

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**INTERACCIONES DE LOS MICROTÚBULOS CON
LIGANDOS ACTIVADORES DE TUBULINA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Rubén Martínez Buey

Bajo la dirección del doctor
José Fernando Díaz Pereira

Madrid, 2005

ISBN: 84-669-2724-7

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



INTERACCIONES DE LOS
MICROTÚBULOS CON LIGANDOS
ACTIVADORES DE TUBULINA

TESIS DOCTORAL
Rubén Martínez Buey
Centro de Investigaciones Biológicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Madrid, 2005

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



INTERACCIONES DE LOS MICROTÚBULOS CON LIGANDOS ACTIVADORES DE TUBULINA

TESIS DOCTORAL
Rubén Martínez Buey
Director: Dr. José Fernando Díaz Pereira
Centro de Investigaciones Biológicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Madrid, 2005

Agradecimientos

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que, de alguna u otra forma, han contribuido a la realización de este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer a Fernando Díaz, el director de esta tesis, la oportunidad que me concedió para realizar este trabajo. A José Manuel Andreu (en mi opinión, un modelo científico a seguir), le tengo que agradecer la oportunidad que me brindó al aceptarme en su grupo. A ambos les tengo que agradecer todo lo que he aprendido durante este tiempo y la ayuda que me han prestado. Pienso que este laboratorio es, sin duda, uno de los mejores laboratorios de biofísica/bioquímica de España.

A Isabel Barasoain (CIB), le tengo que agradecer el trabajo de biología celular con que ha contribuido a esta tesis, que es una parte fundamental de la misma.

A la Unidad de Proteómica del CNIC, y en especial a Enrique Calvo, les tengo que agradecer su aportación en este trabajo y lo que he aprendido de espectrometría de masas. A su vez, también tengo que agradecer a Alicia Prieto (CIB) y a Andres Francesch (PharmaMar), su contribución con algunos de los experimentos de espectrometría de masas de este trabajo.

Quiero, también, dar las gracias a todas aquellas personas con las que hemos colaborado, por su ayuda y por los ligandos que nos han cedido. En primer lugar, tengo que agradecer a Ernest Hamel (NCI, Frederick) su colaboración con la ciclostreptina, la ayuda que nos ha prestado con otros ligandos y el enorme número de compuestos que nos ha cedido amablemente. A Thomas N. Gaitanos y John H. Miller (Univ. Victoria, Wellington) le agradezco su colaboración en el trabajo del pelorusido A. A Pareskevi Giannakakou (Univ. Cornell, Nueva York) le agradezco su contribución con el lonafarnib y todos los compuestos que nos ha enviado. A K. C. Nicolaou (Inst. Scripps, La Jolla) le agradezco todos los derivados de eptilona que

nos dado generosamente y su ayuda con este trabajo. A Susan Mooberry (SFBR, San Antonio) le agradezco su colaboración con las tacalonolidas.

También quiero agradecer a Antonia Miglietta (Univ. Torino), a Ian Paterson (Univ. Cambridge) y a Paco Amat (IQO, Madrid) el que nos hayan enviado ligandos.

A mi tutora en la UCM, Mercedes Oñaderra, por toda su ayuda con el proceso burocrático.

A la gente del laboratorio (a los que están y a los que ya se han ido; Martín, Ana, Marian, Hugo, Marta, Sonia, Ruth y Laura), les tengo que agradecer los buenos ratos que hemos pasado juntos en el laboratorio, la paciencia que han tenido conmigo y toda la ayuda prestada, que no es poca. A Pablo, Mon, Vanesa y Nacho les agradezco el "huequecillo" que me han hecho en su laboratorio. A Germán Rivas, y a su grupo por tener siempre la puerta abierta. ¡Es un verdadero placer trabajar rodeado de gente así!

También quiero agradecer de forma especial a mi familia (Juan A., Petra, Sonia y Lourdes) el apoyo que me siempre me ha dado y que aún me sigue dando. Y por supuesto, a Mónica le tengo dar millones de gracias por estar siempre ahí, ayudándome, apoyándome y aguantándome. En cierto modo, este trabajo también les pertenece.

Índice general

Índice de Figuras y Tablas

Abreviaturas

Objetivos.....	21
----------------	----

Introducción

1. Patología y farmacología del cáncer.....	25
2. El citoesqueleto celular.....	27
2.1. Tubulina.....	28
2.2. Microtúbulos.....	29
2.3. Proteínas asociadas a microtúbulos.....	32
3. La tubulina como componente principal de los microtúbulos	
3.1. Polimerización de microtúbulos.....	33
3.2. Comportamiento dinámico de los microtúbulos.....	34
3.3. El ciclo GTPasa de la tubulina.....	35
3.4. Bases bioquímicas de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos.....	38
3.5. Bases estructurales de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos.....	39
4. La tubulina como diana farmacológica.....	44
4.1. Ligandos desactivadores de tubulina	
4.1.1. Compuestos que se unen al dominio vinca.....	47
4.1.2. Compuestos que se unen al sitio de colchicina.....	49
4.2. Ligandos activadores de tubulina	
4.2.1. Compuestos que se unen al sitio de taxol.....	49
4.2.1.1. Mecanismo de acción del taxol.....	53
4.2.2. Compuestos que se unen al sitio de laulimalida.....	56

Materiales y Métodos

1. Ligandos y productos químicos

1. 1. Ligandos.....	61
1. 2. Productos químicos.....	62
1.3. Tampones.....	63

2. Proteínas

2.1. Preparación de tubulina.....	64
2.1.1. Preparación de tubulina GDP.....	65
2.1.2. Preparación de tubulina GTP.....	65
2.2. Preparación de proteína microtubular.....	66
2.3. Preparación de microtúbulos estabilizados.....	67
2.3.1. Medida de la concentración de sitios de taxol en microtúbulos estabilizados.....	67

3. Efectos de los ligandos en células

3.1. Cultivos celulares.....	68
3.2. Inmunofluorescencia indirecta.....	69
3.3. Ensayos de citotoxicidad.....	69
3.4. Análisis del ciclo celular.....	70

4. Modulación del ensamblaje de tubulina por ligando

4.1. Ensamblaje de tubulina inducido por ligando.....	70
4.2. Modulación del ensamblaje de tubulina pura por los ligandos	71
4.3. Modulación del ensamblaje de proteína microtubular por los ligandos.....	72
4.4. Estabilización de los microtúbulos frente al frío por los ligandos.....	72

5. Estructura de los microtúbulos inducidos por ligando

5.1. Microscopía electrónica.....	72
5.2. Medidas de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS).....	73

6. Interacción de los ligandos con los microtúbulos

6.1. Determinación de la unión de ligandos a microtúbulos

6.1.1. Determinación de la unión de ligandos a microtúbulos por HPLC.....	74
6.1.2. Unión de pelorusido A a los microtúbulos.....	74

