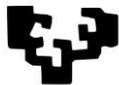


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Euskadi
2006

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

Estrategias de desestabilización del estado oligomérico de la nucleofosmina

Egilea/Autor:
Leire Goicoechea Barrenechea

Zuzendaria/Director/a:
María Ángeles Urbaneja Arrue
Igor Arregi Vado

ÍNDICE

Abreviaturas	I
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
2.1. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	3
2.2. PREPARACIÓN DE NPM (NPM _{mutA} Y NPM _{core}) A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl	4
2.3. INCUBACIÓN DE NPM CON ÁCIDO RETINOICO	5
2.4. ELECTROFORESIS EN GELES NATIVOS DE POLIACRILAMIDA (PAGE)	5
2.5. DICROÍSMO CIRCULAR	5
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5
3.1. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA EN EL ESTADO OLIGOMÉRICO DE LA NPM	6
3.1.1. Estabilidad del pentámero NPM _{core} humano frente a fuerza iónica	6
3.1.2. Disociación del oligómero de la NPM mediada por la fuerza iónica del medio. Papel del dominio <i>linker</i> y C-terminal de la proteína	7
3.1.3. Reversibilidad del proceso de disociación del pentámero de NPM	10
3.1.4. Efecto de la fuerza iónica en la estructura secundaria del monómero de NPM	10
3.2. EFECTO DEL ÁCIDO RETINOICO EN EL ESTADO OLIGOMÉRICO DE LA NPM	11
4. CONCLUSIONES	12
5. BIBLIOGRAFÍA	12

ABREVIATURAS

ADN (ácido desoxirribonucleico); AML (leucemia mieloide aguda); APL (leucemia promielocítica aguda); AR (ácido retinoico); BCA (ácido bicincoánico); CD (dicroísmo circular); C-term (carboxilo terminal); DTT (ditiotreitól); EDTA (ácido etilendiaminotetraacético); λ (longitud de onda); HDAC (histona desacetilasa); hNPM_{core} (dominio N-terminal de la nucleofosmina humana); mNPM_{core} (dominio N-terminal de la nucleofosmina murina); NCOR (co-represores nucleares); NES (señal de exportación nuclear); NLS (señal de localización nuclear); NoLS (señal de localización nucleolar); NPM (nucleofosmina); NPMc⁺ (nucleofosmina aberrantemente localizada en el citoplasma), NPM_{core} (mutante que contiene sólo el dominio N-terminal de la nucleofosmina); NPM_{mutA} (mutante de tipo A de la nucleofosmina en AML); PAGE (gel electroforesis de poliacrilamida); RAR (receptor de ácido retinoico); rpm (revoluciones por minuto); SDS (sodiododecilsulfato); TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina); TEV (virus del grabado del tabaco); tris (tris(hidroximetil)aminometano); W (triptófano); WT (salvaje)

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La nucleofosmina (NPM), también conocida como B23, NO38 o numatrina, es una proteína pentamérica localizada, en condiciones normales, en el nucléolo celular. La NPM regula varios procesos relacionados con el crecimiento celular, como el ensamblaje y transporte de ribosomas al citoplasma y la duplicación del centrosoma, así como la replicación, recombinación, transcripción y reparación del ADN¹⁻⁴. Asimismo, la NPM tiene un importante papel en la regulación de la actividad de varios supresores tumorales como p53, Arf o Myc¹⁻⁴.

Para llevar a cabo la mayor parte de sus funciones, la NPM se mueve continuamente entre el nucléolo y el nucleoplasma, y entre el núcleo y el citoplasma, para lo cual la NPM dispone de señales de importación y exportación nuclear, así como de retención nucleolar² a lo largo de su secuencia.

El monómero de la nucleofosmina, de 294 residuos, presenta tres dominios estructurales (**Figura 1.1**). Los primeros 119 residuos, que adoptan una estructura de barril β^5 (**Figura 1.2A**), constituyen el dominio N-terminal o *core*, que es responsable de la oligomerización de la proteína (**Figura 1.2B**) y contiene dos motivos ricos en leucina, propuestos como señales de exportación nuclear (NES)⁶ (**Figura 1.1**). A continuación se encuentra un largo y flexible dominio *linker* (residuos 120-243)³, que se encuentra intrínsecamente desordenado, y contiene una señal de localización nuclear (NLS) conservada^{6,7} (**Figura 1.1**). El dominio *linker* conecta el dominio *core* con el extremo carboxilo terminal de la proteína (últimos 50 residuos), denominado C-term. Este pequeño dominio globular, compuesto por tres hélices α (**Figura 1.2C**), participa en la unión de NPM al ADN ribosomal^{8,9}, y es el responsable de la localización nucleolar de la proteína².

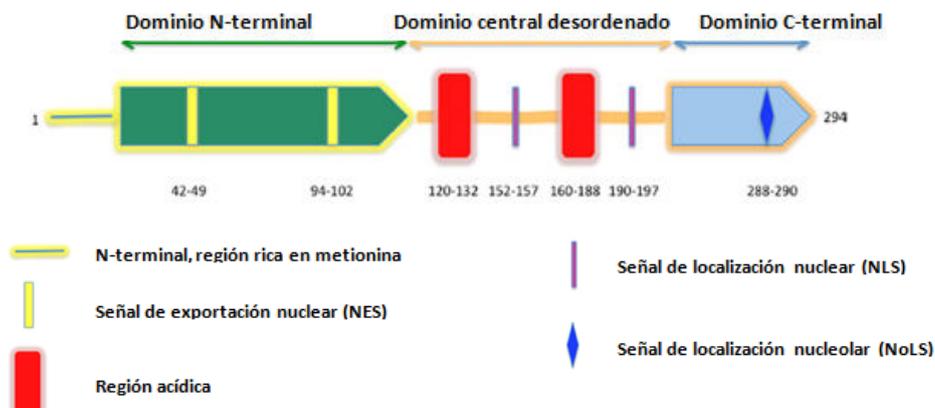


Figura 1.1. Representación esquemática de la NPM. Dominios estructurales y componentes funcionales relevantes de la nucleofosmina (figura modificada de Fedirici et al. 2013).

