.

3.3. Dicroísmo circular (CD)

Las medidas de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco-810 controlado térmicamente por un sistema Peltier acoplado Circulator C-400. La proteína NPM1Ct 25 μ M, se preparó en tampón fosfato 50 mM pH 7.5. Los espectros se realizaron en cubetas de cuarzo (Hellma) de 0.1 - 0.01 cm de paso óptico a 20°C, en el rango 200-250 nm, con una sensibilidad estándar, anchura de banda de 1 nm, tiempo de respuesta de 0.5 s y velocidad de barrido de 50 nm/min. Cada espectro se obtuvo al promediar 20 barridos. Los barridos de temperatura se realizaron en el rango 20-90°C, monitorizando la elipticidad a 222 nm, tiempo de respuesta de 8 s y una velocidad de calentamiento de 60°C/h.

3.4. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Los barridos se realizaron en un microcalorímetro VP-DSC (Microcal). Las muestras se dializaron con *cutoff* de 3500 Da en tampón fosfato 50 mM pH 7.5. Tras dializar *overnight* a 4°C se añadió DMSO al 4% o C1 (relación 1:3). Las disoluciones fueron desgasificadas y los barridos se llevaron a cabo bajo presión de 28 psi. La concentración de proteína fue de 230 μ M y los barridos se realizaron entre 20 y 90°C a 1°C/min.

3.5. Efecto del compuesto C1 en células que expresan NPM1mutA

NPM1 salvaje y NPM1mutA se clonaron y sobreexpresaron en el plásmido pEYFP-C1 (ClonTech), fusionadas N-terminalmente a YFP. Para la sobreexpresión y el análisis las células HeLa se sembraron sobre cubres estériles en placas de 12 pocillos. Al llegar a una confluencia del 70-80%, se transfectaron y 3 h después el medio de crecimiento DMEM (suplementado con 10% FBS y 1% ampicilina/estreptomicina) fue reemplazado por medio fresco con C1 a 50 μ M en DMSO (0.5% concentración final) y se incubaron 24 h. En el caso de la Leptomicina B (LMB, Apollo Scientific) las células se trataron 3 h con LMB a 5.4 ng/ml (concentración final). Tras los tratamientos las células se fijaron con 3.7% formaldehído en PBS, se incubaron con Hoechst 33258 (Sigma, dilución 1:5000) y se montaron sobre portas usando Vectashield aqueous mounting medium (Vector Laboratories) para su observación al microscopio. Las muestras fueron analizadas por microscopía de fluorescencia (Zeiss Axioscop) y las imágenes se obtuvieron con una cámara Nikon DS-Qi1Mc y el software NIS-Elements F. El análisis semicuantitativo se realizó clasificando un mínimo de 200 células en base a la localización subcelular de YFP-NPM1 y a la agregación proteica.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis *in vitro* del efecto de C1 en la estabilidad térmica del dominio C-terminal

Se ha analizado el efecto del compuesto C1 en la estabilidad térmica del dominio C-terminal aislado (NPM1Ct) y de dicho dominio en el contexto de la proteína de secuencia completa (NPM1) utilizando técnicas espectroscópicas y calorimétricas

La estabilidad térmica de NPM1Ct (DMSO 4%) ha sido monitorizada por los cambios en la emisión de la sonda SYPRO la cual es sensible a la polaridad del medio. SYPRO se une a las regiones hidrofóbicas que se exponen durante el desplegamiento de las proteínas, desplazando su máximo de emisión a longitudes de onda más bajas y aumentando su rendimiento cuántico¹⁰. En presencia de NPM1Ct en condiciones nativas SYPRO tiene una emisión centrada en 615 nm, que se desplaza a 595 nm en condiciones desnaturizantes, con el consiguiente incremento en su rendimiento cuántico (Figura 4.1 (A)). Se ha seguido el desplegamiento térmico del dominio C-terminal analizando el incremento de la emisión de esta sonda a longitudes de onda que corresponden al estado desplegado de la proteína. La desnaturización térmica de NPM1Ct es un proceso poco cooperativo, con una transición ancha (aproximadamente 20 °C), y una Tm de $56.7 \pm 1.6^\circ\text{C}$ (Figura 4.1 (B)). La disminución de

fluorescencia que se produce después de la transición puede explicarse por la agregación proteica que se produce tras el desplegamiento.