6.1.3. Interacción de la ciclostreptina con tubulina no polimerizada y con microtúbulos	
6.1.3.1. Unión de la ciclostreptina a los microtúbulos.....	75
6.1.3.2. Caracterización de la molécula de ciclostreptina por espectrometría de masas.....	76
6.1.3.2. Determinación de los residuos de tubulina modificados por ciclostreptina en los microtúbulos.....	78
6.1.3.3. Determinación de los residuos modificados por ciclostreptina en la tubulina no polimerizada.....	79
6.2. Afinidad de unión de los ligandos por los microtúbulos	
6.2.1. Medidas de anisotropía de fluorescencia.....	80
6.2.2. Determinación de constantes de afinidad de flutax-2 a microtúbulos estabilizados.....	81
6.2.3. Determinación de constantes de afinidad de equilibrio de ligandos a microtúbulos estabilizados.....	82
6.3. Inhibición de la unión de ligandos por ciclostreptina	
6.3.1. Inhibición por ciclostreptina de la unión de [³ H]-taxol, [³ H]-discodermolida, [¹⁴ C]-epotilona B o flutax-2 a los microtúbulos.....	85
6.3.2. Inhibición por ciclostreptina de la unión de flutax-2 a los microtúbulos.....	86
6.3.3. Cinética de disociación de flutax-2 inducida por ciclostreptina.....	86
6.3.4. Actividad biológica de la ciclostreptina epoxidada.....	87

Resultados

1. Mecanismos moleculares de la estabilización de microtúbulos inducida por ligandos.....	91
1.1. Efectos de los ligandos en células	
1.1.1. Efectos de los ligandos sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear.....	92
1.1.2. Efectos de los ligandos sobre el ciclo celular.....	95
1.1.3. Citotoxicidad de los ligandos.....	96

1.2. Efectos de los ligandos en el ensamblaje de tubulina

1.2.1. Ensamblaje de tubulina inducido por ligando.....	97
1.2.2. Estructura de los microtúbulos inducidos por ligando.....	100
1.2.3. Efecto sinérgico del taxol/laulimalida y taxol/pelorusido A en la inducción del ensamblaje de tubulina.....	102
1.2.4. Modulación del ensamblaje de tubulina pura por los ligandos	102
1.2.5. Modulación del ensamblaje de proteína microtubular por los ligandos.....	104
1.2.6. Estabilización de los microtúbulos frente al frío por los ligandos.....	104

1.3. Unión de los ligandos a los microtúbulos

1.3.1. Unión de los ligandos del sitio de taxol a los microtúbulos.....	106
1.3.2. Unión irreversible de ciclostreptina a los microtúbulos.....	107
1.3.3. Unión de los ligandos al sitio de taxol.....	108
1.3.4. Parámetros termodinámicos de la unión de los ligandos al sitio de taxol.....	110
1.3.5. Unión de los ligandos del sitio de laulimalida a los microtúbulos.....	112

2. Interacción de análogos de epotilona con el sitio de unión de taxol

2.1. Mecanismos de estabilización de microtúbulos por epotilonas.....	114
2.2. Unión de análogos de epotilonas a microtúbulos estabilizados.....	116
2.3. Modificación de los parámetros termodinámicos debido a la modificación de los grupos químicos de la molécula.....	118
2.4. Comparaciones entre la afinidad de unión, la actividad estabilizadora de microtúbulos y la citotoxicidad de los derivados de epotilona.....	121

3. Caracterización funcional del sitio de taxol mediante marcaje covalente con ciclostreptina

3.1. La ciclostreptina bloquea la unión de ligandos al sitio de taxol.....	124
3.2. La ciclostreptina desplaza al flutax-2 por un mecanismo diferente al del docetaxel.....	126
3.3. Actividad biológica de la ciclostreptina epoxidada.....	129
3.4. Determinación de los residuos de tubulina modificados por ciclostreptina en los microtúbulos.....	130

3.5. Determinación de los residuos de tubulina no polimerizada modificados por ciclostreptina.....	133
--	-----

Discusión

1. Interacción de los ligandos estabilizadores de microtúbulos con la tubulina

1.1. Clasificación de los compuestos descritos como estabilizadores de microtúbulos.....	137
1.2. Diversidad química de los estabilizadores de microtúbulos que se unen al sitio de taxol.....	139
1.3. Parámetros termodinámicos de la unión de los ligandos al sitio de taxol.....	142
1.4. Correlaciones entre la afinidad de unión y la estabilización de microtúbulos de los ligandos del sitio de taxol.....	146
1.5. Relaciones entre la termodinámica de unión de los ligandos al sitio de taxol y la citotoxicidad	147
1.6. Los ligandos del sitio de laulimalida como potenciales fármacos antitumorales.....	150

2. Interacción de las epotilonas con los microtúbulos

2.1. Parámetros termodinámicos de la unión de derivados de epotilona al sitio de taxol.....	152
2.2. Relaciones estructura-afinidad y modificación de los parámetros termodinámicos debido a la modificación de los grupos químicos de la molécula..	154
2.2.1. Modificaciones en la estereoquímica del C15.....	155
2.2.2. Modificaciones de la cadena lateral en C15.....	157
2.2.3. Cambio del sustituyente del C21.....	158
2.2.4. Modificaciones en el C12.....	159
2.2.5. Sustitución del grupo epóxido.....	160
2.2.6. Introducción de un grupo metilo en C12.....	160
2.2.7. Resumen del estudio de estructura-actividad de epotilonas.....	161
2.3. Correlaciones ente afinidades de unión y estabilización de microtúbulos de los derivados de epotilona.....	163

2.4. Correlaciones entre afinidades de unión y citotoxicidad de los derivados de epotilona.....	164
3. Predicción de la citotoxicidad de ligandos a través de la determinación de los parámetros termodinámicos de unión al sitio de taxol.....	167
4. Mecanismos de ensamblaje de microtúbulos inducido por ligando.....	169
5. Mecanismos de unión de ligandos al sitio taxol.....	174
Conclusiones.....	181
Bibliografía.....	185
Publicaciones a las que ha dado lugar este trabajo de tesis doctoral.....	203

Índice de Figuras y Tablas

1. Figuras

Introducción

Figura 1. Esquema de los diferentes niveles de actuación de los fármacos antineoplásicos.....	26
Figura 2. Estructura tridimensional del dímero de tubulina.....	29
Figura 3. Representación de la estructura de los microtúbulos.....	30
Figura 4. Vista de las interacciones laterales entre dos protofilamentos de un microtúbulo.....	32
Figura 5. Inmunofluorescencia de células de osteosarcoma en las diferentes etapas de la mitosis.....	34
Figura 6. Esquema de la dinámica de los microtúbulos.....	35
Figura 7. Esquema simplificado del ciclo de actividad GTPasa en la tubulina.....	37
Figura 8. Dinámica de la polimerización de tubulina y modelo del tapón de tubulina GTP.....	39
Figura 9. Cambios en la subunidad beta de la tubulina entre las estructuras recta y curva.....	40
Figura 10. Representación simplificada del cambio de conformación recta a curva del dímero de tubulina.....	41
Figura 11. Posiciones relativas de los monómeros de tubulina dentro de los diferentes tipos de protofilamento.....	43
Figura 12. Diferencias estructurales de los dímeros de tubulina en las diferentes conformaciones observadas.....	44
Figura 13. Diferentes sitios de unión de ligandos anti-mitóticos en el dímero de tubulina.....	46
Figura 14. Esquema simplificado del ciclo de actividad GTPasa de la tubulina y los ligandos que bloquean este ciclo.....	47
Figura 15. Mecanismo de acción del taxol.....	55

Materiales y Métodos

Figura 16. Espectro de masas de la molécula de ciclostreptina.....	76
Figura 17. Espectro de fragmentación de la molécula de ciclostreptina.....	77
Figura 18. Fórmulas químicas del flutax-1 y flutax-2.....	81