Aproximadamente el 30% de los pacientes con leucemia mieloide aguda (AML)^{3,10} presenta el gen *NPM1* mutado. Se han descrito alrededor de 50 mutaciones, todas las cuales afectan a los últimos aminoácidos de la proteína. La mutación más frecuente (95% de los casos) es la denominada mutación de tipo A, que genera una proteína mutante, NPMmutA, 4 aminoácidos más larga, con una secuencia diferente en sus últimos 11 residuos. Estos cambios incluyen la pérdida de dos residuos de triptófano (W288, W290)³, esenciales en el plegamiento del dominio C-terminal y de su retención nucleolar⁹, así como la adquisición de un nuevo y muy activo motivo de exportación nuclear (NES)⁷, por lo que la NPM mutada pierde su localización en el nucléolo y presenta una elevada afinidad por su receptor de exportación, la exportina 1 o Crm1⁷. La suma de estos dos procesos (pérdida de localización nucleolar y mayor tasa de exportación) provoca la acumulación aberrante de NPMmutA en el citoplasma (NPMc⁺), lo que perturba, por pérdida de funciones en el nucléolo y/o aparición de nuevas funciones en el citoplasma, vías de señalización celular involucradas en el control del ciclo celular.

Dada la frecuencia y estabilidad de las mutaciones de la NPM en la AML, la Organización Mundial de la Salud incluye la NPM mutada como entidad provisional en la clasificación de tumores de tejidos hematopoyéticos y linfoides^{3,10,12}, por lo que la NPM se ha convertido en una diana terapéutica. Hoy en día existen dos estrategias para el tratamiento de esta enfermedad. La primera de ellas se basa en dirigir la NPM de nuevo al nucléolo, facilitando el replegamiento del dominio C-terminal de NPMmutA mediante chaperones farmacológicos. En la actualidad ya se han descrito compuestos que cumplen esta misión¹³. Por otra parte, el menor contenido de NPM en el nucléolo³ hace más sensibles a las células leucémicas con NPMmutA², por lo que una segunda estrategia persigue desplazar la NPM al nucleoplasma.

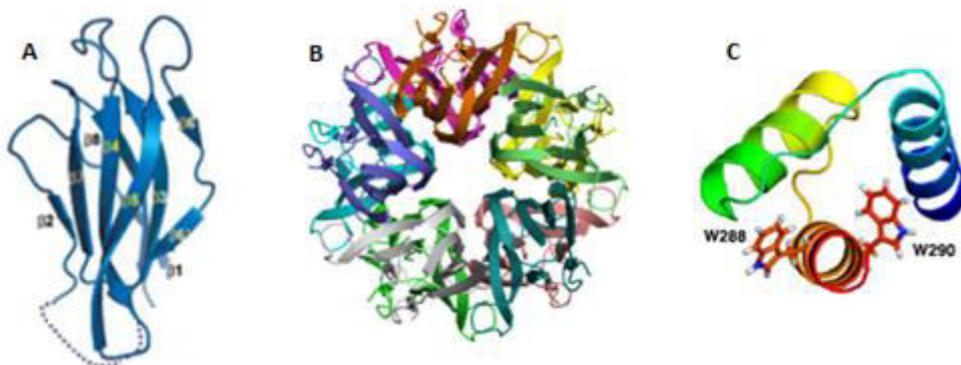


Figura 1.2. Estructura de la NPM humana completa y extremos terminales. (A) Dominio N-terminal de la NPM, formado por dos láminas de cuatro hebras β antiparalelas (figura modificada de Lee et al., 2007). (B) Estructura pentamérica del dominio N-terminal de NPM humana (PDB 2P1B). (C) Estructura del dominio C-terminal de NPM (figura de Grummitt et al., (2008). Se resaltan los residuos W288 y W290, esenciales para su plegamiento.

La monomerización de la NPM ha sido correlacionada con su acumulación en el nucleoplasma, que eventualmente conduce a la apoptosis celular^{14,15}. Recientemente se ha descrito que tanto mutaciones fosfomiméticas en el dominio N-terminal, como una baja salinidad, favorecen la monomerización del dominio N-terminal de NPM de origen murino¹⁶. Por tanto, favorecer la desestabilización del pentámero de NPM es una estrategia atractiva.

La ausencia de estudios que aborden qué factores modulan la estabilidad del oligómero de NPM nos ha llevado a plantear como objetivos de este trabajo:

1. Determinar el efecto de la fuerza iónica en el estado oligomérico de la NPM humana y analizar el impacto de los dominios *linker* y C-term en la estabilidad del oligómero.
2. Analizar el efecto del ácido retinoico, agente ampliamente utilizado en el tratamiento de otros tipos de leucemias, en la estabilidad del pentámero de NPM.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. SOBREENPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La NPM salvaje y la NPMmutA, que contiene la mutación de tipo A presente en la AML, fueron clonadas en plásmidos derivados del pET8c, usando como molde un clon de la NPM humana proporcionado por el Dr. Zhang¹⁷. El mutante NPM*core*, cedido por el Dr. H.H. Lee⁵, se clonó en el vector pET-21a (+). Estos plásmidos codifican la proteína de interés con una etiqueta de histidinas unida al extremo N-terminal mediante una secuencia hidrolizable por la proteasa del virus de grabado del tabaco (TEV)¹⁸.