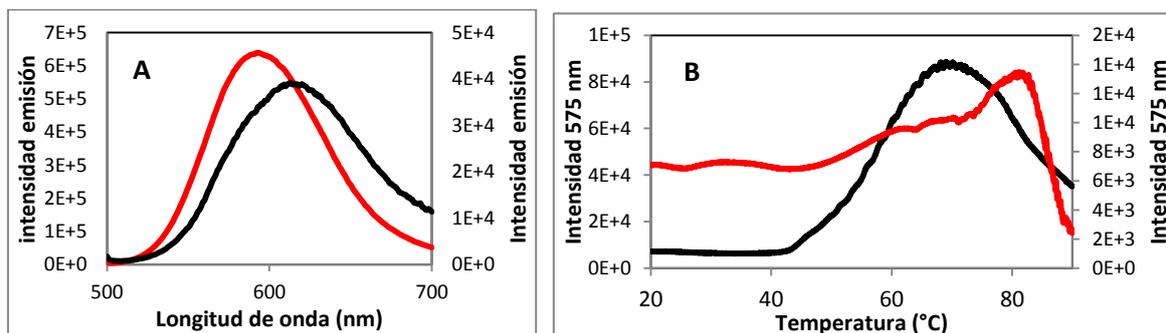


Figura 4.1. Medidas de fluorescencia realizadas con SYPRO. (A) Espectro de emisión de NPM1Ct nativo (negro, eje derecho) y NPM1Ct desnaturalizado (rojo, eje izquierdo). (B) Termograma de NPM1Ct (negro, eje izquierdo) y NPM1Ct en presencia de C1 (rojo, eje derecho).

La solubilidad de la sonda SYPRO en medio acuoso es baja e incrementa su rendimiento cuántico en presencia de C1 debido al carácter apolar de este compuesto (datos no mostrados). Para favorecer la interacción de C1 con la proteína, y evitar su posible partición por SYPRO, se incubó la mezcla NPM1Ct:C1 en ausencia de sonda fluorescente, ésta se añadió antes de comenzar el calentamiento de la muestra. Sin embargo, dado que SYPRO siempre está en exceso, el rendimiento cuántico respecto a la muestra preparada en ausencia de C1 aumenta, por lo que se asume que una fracción de la sonda se une a C1.

NPM1Ct en presencia de C1 presenta un termograma complejo, en el que además de una transición a la temperatura correspondiente al dominio C-terminal en ausencia de compuesto, aparece una transición a temperaturas superiores que se adjudica a la fracción de proteína unida y por lo tanto estabilizada por C1 (Figura 4.1 (B)). A pesar de que las dos transiciones no están perfectamente resueltas, se estima una T_m superior a 70°C. Además, la proporción relativa de las fracciones de proteína estabilizada y no estabilizada así como la magnitud del desplazamiento en la T_m es variable. Esta variabilidad se atribuye a la baja solubilidad de C1, que afecta a la concentración efectiva de compuesto que puede unirse a la proteína¹¹.

Considerando que el incremento del rendimiento cuántico de SYPRO en presencia de C1 indica una interacción de la sonda fluorescente con el compuesto, durante el proceso de desnaturalización de NPM1Ct se establecerán distintos equilibrios entre los tres componentes presentes en la muestra, por lo que el propio compuesto C1 y SYPRO pueden estar compitiendo entre sí por la unión a la proteína. Por tanto, se decidió seguir la desnaturalización térmica de NPM1Ct analizando la fluorescencia intrínseca de la proteína. La emisión de los residuos de triptófano es sensible a la polaridad del entorno, se desplaza hacia

el rojo cuando dichos residuos se exponen al medio acuoso¹². NPM1Ct presenta una banda de emisión centrada en 340 nm en condiciones nativas, que se desplaza hacia 350 nm tras el calentamiento (Figura 4.2 (A)) por lo que se siguió la intensidad de emisión a esa longitud de onda durante el desplegamiento de NPM1Ct.