Resultados

Figura 19. Esquema del proceso empleado en este trabajo para la clasificación de los ligandos descritos como estabilizadores de microtúbulos.....	92
Figura 20. Fórmulas químicas de los compuestos descritos en la bibliografía como estabilizadores de microtúbulos, que se han utilizado en este trabajo.....	93
Figura 21. Efectos de los ligandos sobre los microtúbulos de la interfase en células A549.....	94
Figura 22. Efectos de los ligandos sobre el ciclo en células U937.....	96
Figura 23. Micrografías electrónicas de microtúbulos inducidos por ligando.....	100
Figura 24. Perfiles de dispersión de rayos-X a bajo ángulo de los microtúbulos inducidos por ligando.....	100
Figura 25. Sinergia en el ensamblaje de tubulina inducido por taxol y pelorusido A.....	102
Figura 26. Efectos de los ligandos sobre el ensamblaje de tubulina inducido por glicerol.....	103
Figura 27. Estabilización de los microtúbulos frente al frío.....	105
Figura 28. Unión de los ligandos del sitio de taxol a los microtúbulos.....	107
Figura 29. Unión irreversible de la ciclostreptina a los microtúbulos.....	108
Figura 30. Competición entre los ligandos y el flutax-2 por el sitio de unión de taxol en microtúbulos estabilizados.....	109
Figura 31. Unión de pelorusido A y laulimalida a los microtúbulos y desplazamiento del pelorusido A por laulimalida, pero no por taxol.....	112
Figura 32. Caracterización bioquímica del ensamblaje de tubulina inducido por epotilona.....	115

Figura 33. Requerimiento de iones magnesio para el ensamblaje de tubulina GTP inducido por epotilona.....	116
Figura 34. Competición entre flutax-2 y los derivados de epotilona por el sitio de unión de taxol en microtúbulos estabilizados.....	117
Figura 35. Esquema de las estructuras de los análogos de epotilona usados en este estudio, las diferencias químicas que existen entre ellos y el efecto de esas modificaciones en la energía libre aparente de unión a su sitio en microtúbulos estabilizados.....	120
Figura 36. Isotermas de unión de flutax-2 a microtúbulos estabilizados pre-incubados con ciclostreptina.....	125
Figura 37. Cinética de desplazamiento de flutax-2 de su sitio en microtúbulos estabilizados por ciclostreptina.....	127
Figura 38. Estructura química de la ciclostreptina.....	129
Figura 39. Análisis cromatográfico de los péptidos trípticos y quimotrípticos de las muestras de microtúbulos tratadas con ciclostreptina.....	130
Figura 40. Péptidos trípticos y quimotrípticos modificados por ciclostreptina en las muestras de microtúbulos.....	131
Figura 41. Determinación de los residuos de tubulina en los microtúbulos modificados por ciclostreptina mediante espectrometría de masas.....	132
Figura 42. Análisis cromatográfico de los péptidos trípticos y quimotrípticos de las muestras de tubulina dimérica tratadas con ciclostreptina.....	134

Discusión

Figura 43. Representación del taxol y de la epotilona A unidos al sitio de taxol..	141
Figura 44. Representación de van't Hoff para la reacción de unión de dos ligandos del sitio de taxol.....	143
Figura 45. Correlación entre las contribuciones entálpica y entrópica aparentes, a la unión de los ligandos.....	144
Figura 46. Correlación entre la entalpía y la energía libre de unión de los ligandos al sitio de taxol.....	145

Figura 47. Comparación entre la energía libre de unión y de elongación de microtúbulos, de los ligandos del sitio de taxol.....	147
Figura 48. Comparación entre las afinidades de unión y la citotoxicidad de los ligandos del sitio de taxol, en células 1A9.....	148
Figura 49. Representación de las contribuciones entálpica y entrópica, a la unión de los derivados de epotilona.....	152
Figura 50. Representación de la entalpía frente a la energía libre de unión de los derivados de epotilona.....	153
Figura 51. Representación del sitio de taxol con una molécula de epotilona A unida.....	155
Figura 52. Representación simplificada del sitio de taxol con una molécula de epotilona A unida.....	156
Figura 53. Esquema-resumen de las relaciones estructura-actividad para la unión a microtúbulos de análogos de epotilonas modificados en C12, en C15 y en la cadena lateral.....	162
Figura 54. Dependencia de la constante de elongación del ensamblaje inducido por ligando, de la constante de unión de los análogos de epotilona al sitio de taxol en microtúbulos estabilizados.....	164
Figura 55. Comparación entre la afinidad de unión y la citotoxicidad de los derivados de epotilona en células 1A9.....	165
Figura 56. Dependencia de la concentración crítica aparente del ensamblaje inducido por ligando, con la concentración de ligando libre.....	172
Figura 57. Representación del poro de tipo I en los microtúbulos.....	175
Figura 58. Esquema del mecanismo propuesto para la unión de la ciclostreptina al sitio de taxol.....	176

2. Tablas

Introducción

Tabla 1. Compuestos anti-mitóticos, sus sitios de unión en la tubulina y sus usos terapéuticos o fase de desarrollo clínico.....	45
---	----

Resultados

Tabla 2. Citotoxicidad de los ligandos y efectos sobre el ciclo celular.....	97
---	----

Tabla 3. Concentraciones críticas de las reacciones de ensamblaje de tubulina GTP o tubulina GDP.....	99
--	----

Tabla 4. Posiciones de los máximos de la función de dispersión de rayos-X en disolución de los microtúbulos inducidos por ligando.....	101
---	-----

Tabla 5. Concentraciones críticas de las reacciones de ensamblaje de proteína microtubular en presencia de ligando.....	104
--	-----

Tabla 6. Parámetros termodinámicos aparentes de la reacción de unión de los ligandos al sitio de taxol, determinados a partir de las curvas de desplazamiento del análogo fluorescente de taxol flutax-2.....	111
--	-----

Tabla 7. Parámetros termodinámicos aparentes de la unión de los análogos de epotilona al sitio de taxol en los microtúbulos, determinados a partir del desplazamiento del flutax-2.....	119
--	-----

Tabla 8. Incremento en los parámetros termodinámicos de la unión de los análogos de epotilonas a microtúbulos.....	121
---	-----

Tabla 9. Comparación de las afinidades de unión, las concentraciones críticas del ensamblaje de microtúbulos inducido por ligando y la citotoxicidad de los derivados de epotilona.....	122
--	-----

Tabla 10. Unión de ligandos a microtúbulos preincubados con ciclostreptina, epotilona A, epotilona B y taxol.....	124
--	-----

Discusión

Tabla 11. Resumen de los resultados del estudio comparativo de todos los ligandos utilizados en este trabajo.....	140
--	-----

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ASN	Asparagina
BSA	Albúmina de suero bovino
CCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
CCD	Artefacto de doble carga
Cps	Cuentas por segundo
Cr	Concentración crítica
Da	Dalton, unidad de masa atómica
ddGTP	Di-desoxi-guanosín trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNasa	Actividad hidrolítica de ADN
EDTA	Ácido etilendiamino-tetracético
EGTA	Ácido etilenglicol -N,N,N',N' - bis-(2-aminoetiléter) tetracético
ESI	Ionización por electro-spray
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GDP	Difosfato de guanosina
GMPCPP	Guanosín-[(α,β)-metileno]-trifosfato
GTP	Trifosfato de guanosina
GTPasa	Actividad hidrolítica de GTP
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LIT	Trampa iónica lineal
MALDI	Ionización/desorción por láser asistida por matriz
Mes	Ácido 2-[N-morfolino]-etanosulfónico
MRM	Rastreo múltiple de iones precursores en alta sensibilidad
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio)
RNasa	Actividad hidrolítica de ARN