Las proteínas fueron sobreexpresadas durante 16 horas a 18 °C (NPM y NPMmutA) o 3 horas a 30 °C (NPM*core*) en la cepa de *E. coli* BL21(DE3). Las células fueron resuspendidas en tampón de homogenización (25 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol, 5 mM MgCl₂, 1 mM TCEP, 1 mM PMSF, 10% glicerol para las NPM; 25 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glicerol, 1mM DTT, para NPM*core*) con lisozima (20 mg por litro de cultivo) y una combinación de inhibidores de proteasas (Complete, EDTA-free, Roche; una pastilla por litro de cultivo). Las células fueron lisadas mediante sonicación, tras lo cual la muestra se clarificó por centrifugación (40.000 rpm, 45 min) en una centrífuga OPTIMA XPN (Beckman Coulter). Los sobrenadantes filtrados se inyectaron en una columna de Ni-NTA (HisTrapTM FF, GE Healthcare) a 1 mL/min. La proteína se eluyó en un gradiente 20-500 mM de imidazol en el tampón de homogeneización y se seleccionaron las fracciones con mayor abundancia relativa de la proteína de interés.

La NPM y NPMmutA se dializaron frente al tampón de homogenización durante 16h a 4 °C en presencia de la proteasa TEV (relación sustrato: TEV 30:1, en masa). Tras filtrarlo, el producto de la diálisis se inyectó en una segunda columna de Ni-NTA. La NPM y NPMmutA eluyen en la fracción no unida, mientras que la etiqueta de histidinas y la propia TEV (contiene una etiqueta de histidinas) quedan retenidas en la columna.

Las tres proteínas fueron sometidas a una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada con el tampón 25 mM Tris/HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 1mM DTT, 10% glicerol para la NPM y NPMmutA; y 25 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1mM DTT, 10% glicerol, para la NPMcore. Tras seleccionar las fracciones con mayor abundancia relativa de la proteína de interés que eluyen en un pico homogéneo, éstas se concentraron hasta 15-30 mg/mL (sistema Amicon, 10 kDa tamaño medio de poro), se alicuotaron, congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. La concentración de proteína se estimó mediante el método colorimétrico del ácido bicinonínico (BCA, Pierce) y espectrofotométricamente. La integridad de las proteínas producidas fue comprobada por espectrometría de masas, siendo detectada una degradación proteolítica parcial en el caso de la NPMmutA.

2.2. PREPARACIÓN DE NPM (NPMmutA Y NPMcore) A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl

La NPM (o, en su caso, NPMmutA o NPMcore), 2 mg/mL concentración final de proteína, se preparó en un tampón 10 mM fosfato potásico pH 7.0, 5 mM DTT, que contenía NaCl en el rango 500 – 1 mM. Se utilizaron mezclas de dos tampones, tampón A (10 mM fosfato potásico, pH 7.0, 5 mM DTT) y tampón B (10 mM fosfato potásico, pH 7.0, 2.5 M NaCl, 5 mM DTT) para obtener la concentración de NaCl deseada. La NPM se diluyó con el tampón de fuerza iónica correspondiente (método dilución directa) e incubó *overnight* a 4 °C. La muestra se concentró (sistema Amicon, 3 kDa tamaño medio de poro) cuando el factor de dilución era muy alto. Ninguna de las muestras se incubó a concentración salina inferior a la final.

Para estudiar la reversibilidad del proceso, la NPM (o, en su caso, NPMmutA o NPMcore) se dializó *overnight* a 4 °C frente a tampón A con 1 mM NaCl. Tras la diálisis, la proteína se centrifugó y concentró hasta 5-10 mg/mL (sistema Amicon, 3 kDa tamaño medio de poro). Tras su cuantificación, la NPM se diluyó hasta 2 mg/mL con el tampón de fuerza iónica correspondiente, incubando la muestra *overnight* a 4 °C.

2.3. INCUBACIÓN DE NPM CON ÁCIDO RETINOICO

El ácido retinoico (AR, Sigma-Aldrich) se disolvió en etanol (5 mg/mL) a temperatura ambiente en condiciones de completa oscuridad (utilizando luz roja). La disolución se almacenó a -20°C en recipientes de vidrio. Tras dializar la NPM frente a tampón A con 1mM NaCl, *overnight* a 4 °C, se prepararon muestras (2 mg/mL NPM, concentración final) a diferentes concentraciones salinas en presencia de distintas concentraciones de ácido retinoico e incubaron *overnight* a 4 °C. Como control, también se analizó una muestra de NPM, que presentaba el mismo tratamiento, pero a la que se le añadió el volumen correspondiente de etanol.

2.4. GELES NATIVOS DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

La NPM tratada (2 mg/mL, 3 µL) se mezcló con tampón de carga (3 µL) y se cargó en geles nativos con un 8,5% de acrilamida. Tras la tinción con azul de Coomassie se determinó la intensidad de cada banda con el software Versadoc Imaging System o Quantity One software (Bio-Rad).