Al igual que con SYPRO, NPM1Ct presenta una transición poco cooperativa con una T_m a $52 \pm 0.4^\circ\text{C}$ (Trp) (Figura 4.2 (B)). La T_m estimada es ligeramente más baja que cuando se determina en presencia de SYPRO, lo que podría indicar que la accesibilidad de los residuos triptófano al medio es un evento anterior a la exposición total de los entornos hidrofóbicos de la proteína durante el proceso de desnaturalización.

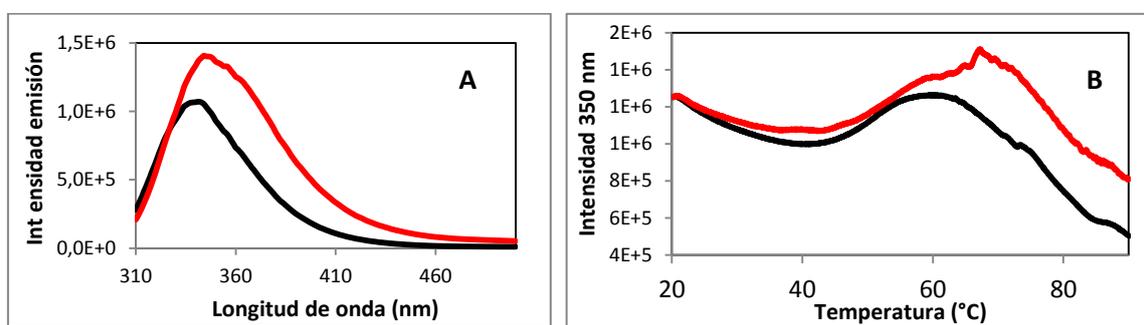


Figura 4.2. Seguimiento de NPM1Ct por fluorescencia intrínseca de residuos de triptófano. (A) Espectro de emisión de NPM1Ct nativo (negro) y NPM1Ct desnaturalizado (rojo). (B) Termograma de NPM1Ct (negro) y NPM1Ct en presencia de C1 (rojo).

El compuesto C1 estabiliza el dominio C-terminal y produce un aumento en la T_m de desplegamiento de la proteína, obteniéndose una ΔT_m de 4°C . También en este caso se observa una transición a una temperatura correspondiente a la proteína no unida a C1. Dado que C1 se encuentra en exceso (3X), la baja afinidad del compuesto por la proteína (no determinada) o la baja concentración efectiva del compuesto¹¹ podrían explicar la presencia de una fracción de NPM1Ct libre.

Aunque la ΔT_m estimada si se analiza la emisión de los triptófanos es menor que la calculada con SYPRO, se estudió la cinética de desplegamiento de NPM1Ct en ausencia y presencia de C1 mediante el seguimiento de la fluorescencia de residuos de triptófano (la temperatura del experimento se fijó a la T_m característica de la proteína sola). El tiempo necesario para producir un incremento del 50% en la emisión a λ_{350} (t_{50}) de NPM1Ct en presencia de C1 (96 s) es superior al observado en su ausencia (60 s) (Figura 4.3 (A)), lo que indica que la cinética de exposición de los triptófanos al medio acuoso es más lenta en presencia del compuesto C1, y corrobora su efecto estabilizador.

Con objeto de determinar los parámetros termodinámicos de la unión de C1 a NPM1Ct se realizó calorimetría diferencial de barrido, DSC, que permite asignar valores de ΔT_m , de variación en entalpía (ΔH) y de variación en la capacidad calorífica (ΔC_p) a los cambios conformacionales inducidos por la temperatura que sufren las proteínas¹³.

NPM1Ct presenta una transición ancha, poco cooperativa (Figura 4.3 (B)), tras la que no se recupera la línea de base, la cual decae bruscamente tras la transición, probablemente por efecto de la agregación e impide la determinación de la ΔH y la ΔC_p . No obstante, se estima una T_m aproximada de 51°C. La presencia de C1, que no mejora el problema de recuperación de la línea de base y por tanto el fenómeno de la agregación de NPM1Ct, parece aumentar su T_m hasta de 53°C, siendo las estimaciones en ambos casos de baja fiabilidad.