PDB	Banco de datos de proteínas
Pipes	Ácido piperacín-N,N' -bis[2-etanosulfónico]
SAXS	Dispersión de rayos-X a bajo ángulo
SDS	Dodecil sulfato sódico
THR	Treonina
TOF	Tiempo de vuelo
Tris	Tris-(hidroximetil) aminoetano
Uma	unidad de masa atómica, Da
UV	Ultravioleta

Objetivos

Muchos de los compuestos que interaccionan con microtúbulos son importantes agentes antitumorales que se usan actualmente en el tratamiento del cáncer, entre los que destaca el taxol. No obstante, éste tiene serias desventajas que limitan su aplicabilidad como la aparición de resistencias o los diversos efectos secundarios. Esto ha propiciado una búsqueda intensiva de compuestos con una actividad similar en todo tipo de organismos, y como consecuencia, han ido aparecido nuevas moléculas con propiedades antimitóticas similares a las del taxol, que son efectivos en líneas celulares resistentes a éste. Dada la gran diversidad química y las diferentes dianas celulares que estos compuestos pueden tener, se hace necesaria la clasificación y caracterización de los mecanismos de acción de dichos compuestos y el desarrollo de procedimientos para la evaluación de su actividad.

Por ello, en el presente trabajo de tesis doctoral se fijaron los siguientes objetivos:

1. Clasificación de los compuestos descritos como estabilizadores de microtúbulos.
2. Estudio de los mecanismos de estabilización de microtúbulos inducida por los ligandos del sitio de taxol.
3. Determinación de los parámetros necesarios para la predicción fiable de la citotoxicidad de los ligandos del sitio de taxol.
4. Determinación de las relaciones estructura-actividad de un grupo de ligandos del sitio de taxol, químicamente relacionados (epotilonas).
5. Estudio de los mecanismos de unión de los ligandos al sitio de taxol.

Introducción

1. Patología y farmacología del cáncer

El cáncer es actualmente una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad humana. Es la segunda causa de muerte en los países occidentales, precedido por las enfermedades cardiovasculares y la primera causa de pérdida de años potenciales de vida. En el año 2000, 6.2 millones de personas murieron en todo el mundo como consecuencia de tumores malignos y se piensa que esta cifra podría aumentar hasta casi 15 millones en el año 2020.

Bajo la denominación de cáncer, se engloba a un grupo numeroso y heterogéneo de enfermedades malignas, con origen genético monoclonal, caracterizadas por una proliferación celular anormal, anaplásica, autónoma, progresiva y destructiva (Cotran y col., 1999). Comienza por una falta de control en el proceso de reproducción celular en un tejido en el que las células se reproducen de forma autónoma, anárquica e irreversible, sin regulación ni finalidad. La pérdida de la capacidad celular de realizar apoptosis se traduce en la aparición del fenómeno de metástasis, que es el rasgo biológico más característico de esta enfermedad. El nuevo tejido patológico, así formado, tiene tendencia a expandirse a través de las vías linfáticas o hemáticas, formando nuevos focos tumorales o metástasis en órganos distantes, donde continúa la expansión (Cotran y col., 1999).

Afortunadamente, en los últimos años se ha elevado el número de personas cuya enfermedad ha remitido. Este avance se debe, en gran parte, al resultado de un mayor conocimiento y comprensión de los aspectos biológicos de esta enfermedad. El enorme interés en el conocimiento de esta enfermedad, desde enfoques muy diferentes, se ha traducido en un extenso y exhaustivo estudio biológico y farmacológico destinado a desarrollar nuevos fármacos que, de forma selectiva, eliminen las células enfermas.

Actualmente, uno de los tratamientos antitumorales más exitosos, y por tanto más extendidos, se basa en la administración de diversos compuestos químicos con fines terapéuticos. La vía común por la que los agentes quimioterapéuticos ejercen su efecto citotóxico en la célula es la inducción de apoptosis como respuesta a la aparición de daños irreparables en las células. Este

efecto se puede lograr actuando a diferentes niveles, como son la alteración del ADN o ARN, la inhibición de la transcripción o de la síntesis proteica, o la inhibición de la mitosis, ya que todos estos procesos están potenciados en las células tumorales (figura 1). En muchas ocasiones, para alcanzar remisiones completas del tumor, es preciso emplear más de un fármaco, ya que de esta manera se amplía el espectro de actividad del tratamiento, cubriendo líneas celulares resistentes a un solo medicamento y retrasando la aparición de nuevas resistencias.