2.5. DICROISMO CIRCULAR (CD)

Las medidas de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro Jasco 810 controlado térmicamente mediante un sistema *Peltier* acoplado Circulator C-400. Tras incubar NPM (0, 25 mg/mL) *overnight* a 4 °C en tampón 10 mM fosfato potásico pH 7.0, con 1 y 500 mM NaCl, se recogieron los espectros a 20 °C en cubetas de cuarzo (Hellma, Estados Unidos) de 1 mm de paso óptico, en el rango de 200-260 nm, tras promediar 20 barridos. Se calculó la elipticidad molar mediante la ecuación $[\theta] = \epsilon/10cnl$, donde ϵ es elipticidad (mdeg), c es la concentración de proteína (µM), l es el paso óptico de la cubeta en mm y n es el número de enlaces peptídicos en la proteína.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La nucleofosmina, al igual que otros miembros de la familia de chaperones Nucleoplasmina/Nucleofosmina¹⁹, tiene un dominio N-terminal muy conservado, responsable de la oligomerización de la proteína¹¹. La pérdida del estado pentamérico determina su localización exclusiva en el nucleoplasma, así como la inducción de apoptosis dependiente de p53^{14,15}, lo que sugiere que el estado oligomérico de la NPM podría determinar sus funciones biológicas⁴. Para caracterizar el equilibrio monómero/pentámero de NPM hemos estudiado el efecto de la concentración salina y del compuesto antileucémico ácido retinoico en el estado oligomérico de la NPM.

3.1. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA EN EL ESTADO OLIGOMÉRICO DE LA NPM

Para determinar el efecto de la fuerza iónica en la estabilidad del pentámero de la NPM humana, se analizó, mediante geles nativos de poliacrilamida, la fracción de oligómero de NPM (así como de NPMmutA y NPMcore) en tampones con distinta concentración salina.

3.1.1. Estabilidad del pentámero NPMcore humano frente a fuerza iónica

A diferencia de lo observado por Mitrea y cols (2014)¹⁶ en NPMcore de ratón (mNPMcore), los geles nativos PAGE indican que el mutante NPMcore de secuencia humana (hNPMcore) no varía su estado pentamérico en el amplio rango de concentraciones de NaCl utilizadas (500 – 1 mM) (datos no mostrados).

Si bien ambos dominios NPMcore presentan una distribución asimétrica de residuos cargados²⁰, con una alta densidad de residuos de carga negativa en la denominada cara distal del pentámero^{5,16}, hNPMcore presenta menor densidad de carga negativa (**Figura 3.1**). Esta característica podría explicar cómo, ante un menor apantallamiento de cargas mediado por Na⁺ a baja fuerza iónica, se podría reducir el efecto de repulsión entre los residuos cargados negativamente, que redundaría en la mayor estabilidad del pentámero de hNPMcore frente a la disminución de la fuerza iónica del medio.

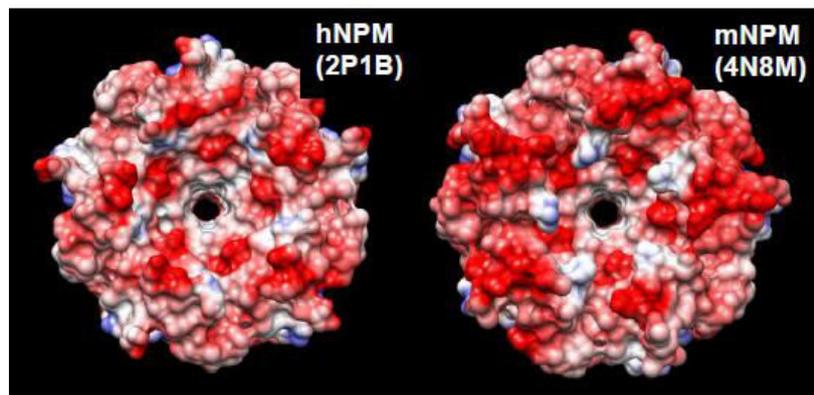


Figura 3.1. Cargas de superficie de la cara distal del dominio core. Nucleofosmina humana (hNPM, PDB 2P1B)⁵ y nucleofosmina murina (mNPM, PDB 4N8M)¹⁶. Las cargas de superficie fueron calculadas con el programa CHIMERA y coloreadas de acuerdo al potencial de Coulomb, desde -10 (rojo) a +10 (azul) Kcalmol⁻¹e⁻¹.

3.1.2. Disociación del oligómero de la NPM mediada por la fuerza iónica del medio. Papel del dominio *linker* y C-terminal de la proteína

A continuación, y también mediante electroforesis en geles nativos PAGE, estudiamos la estabilidad del oligómero de la NPM (secuencia entera) frente a la fuerza iónica. En primer lugar observamos que la NPM recombinante de origen humano presenta un patrón electroforético característico con múltiples bandas (**Figura 3.2A**), que ya se había descrito para la NPM natural purificada de células HeLa²¹. Por otra parte, los geles SDS-PAGE (**Figura 3.2B**), así como la espectrometría MALDI-TOF (datos no mostrados), indican que la NPM es una especie homogénea cuyo monómero presenta una masa molecular de 32806.2 Da, que coincide con la de nuestra construcción. Esto demuestra que la heterogeneidad electroforética no proviene de la degradación del monómero. Asimismo, los experimentos de centrifugación analítica realizados por otros miembros del grupo de investigación muestran que el coeficiente de sedimentación y la masa molecular aparente de nuestra muestra son compatibles con una única especie oligomérica⁷, la pentamérica, por lo que esta heterogeneidad electroforética puede deberse a una variabilidad conformacional de la NPM en los geles nativos.