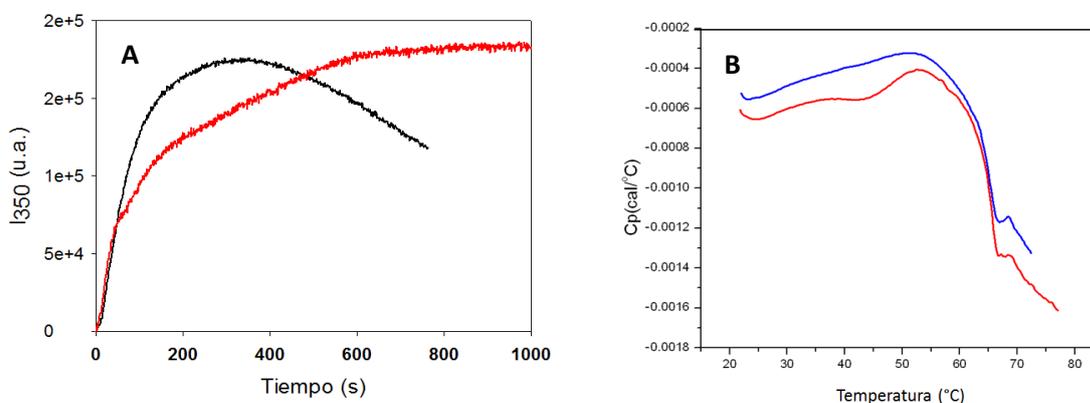


Figura 4.3. (A) Cinética de desnaturalización de NPM1Ct en ausencia (negro) y presencia (rojo) de C1 manteniendo la temperatura constante a la T_m de NPM1Ct en ausencia de compuesto. (B) Termograma DSC de NPM1Ct en ausencia (azul) y presencia (rojo) de C1.

Para determinar si la estabilización mediada por el compuesto C1 también afecta a la estabilidad de la estructura secundaria del dominio C-terminal, se analizó su comportamiento frente a la temperatura por dicroísmo circular (CD). NPM1Ct presenta un espectro característico de proteína rica en α -hélice, con dos mínimos a 222 nm y a 208-210 nm, y un máximo a 193 nm¹⁴ (Figura 4.4).

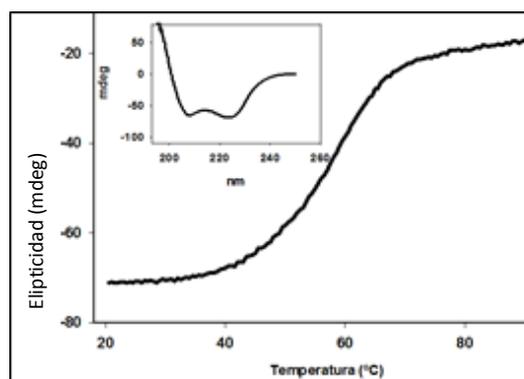


Figura 4.4. Espectro y termograma de NPM1Ct realizados por dicroísmo circular.

La T_m estimada al monitorizar la elipticidad de NPM1Ct a 222 nm es 58.5 °C (Figura 4.4). No se obtuvo ninguna variación en el valor de T_m estimada en presencia de C1 (termograma no mostrado por la baja relación señal/ruido debida al efecto del DMSO y del compuesto).

En conclusión, como cada técnica da información de un evento diferente del proceso general de desplegamiento de NPM1Ct, se puede decir que el compuesto C1 seleccionado en el cribado realizado con metodología HTS estabiliza el plegamiento terciario de NPM1Ct.

Como el objetivo a medio plazo del proyecto en el que se incluye este trabajo es encontrar ligandos que faciliten la localización nucleolar causada por el replegamiento del dominio C-terminal de los mutantes oncogénicos, se expresaron tanto el dominio C-terminal como la proteína completa correspondientes al mutante A (mismo procedimiento que con sus correspondientes salvajes). Sin embargo, ambas proteínas presentaban una tasa muy elevada de proteólisis en la región C-terminal. Por ello, se estudió el efecto del compuesto C1 en NPM1 y se analizó su efecto sobre NPM1Ct en el contexto de la proteína de secuencia completa.