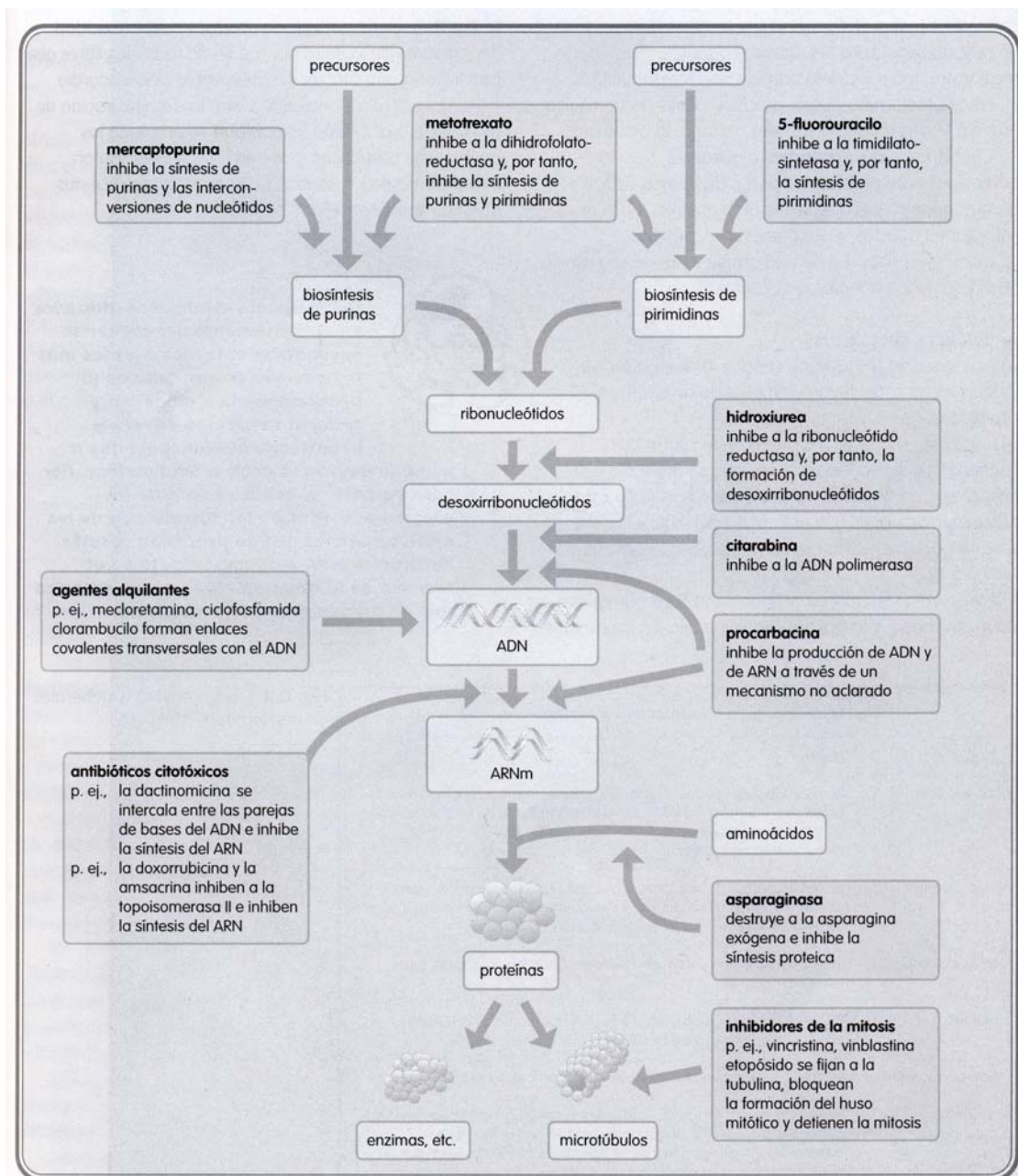


Figura 1. Esquema de los diferentes niveles de actuación de los fármacos antineoplásicos. Tomada de (Taylor y Reide, 2001).

No obstante, estos agentes quimioterapéuticos, además de erradicar la enfermedad, pueden crear diversos efectos secundarios adversos al paciente debido a que su mecanismo de acción es inespecífico, es decir, pueden afectar tanto a células sanas como a células tumorales. La escasa especificidad de estos fármacos por las células tumorales ocasiona la grave afección de otros órganos y tejidos, dando así origen a una toxicidad que casi siempre limita las posibilidades de administración de la dosis total teórica. Lógicamente, las células sanas más afectadas son las que presentan mayor velocidad de división y crecimiento, es decir, las células blásticas de la médula ósea, las células gonadales y las de los diversos epitelios (mucosa, piel y órganos dérmicos, como el folículo piloso y las uñas). Junto a ello, existe una toxicidad que implica a determinados órganos con cierta especificidad, siendo los más frecuentemente afectados el pulmón, el hígado, el riñón y las estructuras nerviosas (Leza y col., 2005).

El presente trabajo de tesis doctoral se centra en el estudio de los mecanismos de acción de los compuestos antitumorales que bloquean la mitosis celular mediante la interacción con el citoesqueleto de microtúbulos. La finalidad de este trabajo es doble. En primer lugar, se pretende profundizar en el conocimiento de estas estructuras celulares de importancia vital en los procesos de división celular. Por otro lado, el trabajo está motivado, en gran medida, por las posibles aplicaciones que pueda tener en el campo de la quimioterapia antineoplásica.

2. El citoesqueleto de microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras proteicas que forman parte esencial del citoesqueleto celular. Entre sus funciones destacan la de contribuir al mantenimiento de la forma celular, servir como pistas para el transporte intracelular, ser los componentes principales de cilios y flagelos y formar el huso mitótico, imprescindible para la división celular (Alberts y col., 1989).

2.1. Tubulina

La tubulina es el componente principal de los microtúbulos. Es una proteína de 100 kDa (calculados a partir de su secuencia peptídica (Krauhns y col., 1981; Ponstingl y col., 1981)) cuya secuencia se encuentra muy conservada en todos los organismos eucariotas (Burns y Surridge, 1990). En bacterias, la proteína FtsZ, componente esencial del divisoma, es estructuralmente homóloga a la tubulina eucariótica (Lowe y Amos, 1998), a pesar de la baja homología de secuencia existente entre estas dos proteínas (Nogales y col., 1998a). Recientemente, se han encontrado genes de tubulina en bacterias del género *Prostheco bacter* (Jenkins y col., 2002), que parecen haberse adquirido por transferencia génica horizontal (Schlieper y col., 2005). No obstante, se desconoce la función de estas proteínas en estas células bacterianas.

La molécula de tubulina está compuesta por dos monómeros: alfa y beta. Cada monómero contiene alrededor de 450 aminoácidos y un nucleótido de guanina. Los monómeros alfa y beta comparten aproximadamente el 40% de identidad de secuencia y sus estructuras tridimensionales son muy similares (Nogales y col., 1998b) (figura 2). Ambas subunidades, alfa y beta, están formadas por dos láminas beta de 6 y 4 cadenas, respectivamente, flanqueadas por 12 hélices alfa. La estructura de cada monómero se puede dividir en tres dominios. El dominio N-terminal, incluye los primeros 205 residuos y adopta un plegamiento de tipo Rossman (típico de proteínas que unen nucleótido), donde las cadenas beta paralelas alternan con hélices alfa. El dominio intermedio, que comprende los residuos 206-381, está compuesto de una lámina beta rodeada por cinco hélices y su secuencia es homóloga a la de la proteína corismato mutasa (Nogales y col., 1998a) y a la de proteínas de la familia YgjF (Volz, 1999). El dominio C-terminal está formado por dos largas hélices alfa, que se superponen sobre los dominios N-terminal e intermedio. Este dominio parece estar implicado en la unión de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) y proteínas motoras (Cross y col., 1991).

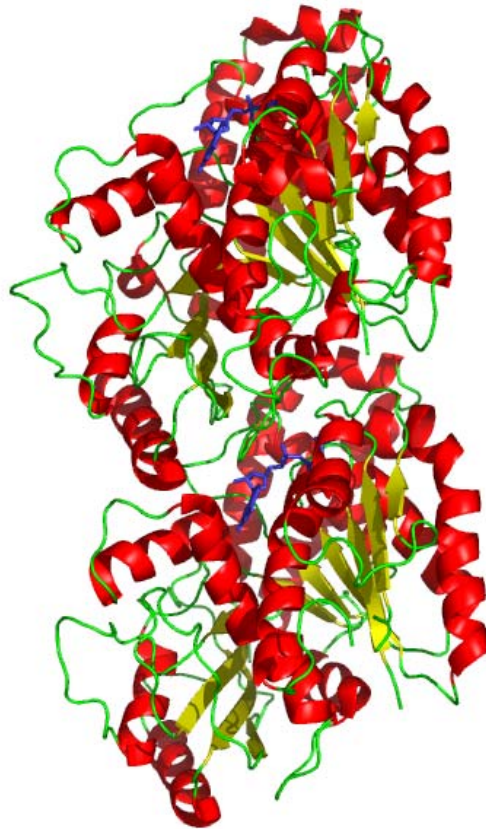


Figura 2. Estructura tridimensional del dímero de tubulina (código PDB 1JFF). Se muestra la subunidad alfa (abajo) unida a GTP y la subunidad beta (arriba) unida a GDP. Las cadenas beta están coloreadas en amarillo y las hélices alfa en rojo. El GTP y el GDP se están coloreados en azul.

2.2. Microtúbulos

Los microtúbulos son polímeros proteicos cilíndricos de unos 25 nm de diámetro y longitud variable. Los dímeros de tubulina interaccionan cabeza con cola para formar protofilamentos rectos que posteriormente se asocian de forma paralela, estableciendo contactos laterales entre ellos, para formar la pared cilíndrica del microtúbulo (figura 3). El número de protofilamentos que constituyen el microtúbulo puede variar *in vitro* desde 9 hasta 16 (Chretien y Wade, 1991), en función de las condiciones de la disolución y de las proteínas y/o ligandos asociados.