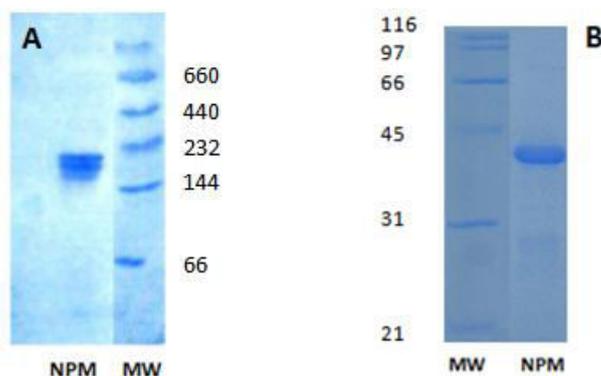


Figura 3.2. Comportamiento electroforético de la NPM. (A) Gel nativo de poliacrilamida de la NPM completa 1 mg/mL. (B) Gel SDS-PAGE de la NPM, 1 mg/mL. Los marcadores moleculares están incluidos en ambos casos, sistema de unidad kDa.

Tras incubar la NPM *overnight* a diferentes concentraciones salinas y someter las distintas muestras a una electroforesis nativa, observamos que el estado oligomérico de la NPM es sensible a la fuerza iónica (**Figura 3.3A**). A fuerza iónica alta (500 mM) la NPM es mayoritariamente pentamérica, mientras que a concentraciones de NaCl inferiores, disminuye la intensidad de las bandas que corresponden a la forma pentamérica y aumenta la intensidad de una especie cuyo tamaño aparente es de 85,4 kDa. Por otra parte, y aunque minoritaria, se observa una banda de 42,7 kDa, compatible con la forma monomérica. Por densitometría cuantificamos la fracción de NPM pentamérica, observando que un 35-40% de pentámeros de NPM se disocia a baja concentración de sal (**Figura 3.3B**). (Nota: Para cuantificar la fracción de NPM pentamérica

consideramos pentámero la contribución de todas las bandas superiores frente a la contribución de las dos bandas de menor masa).

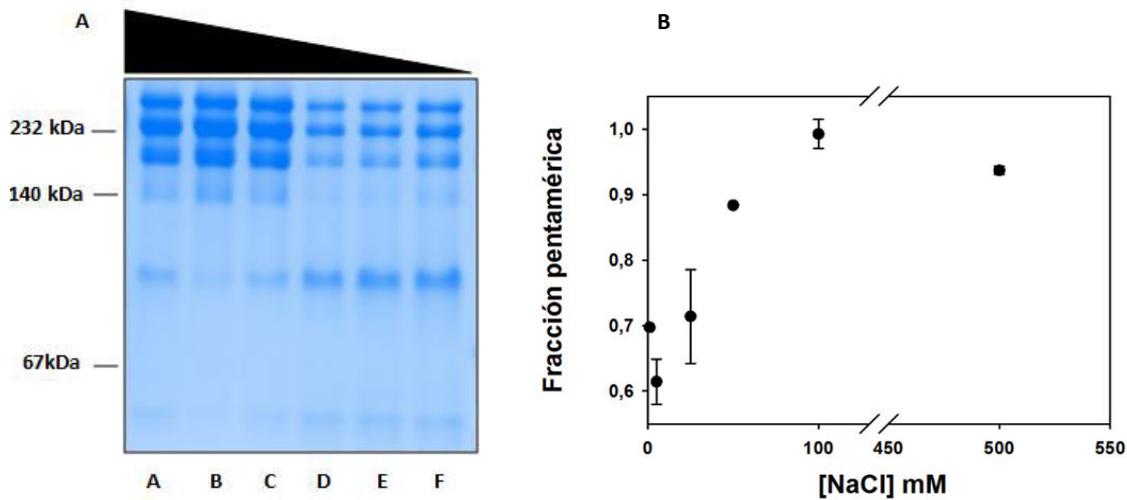


Figura 3.3. Efecto de la fuerza iónica en el estado oligomérico de la NPM. (A) Gel nativo de poliacrilamida de NPM en tampón con NaCl: A, 500 mM; B, 100 mM; C, 50 mM; D, 25 mM; E, 5 mM; F, 1 mM. (B) Fracción de NPM pentamérica tras su incubación en tampón a distinta concentración de NaCl.

Dado que el mutante NPMmutA es la variante de NPM más frecuentemente detectada en enfermos de leucemia mieloide aguda (AML), y la desestabilización del pentámero de NPM es una estrategia a desarrollar en la terapia de dicha enfermedad, quisimos analizar la sensibilidad de este mutante a la fuerza iónica del medio. Como se ha mencionado en la sección Introducción, NPMmutA es una proteína 4 residuos más larga, cuyos últimos 11 aminoácidos son diferentes, y que carece de los residuos W288 y W290, esenciales para el plegamiento del dominio C-term de la proteína. En consecuencia, el mutante NPMmutA contiene el mismo dominio N-terminal y *linker* que la proteína salvaje, así como un dominio C-term desplegado.

El comportamiento electroforético de NPMmutA es diferente al de la especie salvaje. El mutante presenta una única banda, muy difusa, correspondiente a pesos moleculares altos, pero migra en la misma región en la que lo hacen las múltiples bandas de NPM salvaje. Asimismo, presenta múltiples bandas de menor tamaño, que atribuimos a la degradación de la proteína (**Figura 3.4A**). El análisis por espectrometría de masas de NPMmutA mostró que la proteína de secuencia entera es la especie minoritaria, así como otras especies, en mayor porcentaje, correspondientes a formas degradadas⁷.