Se aplicó la misma metodología utilizada con NPM1Ct. Durante el proceso de desplegamiento térmico de NPM1 en presencia de SYPRO se observó la existencia de dos transiciones, correspondientes a la disociación/desplegamiento del dominio *core* y a la desnaturalización del dominio C-terminal (Figura 4.5 (A)). Para asignar las transiciones al desplegamiento de cada uno de los dos dominios plegados de la proteína, se utilizaron: el mutante NPM1mutA, que a pesar de estar degradado en su extremo carboxilo terminal, mantiene intacto el dominio *core*, y por lo tanto sirve para establecer qué transición corresponde al dicho dominio. Y NPM1 salvaje, la cual es útil para determinar la transición del C-terminal por seguimiento de la fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano localizados en sus extremos C-terminales. El uso de ambas aproximaciones ha permitido indicar que la primera transición corresponde al desplegamiento y/o disociación del *core* pentamérico (T_m 43-44 °C), y la segunda pertenece al dominio C-terminal (T_m 56 °C) (figura 4.5 (A)). Por otra parte, la T_m de desplegamiento del dominio C-terminal en el contexto de NPM1 de secuencia completa es ligeramente superior a la del dominio C-terminal aislado.

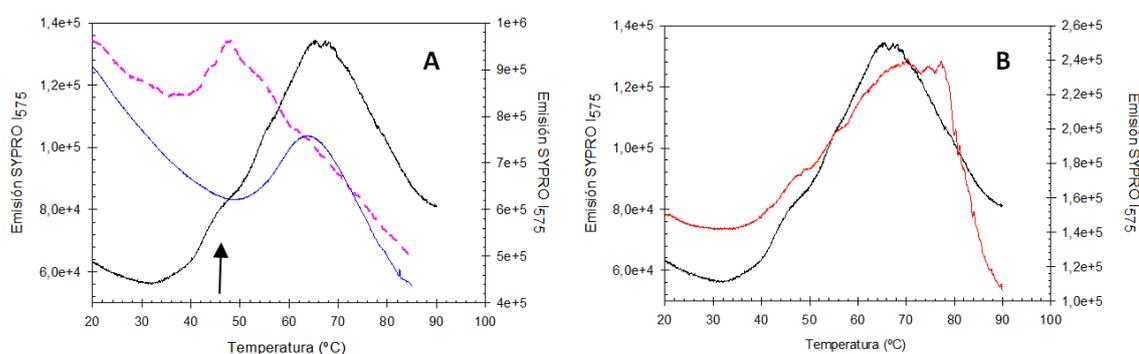


Figura 4.5. Termogramas de desnaturalización de NPM1 de secuencia completa. (A) Seguimiento por SYPRO (negro) y por fluorescencia intrínseca de Trp (azul), (morado) control realizado con NPM1mutA. La flecha indica el dominio *core*. (B) Desnaturalización en ausencia (negro) y presencia (rojo) de C1.

El compuesto C1 no afecta a la transición correspondiente al dominio *core* de NPM1, pero sí que desplaza la T_m del dominio C-terminal (Figura 4.5 (B)), lo que indica que es un ligando efectivo para estabilizar térmicamente dicho dominio. Este efecto también se observa al analizar la cinética del desplegamiento del C-terminal en ausencia y presencia de C1 (Figura 4.6). Así, el dominio C-terminal de NPM1 (en ausencia de C1) presenta varias fases de desplegamiento; una primera fase rápida, que transcurre en los primeros 200 s del calentamiento y una o varias fases posteriores, en las que los dominios C-terminales exponen totalmente los triptófanos al medio. En presencia de C1, la cinética de desnaturalización del dominio C-terminal es más lenta: muestra una primera fase de aumento de la emisión a λ_{350} (t_{50} aproximado 1000 s), seguida de otro proceso en el que el aumento de la emisión muestra una cinética más lenta.

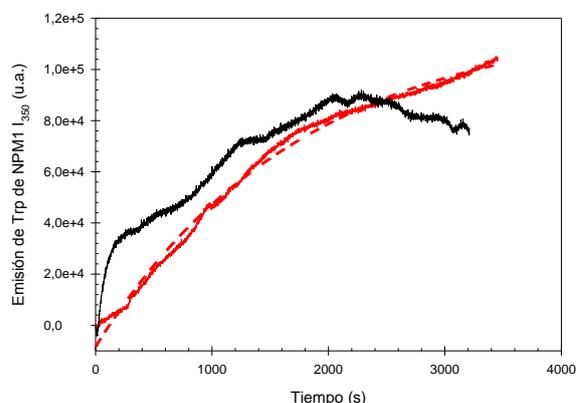


Figura 4.6. Cinética de desnaturalización de NPM1 en ausencia (negro) y presencia (rojo) de C1.