Dado que los dímeros de tubulina asocian cabeza con cola para formar protofilamentos que se organizan de forma paralela dentro del microtúbulo, éste tiene una polaridad, determinada por las diferencias de sus extremos. En cada microtúbulo, existe un "extremo +" (compuesto por beta tubulina) y un "extremo -" (compuesto por alfa tubulina) y las propiedades de ambos extremos son totalmente

diferentes entre sí, siendo ésta una característica de vital importancia para la función de estos polímeros.

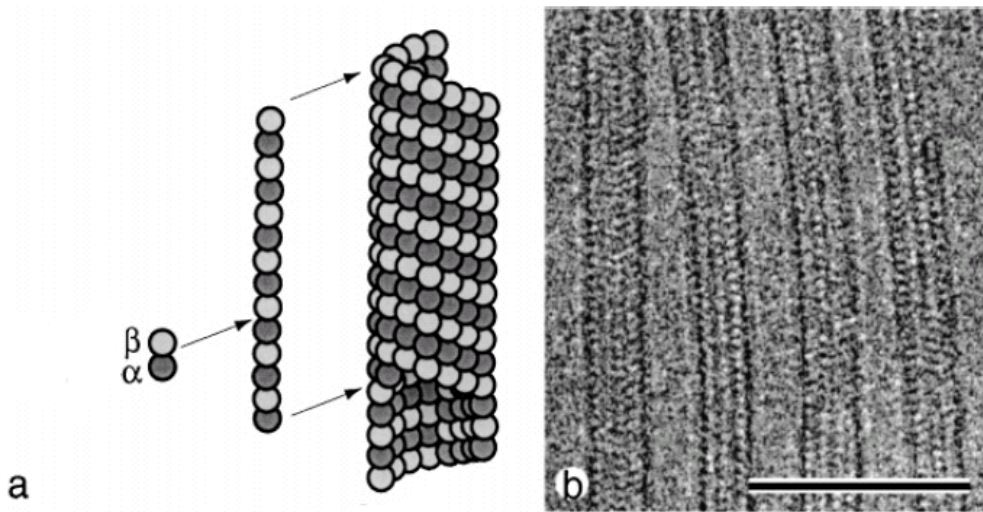


Figura 3. Representación de la estructura de los microtúbulos. A. Representación esquemática del dímero de alfa-beta tubulina con los monómeros representados como esferas en diferentes tonos de gris. Los dímeros interactúan linealmente (cabeza con cola) para formar protofilamentos rectos que posteriormente asocian lateralmente para formar la pared cilíndrica del microtúbulo. Panel B. Micrografías electrónicas de microtúbulos preparados por congelación rápida en una capa ultrafina de tampón. Tomado de (Downing, 2000).

La estructura de los microtúbulos y los mecanismos de ensamblaje de estos se han estudiado utilizando técnicas de baja y media resolución, como dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) (Andreu y col., 1992; Bordas y col., 1983; Díaz y col., 1996; Mandelkow y Bordas, 1986) y microscopía electrónica (Krebs y col., 2004; Li y col., 2002; Meurer-Grob y col., 2001; Nogales y col., 1999). El ajuste de las estructuras de alta resolución, que provienen de láminas inducida por Zn^{2+} , en los mapas de microtúbulos obtenidos por microscopía electrónica, ha generado varios modelos de microtúbulo a resolución pseudoatómica (Chacon y Wriggers, 2002; Krebs y col., 2005; Li y col., 2002; Meurer-Grob y col., 2001; Nogales y col., 1999).

Posiblemente, el rasgo más característico de la pared del microtúbulo es la presencia de oquedades, o poros, de unos 2.5 nm de diámetro (Nogales y col., 1998b). Estos poros se sitúan en las zonas donde confluyen cuatro monómeros de tubulina, pertenecientes a dos protofilamentos adyacentes. Dado que la primera

estructura a alta resolución de tubulina se obtuvo de una forma polimerizada de tubulina (Nogales y col., 1998b), el modelo cristalográfico incluye la estructura de un protofilamento a partir del cual se puede obtener información sobre los contactos longitudinales entre dímeros. Las interfases longitudinales entre monómeros y dímeros son topológicamente muy similares e involucran elementos estructurales equivalentes en alfa y beta tubulina (Nogales y col., 1999). No obstante, existen pequeñas diferencias entre estas interfases, entre las que destaca que el residuo 254 en beta tubulina es una lisina que se sitúa muy cerca del fosfato gamma del GTP de la subunidad alfa, mientras que en alfa tubulina es un glutámico que se ha propuesto que cataliza la reacción de hidrólisis del GTP en la subunidad beta del dímero inmediatamente anterior (Nogales y col., 1998a).

Dado que las láminas inducidas por Zn^{2+} de donde se obtuvo la estructura a alta resolución de tubulina están compuestas por protofilamentos en disposición antiparalela y que los protofilamentos de los microtúbulos siempre adoptan una disposición paralela, es lógico pensar que han de existir diferencias entre los contactos laterales formados por ambos tipos de estructuras. El ajuste de protofilamentos completos a alta resolución (provenientes de láminas de Zn^{2+}) en los mapas de criomicroscopía electrónica a media resolución ha permitido modelar este tipo de contactos en el microtúbulo (Krebs y col., 2005; Li y col., 2002; Meurer-Grob y col., 2001; Nogales y col., 1999). Al contrario que los contactos longitudinales entre monómeros, los contactos laterales entre protofilamentos muestran un carácter principalmente electrostático, siendo el lazo M, la hélice H3 y el lazo H1-S2 los principales elementos involucrados en estos contactos (figura 4). La superficie externa del microtúbulo está dominada por las dos largas hélices alfa que forman el dominio C-terminal de la tubulina, donde se unen proteínas motoras y proteínas asociadas a microtúbulos (Nogales y col., 1999).

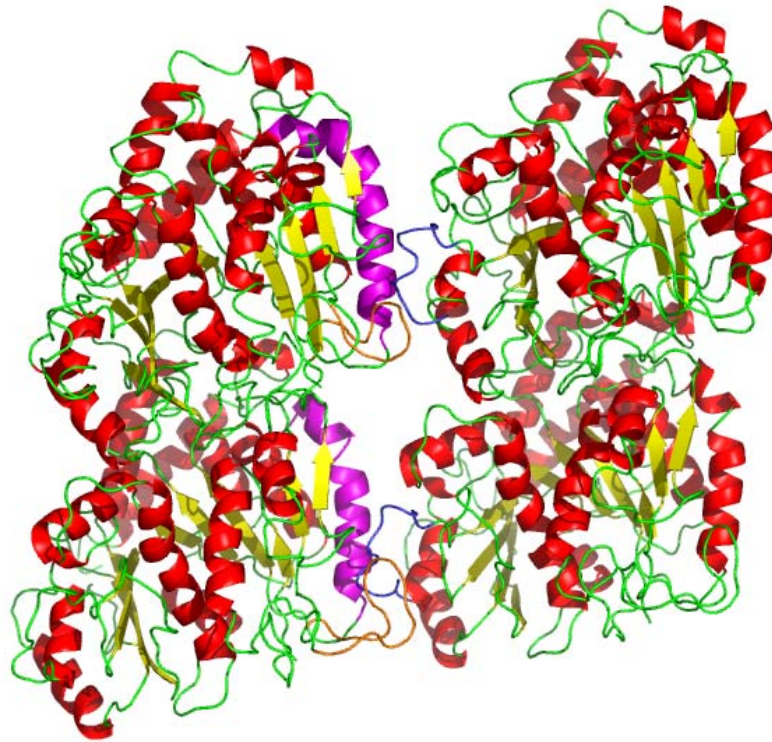


Figura 4. Vista de las interacciones laterales entre dos protofilamentos de un microtúbulo. Los dímeros de tubulina pertenecen a dos protofilamentos adyacentes en un modelo a alta resolución de microtúbulo construido mediante el ajuste de la estructura cristalográfica (código PDB 1TUB) en un mapa de criomicroscopía electrónica a 8 Å de resolución (Li y col., 2002). Las subunidades alfa corresponden a los monómeros superiores y las subunidades beta a los inferiores. Los principales elementos de estructura secundaria implicados en los contactos laterales están coloreados en magenta (hélice H3), naranja (lazo H1-S2) y azul marino (lazo M). El resto de elementos de estructura secundaria se colorean en rojo (hélices alfa), amarillo (cadenas beta) y verde (lazos).