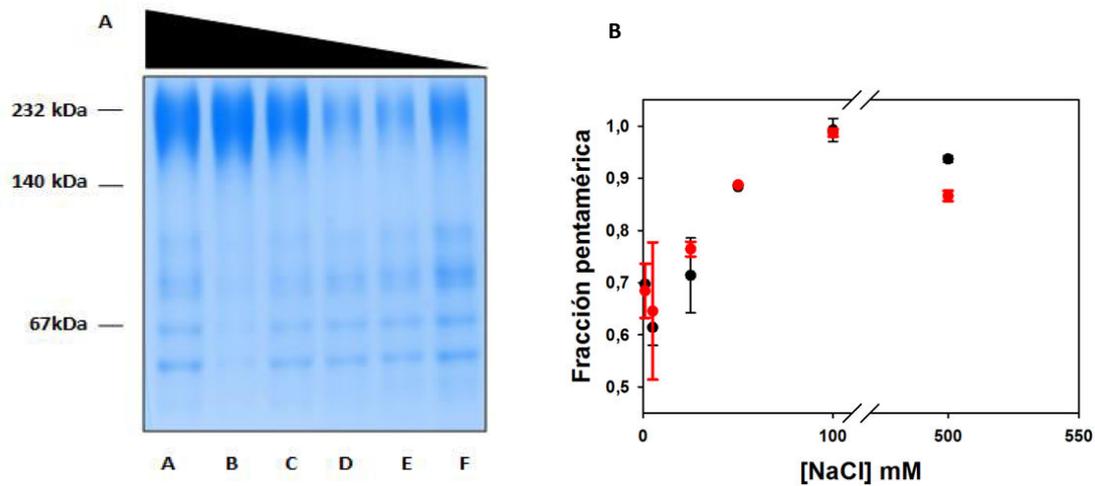


Figura 3.4. Efecto de la fuerza iónica del medio en el estado oligomérico de NPMmutA. (A) Gel nativo de poliacrilamida de NPMmutA incubado en tampón con NaCl: A, 500mM; B, 100 mM; C, 50 mM; D, 25 mM; E, 5 mM; F: 1mM. (B) Fracción pentamérica de NPM y NPMmutA estimada mediante cuantificación de las bandas de geles nativos de poliacrilamida con el software Quantity One (Bio-Rad). NPM sin incubación previa overnight a 1mM NaCl (negro), NPMmutA (rojo).

Si bien las bandas correspondientes al pentámero no están bien definidas y son más difusas, el análisis cuantitativo de las bandas de las diferentes muestras tras su incubación en tampón de distinta fuerza iónica indica que el pentámero de NPMmutA presenta la misma sensibilidad a fuerza iónica que la proteína salvaje (**Figura 3.4B**).

Si comparamos el efecto de la concentración salina sobre la fracción de NPMcore y de las construcciones de secuencia entera, NPM y NPMmutA, en estado pentamérico, podemos concluir que los dominios *linker* y/o C-term desestabilizan el estado oligomérico de la proteína. Dado que el dominio C-term de la NPMmutA se encuentra parcialmente degradado, es probable que el dominio *linker* determine la baja estabilidad del pentámero. La alta flexibilidad del dominio *linker*, de carga neta negativa, podría favorecer su localización (transitoria) en la proximidad de la cara distal del pentámero. Como a baja concentración de Na^+ (fuerza iónica baja) disminuye el apantallamiento de cargas, la presencia del *linker* favorecería una mayor repulsión entre los monómeros (también cargados negativamente), facilitando su disociación. Este fenómeno, semejante al que ejerce el dominio *cola* sobre el oligómero de la nucleoplasmina²², reduce drásticamente la estabilidad del pentámero de NPM frente a otros agentes desnaturizantes (manuscrito en preparación).

3.1.3. Reversibilidad del proceso de disociación del pentámero de NPM

Para determinar si el proceso de disociación del pentámero es reversible, se analizó la fracción de NPM oligomérica tras dializar la proteína *overnight* frente al tampón A con 1 mM NaCl e incubarla posteriormente *overnight* a diferentes concentraciones salinas. Tras cuantificar las bandas que aparecen en los geles nativos, observamos que la fracción de NPM pentamérica es equiparable a la obtenida por dilución directa (**Figura 3.5 A y B**), lo que demuestra que la disociación del pentámero de NPM es un proceso reversible.

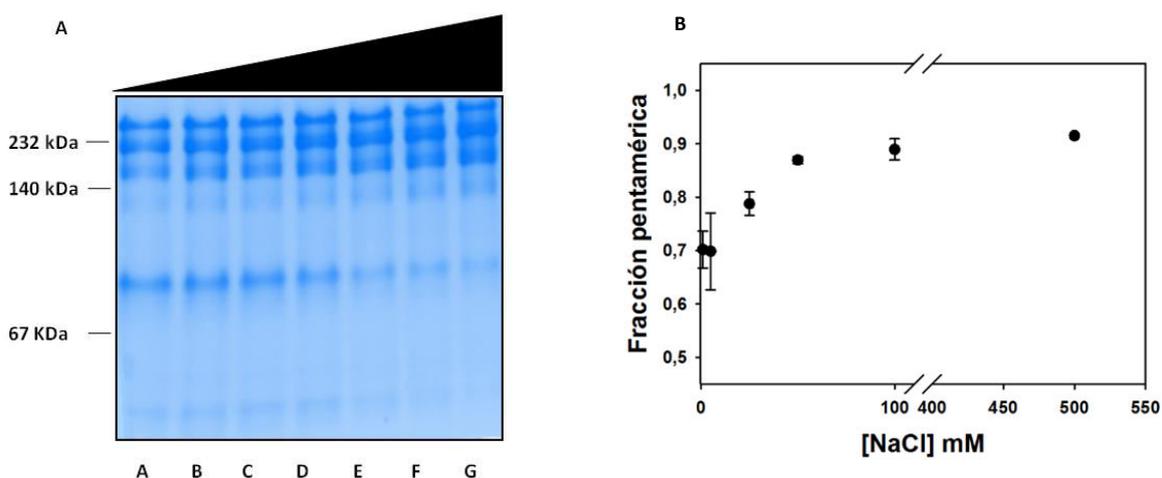


Figura 3.5. Reversibilidad de la disociación de la NPM pentamérica. (A) Gel nativo de poliacrilamida de NPM dializada *overnight* frente a tampón A con 1mM NaCl e incubada *overnight* con tampón que contiene NaCl: A, 1mM; B, 5mM; C, 15 mM; D, 25 mM; E, 50 mM; F, 100 mM; G, 500 mM. (B) Fracción de NPM pentamérica tras el proceso de reoligomerización.