Esta estabilización de NPM1 por C1 se asemeja al patrón observado previamente en el C-terminal aislado. Sin embargo, las cinéticas de desnaturalización son más lentas en el caso de la proteína de secuencia completa. Aunque no se ha realizado ningún experimento que trate de explicar este comportamiento, se puede decir que el dominio *core* ejerce una función estabilizadora del dominio C-terminal, tanto en ausencia como presencia de C1.

4.2. Análisis del efecto de C1 *in vivo*

En células portadoras de YFP-NPM1 salvaje la proteína se encuentra en el nucléolo mientras que en las transformadas con YFP-NPM1mutA se da una salida masiva al citoplasma^{2,5,7} (Figura 4.7).

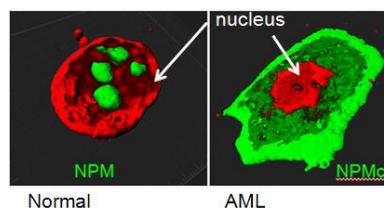


Figura 4.7. Localización de NPM1 en células normales y leucémicas. Nucléolo en rojo y NPM1 en verde⁵.

Mediante el tratamiento con el inhibidor específico de Crm1 Leptomicina B se comprueba que la exportación de NPM1 al citoplasma está mediada por Crm1^{1,3,5,9}, ya que en presencia de este compuesto la fluorescencia de YFP-NPM1 (tanto salvaje como mutante A) se encuentra en el núcleo. En ausencia de Leptomicina B, se observa que en las células con YFP-NPM1 salvaje la fluorescencia se mantiene en el nucléolo mientras que en YFP-NPM1 mutante A la fluorescencia se registra principalmente en el citoplasma. En este tipo de células se han visto

puntos brillantes en el citoplasma los cuales se atribuyen a la agregación proteica. En el tratamiento de la forma mutante con Leptomicina B se observa también que la fluorescencia se mantiene en el núcleo, pero no se llegan a apreciar los nucléolos^{5,6,9}, lo cual corrobora la hipótesis de que la mutación además de provocar la aparición de una nueva señal NES, provoca la pérdida de la capacidad de unión de NPM1 a ácidos nucleicos del nucléolo (Figura 4.8).

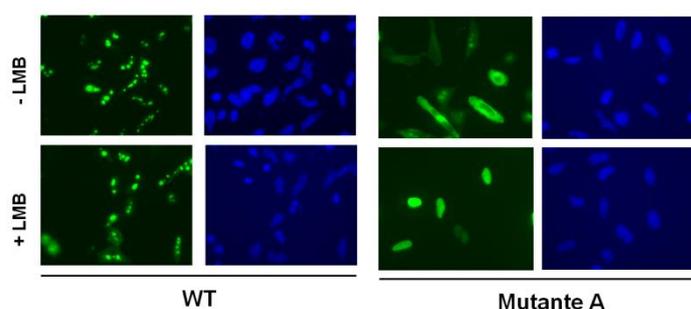


Figura 4.8. Células HeLa transformadas con YFP-NPM1 salvaje y mutante A. La fluorescencia asociada a YFP se ve en los paneles de la izquierda en verde y a la derecha el DNA en azul por la tinción de Hoechst. En los paneles inferiores las células han sido tratadas con Leptomicina B (LMB).

Al tratar las células transformadas con YFP-NPM1mutA con C1 se observa cómo el nivel de agregación se reduce aproximadamente a la mitad respecto a las que no han sido tratadas. El efecto positivo de C1 se observa también en la localización proteica. Como se ha dicho anteriormente en células portadoras de NPM1 mutante A la fluorescencia se encuentra principalmente en el citoplasma, pero al añadir C1 el efecto de la mutación se revierte parcialmente dándose un aumento del 12% en la localización nucleolar (Figura 4.9). En el caso de las células mutantes tratadas con C1, a pesar de verse un aumento en la localización nucleolar YFP-NPM1mutA no llega a ser únicamente nucleolar tal y como ocurre con la proteína salvaje.