2.3. Proteínas asociadas a microtúbulos

A pesar de que es posible ensamblar microtúbulos *in vitro* a partir de tubulina pura (Lee y Timasheff, 1975), *in vivo* los microtúbulos se encuentran asociados a una gran variedad de proteínas que regulan su función. Estas proteínas (denominadas proteínas asociadas a microtúbulos o MAPs) actúan tanto estabilizando los microtúbulos contra el desensamblaje, como mediando la interacción con otros componentes celulares (Hyams y Lloyd, 1993). De esta forma, diferentes estructuras microtubulares tienen asociadas diferentes MAPs. Estas proteínas, a su vez, regulan temporal y espacialmente la dinámica de los microtúbulos a lo largo de las diversas etapas del ciclo celular (Heald y Nogales, 2002). Como cabe esperar de la diversidad de funciones de los microtúbulos, hay muchos tipos de MAPs; algunas de ellas están ampliamente distribuidas en la mayoría de las células,

mientras que otras se encuentran sólo en determinados tipos celulares (Hyams y Lloyd, 1993).

Un tipo especial de MAPs son las proteínas motoras, quinesinas y dineínas. Estas proteínas se mueven a lo largo de los microtúbulos en sentidos opuestos, transportando moléculas y vesículas dentro de las células. Las quinesinas se mueven hacia el "extremo +" de los microtúbulos, mientras que la dineínas se mueven hacia el "extremo -" de los microtúbulos y ambas forman parte de un complejo sistema de transporte intracelular (Mallik y Gross, 2004).

3. La tubulina como componente principal de los microtúbulos

3.1. Polimerización de microtúbulos

El mecanismo de ensamblaje de tubulina ha sido ampliamente estudiado desde que se descubriera en la década de los setenta que la tubulina pura podía polimerizar *in vitro* con la ayuda de MAPs o en presencia de promotores inespecíficos de la polimerización, como son el glicerol (Lee y Timasheff, 1975) o el DMSO (Himes y col., 1977), para formar microtúbulos de idéntica apariencia a los que se encuentran dentro de las células. Al igual que el ensamblaje de actina, el ensamblaje de tubulina es una polimerización no covalente por condensación nucleada, caracterizada por un comportamiento cooperativo y por la presencia de una concentración crítica de proteína, por debajo de la cual no existe formación significativa de polímeros (Oosawa y Asakura, 1975). El equilibrio de polimerización es muy parecido al equilibrio de solubilidad de un determinado compuesto en disolución; la concentración crítica de tubulina se correspondería a la concentración saturante de compuesto, y el exceso de moléculas del compuesto, que están precipitadas, se correspondería a los dímeros de tubulina que forman parte de los microtúbulos. Al igual que en los microtúbulos, el número de moléculas de compuesto que coexisten con el precipitado es independiente de la cantidad total de precipitado, pero está determinado por las condiciones experimentales como la temperatura, el pH y las concentraciones de otros componentes.

La polimerización de proteínas, generalmente, consiste en dos procesos: nucleación y elongación o crecimiento. Se requiere primero la formación de un núcleo inestable que se pueda elongar, hasta alcanzar un estado estacionario en la masa de polímero. La nucleación, espontáneamente *in vitro* o a partir de los centrosomas *in vivo*, limita el número de microtúbulos formados y la velocidad de la polimerización. Se puede decir, por tanto, que la nucleación es generalmente el paso limitante en el proceso de polimerización. La adición de núcleos preformados a los dímeros de tubulina acelera la reacción pero no tiene influencia en la concentración de moléculas de tubulina coexistentes en el equilibrio final, es decir no tiene influencia en la concentración crítica (Oosawa y Asakura, 1975).

3.2. Comportamiento dinámico de los microtúbulos

Como ya se ha descrito anteriormente, los microtúbulos juegan un papel esencial en la división celular, posicionando los cromosomas correctamente durante la mitosis. La despolimerización del citoesqueleto de microtúbulos de la interfase y la construcción del huso mitótico requieren una rápida reorganización de los microtúbulos (figura 5).

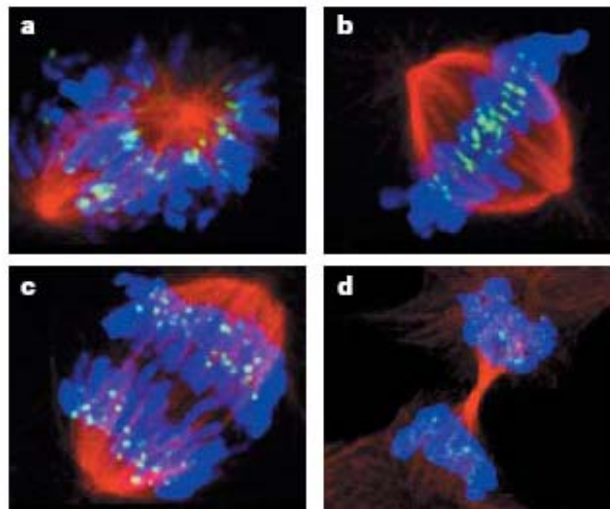


Figura 5. Inmunofluorescencia de células de osteosarcoma en las diferentes etapas de la mitosis. Los microtúbulos se muestran en rojo, el ADN se muestra en azul y los cinetócoros en verde. A. En prometafase, las envueltas nucleares se han roto, los cromosomas están condensados y los microtúbulos, muy dinámicos, recorren el citoplasma en busca de los cromosomas. B. En metafase temprana, la mayoría de los cromosomas se han congregado en el ecuador de la célula para formar la placa metafásica. C. En anafase, los cromosomas duplicados se han separado en sus dos cromátidas y se mueven hacia los polos de la célula. D. En telofase, los cromosomas separados han alcanzado los polos del huso mitótico y la célula se está escindiendo para dar lugar a dos células hijas. Tomado de (Jordan y Wilson, 2004).

El huso mitótico en sí mismo es una estructura altamente dinámica en la que los microtúbulos que lo componen encuentran a los cromosomas y los sitúan apropiadamente en la célula (figura 5). Estas actividades se llevan a cabo gracias a la remodelación de los microtúbulos mediante procesos de alargamiento o acortamiento, adición cabeza-cola (*treadmilling*) o incluso desensamblaje y ensamblaje de nuevo en determinadas partes de la célula (figura 6). De hecho, el comportamiento de los microtúbulos *in vitro* muestra una alternancia entre períodos prologandos de polimerización y despolimerización (Hotani y Horio, 1988; Kirschner y Mitchison, 1986). A este tipo de comportamiento dinámico que presentan los microtúbulos se le denomina inestabilidad dinámica y necesita un aporte continuo de energía, que proviene de la hidrólisis del GTP unido a la subunidad beta de la tubulina.