3.1.4. Efecto de la fuerza iónica en la estructura secundaria del monómero de NPM

Dado que aproximadamente un 35% de la NPM se disocia a fuerza iónica baja, quisimos comprobar el estado de plegamiento del monómero existente. Para ello, comparamos los espectros de dicroísmo circular de NPM a alta y baja fuerza iónica. A 500 mM NaCl el espectro de la NPM muestra dos mínimos, así como un componente positivo a baja longitud de onda (**Figura 3.6**), de acuerdo a la presencia de estructura en hoja β y hélice α , así como estructura desordenada. A fuerza iónica baja, 1 mM, el espectro presenta un pequeño desplazamiento del mínimo (205 nm) hacia longitudes de onda inferiores, lo que sugiere un incremento del contenido de estructura desordenada. Por tanto, podemos concluir que el monómero de NPM existente a baja fuerza iónica se encuentra desplegado.

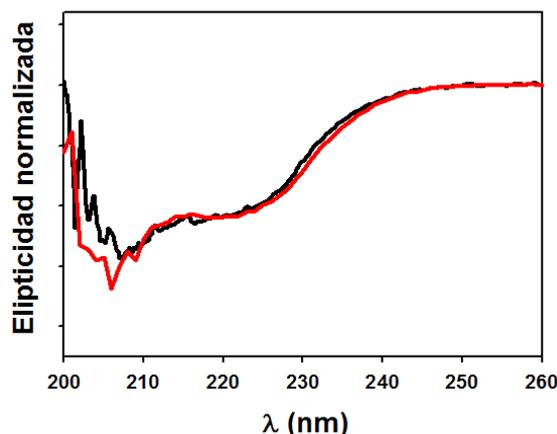


Figura 3.6. Espectros de dicroísmo circular de NPM. NPM a 500 mM NaCl (negro), 1mM NaCl (rojo).

3.2. EFECTO DEL ÁCIDO RETINOICO EN EL ESTADO OLIGOMÉRICO DE LA NPM

El ácido retinoico (AR) es ampliamente utilizado en el tratamiento de leucemias y linfomas²³. La administración de AR a células modelo de leucemia promielocítica aguda (APL) provoca la disociación del complejo NCOR-HDAC del gen del receptor alfa del ácido retinoico RAR α ²⁴, cuya transcripción desencadena la diferenciación de los promielocitos inmaduros a granulocitos maduros. Tras esta diferenciación, las células malignas sufren apoptosis, favoreciendo la remisión de la enfermedad. Dada la alta tasa de recuperación de los pacientes de APL tratados con AR, actualmente se está evaluando el efecto de esta sustancia en otro tipo de leucemias, como la AML.

Para determinar si el AR interfiere con el estado pentamérico de la NPM, analizamos el efecto del ácido retinoico en la fracción de pentámero de la proteína. Aunque el AR no favorece la disociación del pentámero en el rango de concentraciones utilizadas (datos no mostrados), nuestros resultados, preliminares, indican que cuando la NPM, parcialmente disociada a fuerza iónica baja (1 mM), se incuba posteriormente a 500 mM NaCl, la presencia de este compuesto dificulta la renaturalización del estado pentamérico. Tras cuantificar el porcentaje de oligomerización de NPM en presencia de diferentes concentraciones de ácido retinoico a distintas fuerzas iónicas (**Figura 3.7**), observamos que la fracción del pentámero de NPM es inferior cuando la muestra se incuba en presencia de AR, lo que abre una nueva vía para el estudio de este compuesto sobre la viabilidad de la células leucémicas.

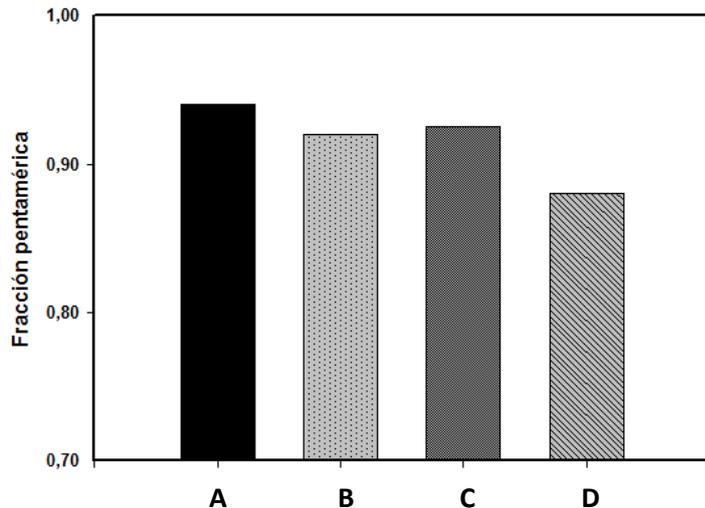


Figura 3.7. Fracción de pentámero de NPM tras incubar la proteína a 1 mM de NaCl y renaturalizarla en tampón: A, 500mM NaCl; B, 500mM NaCl más etanol; C, 500mM NaCl y 10 μ M AR; D, 500mM NaCl y 100 μ M AR.