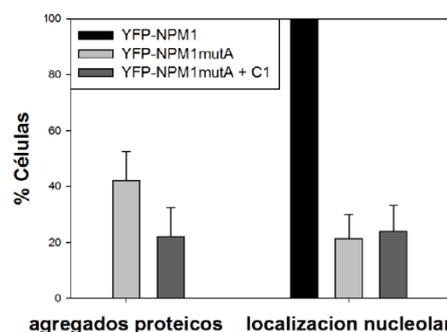


Figura 4.9. Porcentaje de células con agregados y células en las cuales se encuentra la proteína mayoritariamente en el nucléolo. Valores para la proteína salvaje, el mutante con DMSO (control) y efecto de C1 sobre el mutante A.

5. CONCLUSIONES

De los estudios realizados *in vitro* se concluye que durante su desnaturalización el C-terminal expone de manera secuencial los residuos de triptófano del núcleo hidrofóbico, lo que lleva a la exposición de sus zonas apolares y posterior pérdida de su estructura secundaria α -hélice. Además, el compuesto C1 estabiliza el dominio C-terminal tanto cuando se encuentra

aislado (NPM1Ct) como cuando se encuentra en el contexto de la proteína de secuencia completa (NPM1).

In vivo C1 favorece que la proteína mutante A la cual tiene el dominio C-terminal desplegado, adquiera una conformación que se asemeja a la salvaje, ya que presenta localización nucleolar, aunque no de manera exclusiva, lo cual se interpreta como recuperación parcial de su capacidad de unión a ácidos nucleicos en el nucléolo.

Estos resultados sugieren que este compuesto (u otros de naturaleza similar) pueden ser interesantes como punto de partida para la creación de fármacos útiles en terapia contra la leucemia mieloide aguda.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 1- Federici L. & Falini B. (2013). Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: A tale of protein unfolding and mislocalization [Review]. *Protein science*, 22, 545-556.
- 2- Lindström MS. (2011). NPM1/B23: A multifunctional chaperone in ribosome biogenesis and chromatin remodeling [Review]. *Biochemistry Research International*, 2011, 195-209.
- 3- Grummitt CG., Townsley FM., Johnson CM., Warren AJ & Bycroft M. (2008). Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (34), 23326-23332
- 4- Grisendi S., Mecucci C., Falini B. & Pandolfi PP. (2006) Nucleophosmin and cancer [Review]. *Nature Reviews*, 6 (7), 493-505.
- 5- Falini B., Bolli N., Liso A., Martelli MP., Mannucci R., Pileri S. & Nicoletti I. (2009). Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications [Review]. *Leukemia*, 23, 1731-1743.
- 6- Falini B., Nicoletti I., Martelli MF & Mecucci C. (2007) Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc⁺ AML): Biologic and clinical features. *Blood*, 109, 874-885.
- 7- Falini B., Nicoletti I., Bolli N., Martelli MP., Liso A., Gorello P. et al. (2007). Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica*, 92 (4), 519-532.
- 8- Falini B., Martelli MP., Bolli N., Sportoletti P., Liso A., Tiacci E. & Haferlach T. (2011) Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? [Review]. *Blood*, 117(4), 1109-1120
- 9- Falini B., Bolli N., Shan J., Martelli MP., Liso A., Pucciarini A et al. (2006). Both carboxi-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc⁺ AML. *Blood*, 107 (11), 4514-4523.
- 10- <http://www.avactaanalytical.com/learning-centre/our-technical-library/differential-scanning-fluorimetry-optim-using-sypro-orange-dye>
- 11- Marin I., Underhaug J., Celaya G., Moro F., Teigen K., Martinez A., et al. (2013) Screening and evaluation of small organic molecules as ClpB inhibitors and potential antimicrobials. *Journal of Medicinal Chemistry*. 56,7177-7189
- 12- Burstein EA., Vedenkina NS. & Ivkova, MN. (1973). Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochemistry Photobiology*. 18, 263-279.
- 13- Freire E., van Osdol WW., Mayorga OL. & Sánchez-Ruiz J.M. (1990). Calorimetrically determined dynamics of complex unfolding transition in proteins. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. 19,159-188.
- 14- Kelly SM. & Price NC. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current protein & peptide science*. 1, 349-384.