4. CONCLUSIONES

- La reducción de la fuerza iónica del medio favorece la disociación del pentámero de nucleofosmina.
- El dominio *linker* de la NPM reduce la estabilidad del pentámero.
- El ácido retinoico podría interferir en el equilibrio monómero-pentámero de la NPM, desfavoreciendo el estado oligomérico.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Colombo, E., Alcalay, M. and Pelicci, PG. (2011) Nucleophosmin and its complex network: a possible therapeutic target in hematological diseases. *Oncogene*, 1-15.
- [2] Falini, B., Bolli N., Liso, A., Martelli, MP., Mannucci, R., Pileri, S. and Nicolett, I. (2009) Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications. *Leukemia*, 23: 1731-1743.
- [3] Federici, L. and Falini, B. (2013) Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: A tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Science*, 22: 545-556.
- [4] Lindström, MS.(2011) NPM1/B23: A multifunctional chaperone in ribosome biogenesis and chromatin remodeling. *Biochemistry Research International*, 195-209.
- [5] Lee, HH., Kim HS., Kang, JY., Lee, BI., Ha, JY., Yoon, HJ., Lim, SO., Jung, G. and Suh, SW. (2007) Crystal structure of human nucleophosmin-core reveals plasticity of the pentamer-pentamer interface. *Proteins*, 69: 672-678.

- [6] Okuwaki, M. (2008) The Structure and Functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a Multifunctional Nucleolar Acidic Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 143: 441-448.
- [7] Arregi, I., Falces, J., Olazabal-Herrero, A., Alonso-Mariño, M., Taneva, SG., Rodríguez, JA., Urbaneja, MA. and Bañuelos, S. (2015) Leukemia-Associated Mutations in Nucleophosmin Alter Recognition by CRM1: Molecular Basis of Aberrant Transport. *PLoS One*, 10(6): :e0130610
- [8] Bañuelos, S., Lectez, B., Taneva, SG., Ormaza, G., Alonso-Mariño, M., Calle, X. and Urbaneja, MA. (2013) Recognition of intermolecular G-quadruplexes by full length nucleophosmin. Effect of a leukaemia-associated mutation. *FEBS Letters*, 587: 2254-2259.
- [9] Grummitt, CG., Townsley, FM., Johnson, CM., Warren, AJ. and Bycroft, M. (2008). Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (34): 23326-23332.
- [10] Falini, B., Gionfriddo, I., Cecchetti, F., Ballanti, S., Pettirossi, V. and Martelli, MP. (2011) Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): Any hope for a targeted therapy? *Blood Reviews*, 25: 247-254.
- [11] Hingorani, K., Szebeni, A. and Olson, MO. (2000) Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32): 24451–24457.
- [12] Falini, B., Martelli, MP., Bolli, N., Sportoletti, P., Liso, A., Tiacci, E. and Haferlach, T. (2011) Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? *Blood*, 117(4): 1109-1120.
- [13] Mukherjee, H., Chan, KP., Andresen, V., Hanley, ML., Gjertsen, BT. and Myers, AG. (2015) Interactions of the Natural Product (+) Avrainvillamide with Nucleophosmin and Exportin-1 Mediate the Cellular Localization of Nucleophosmin and its AML-Associated Mutants. *ACS Chemical Biology*, 10 (3): 855-863.
- [14] Jian, Y., Gao, Z., Sun, J., Shen, Q., Feng, F., Jing, Y. and Yang, C. (2009) RNA aptamers interfering with nucleophosmin oligomerization induce apoptosis of cancer cells. *Oncogene*, 28: 4201–4211.
- [15] Qi, W. et al. (2008) NSC348884, a nucleophosmin inhibitor disrupts oligomer formation and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene*, 27(30): 4210–4220.
- [16] Mitrea DM., Grace, CR., Buljan, M., Yun, MK., Pytel, NJ., Satumba, J., Nourse, A., Park, CG., Babu, MM., White, SW. and Kriwacki, RW. (2013) Structural polymorphism in the N-terminal oligomerization domain of NPM1. *PNAS*, 111(12): 4466–4471.
- [17] Itahana, K., Bhat, KP., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R. et al. (2003) Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell*, 12: 1151–1164.
- [18] Young, P. and Gautel, M. (2000) The interaction of titin and alpha-actinin is controlled by a phospholipid-regulated intramolecular pseudoligand mechanism. *EMBO Journal*, 19: 6331–6340.
- [19] Frehlick, LJ., Eirín-López, JM. and Ausió, J. (2007) New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *BioEssays*, 29(1): 49-59.
- [20] Unni, S., Huang, Y., Hanson, RM., Tobias, M., Krishnan, S., Li, WW. et al. (2011) Web servers and services for electrostatics calculations with APBS and PDB 2PQR. *Journal of Computational Chemistry*, 32: 1488–1491.
- [21] Chan, PK., Chan, FY. (1995) Nucleophosmin/B23 (NPM) oligomer is a major and stable entity in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta*, 1262: 37-42.
- [22] Taneva, SG., Muñoz, I., Franco, G., Falces, J., Arregi, I., Muga, A. et al. (2008) Activation of nucleoplasmin, an oligomeric histone chaperone, challenges its stability. *Biochemistry*, 47: 13897–13906.
- [23] Chen, MC., Hsu, SL., Lin, H., Yang, TY. (2014) Retinoic acid and cancer treatment *BioMedicine*, 4(4): 1-6
- [24] 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