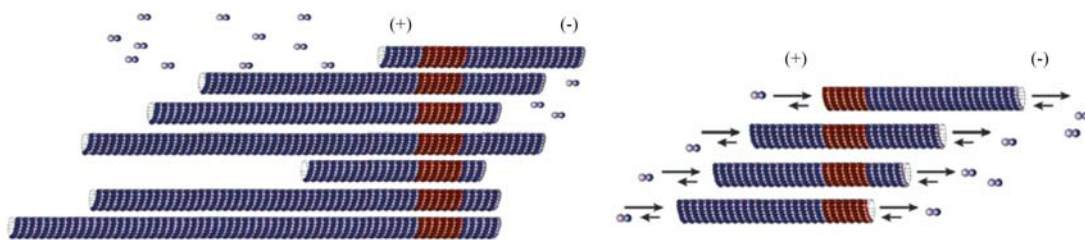


Figura 6. Esquema de la dinámica de los microtúbulos. Representación de los cambios de longitud de un microtúbulo aislado a lo largo del tiempo. En el panel de la izquierda se muestra cómo los extremos de los microtúbulos crecen y se acortan estocásticamente a lo largo del tiempo, por la adición o pérdida de dímeros de tubulina. Se puede observar que los cambios de longitud en el "extremo +" son mayores que en el "extremo -". En el panel de la derecha se representa la adición cabeza-cola de subunidades de tubulina (*treadmilling*) a los microtúbulos. Los heterodímeros de tubulina se añaden al "extremo +" del microtúbulo y se pierden por el "extremo -". La longitud de los microtúbulos, no obstante, permanece constante. Tomado de (Jordan y Wilson, 2004).

3.3. El ciclo GTPasa de la tubulina

Las proteínas GTPasa funcionan como interruptores moleculares binarios, normalmente activos en su conformación unida a GTP e inactivos en su conformación unida a GDP. Los cambios entre los estados activo e inactivo están regulados por factores intercambiadores de GTP (GEFs), proteínas estimuladoras de la actividad GTPasa (GAPs) e inhibidores de la disociación de los nucleótidos de guanina (GDIs), entre otras proteínas (Hall, 2000). La tubulina, que junto con FtsZ

comprende una familia diferente dentro de la superfamilia de las GTPasas (Nogales y col., 1998a), tiene un comportamiento bioquímico similar a los otros miembros de esta superfamilia, con la particularidad de que ella misma (al igual que FtsZ) actúa como proteína estimuladora de la actividad GTPasa, ya que el GTP se hidroliza tras la adición de un nuevo dímero al microtúbulo (figura 7). Cada monómero de tubulina une un nucleótido de guanina, de tal forma que en un dímero de tubulina, la subunidad alfa siempre tiene unida una molécula de GTP, que no se intercambia ni se hidroliza, en el denominado "sitio N" (del inglés *non-exchangeable*). Por el contrario, la subunidad beta tiene asociado un nucleótido que puede ser intercambiado e hidrolizado, en el denominado "sitio E" (del inglés *exchangeable*). Por cuestiones prácticas, en este trabajo se hará referencia a tubulina GDP o tubulina GTP, según tenga el sitio E de la subunidad beta unido GDP o GTP, respectivamente.

Se piensa que la tubulina GTP (que denominaremos esquemáticamente T) tiene una conformación tal que le permite ensamblar formando microtúbulos (TTTT); la polimerización induce la actividad GTPasa y la hidrólisis del nucleótido del sitio E induce un cambio conformacional en la molécula de tubulina que tiende a desestabilizar el microtúbulo, pero las restricciones estructurales de las subunidades adyacentes en el microtúbulo impiden que este cambio conformacional se complete, almacenando energía (por eso se dice que el microtúbulo se encuentra en un estado meta-estable; DDDD). Esta energía se usará más tarde para despolimerizar rápidamente o para ejercer fuerza si fuera necesario. Una vez que el microtúbulo comienza a despolimerizar, las restricciones estructurales de las subunidades adyacentes en el microtúbulo desaparecen, el cambio conformacional inducido por la hidrólisis del GTP se completa y la tubulina adopta su conformación inactiva (tubulina GDP, que aquí denominamos esquemáticamente D), incapaz de formar microtúbulos (figura 7).

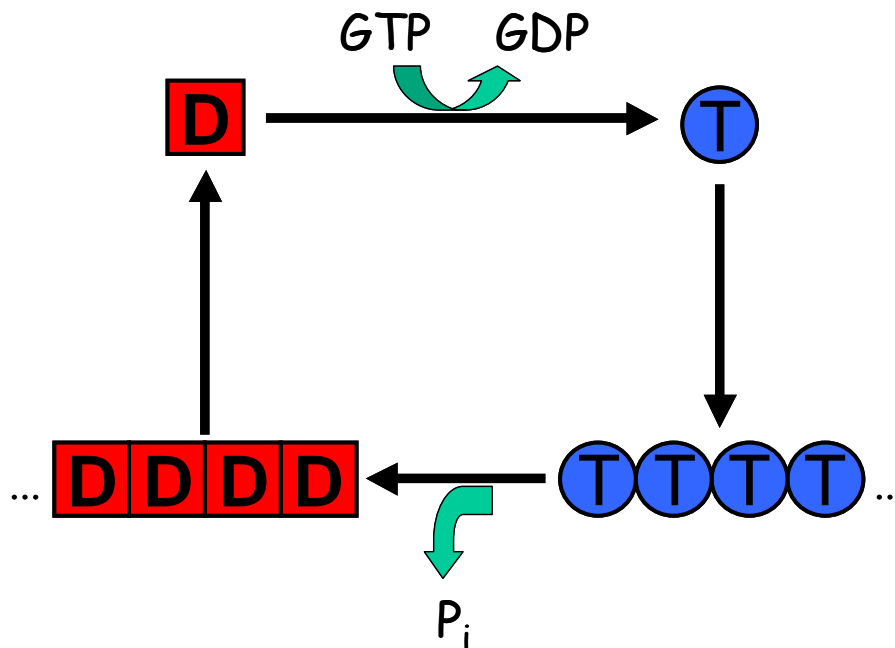


Figura 7. Esquema simplificado del ciclo de actividad GTPasa en la tubulina. Aunque las bases estructurales del funcionamiento de este ciclo no se conocen en detalle, se piensa que la conformación observada en las láminas de Zn^{2+} (Nogales y col., 1998b) es muy similar para T (tubulina GTP), TTTT y DDDD, debido a las restricciones estructurales de las subunidades adyacentes en el microtúbulo. La conformación D (tubulina GDP) debe ser parecida a la del complejo tubulina-stathmina-colchicina (Ravelli y col., 2004). P_i representa al fosfato inorgánico que se libera tras la hidrólisis del GTP.

Los dímeros de tubulina GTP carecen de actividad GTPasa *per se*, es decir, son incapaces por sí solos de hidrolizar el GTP que llevan unido. En cambio, bajo determinadas condiciones, son capaces de ensamblar para formar microtúbulos y una vez que un dímero de tubulina GTP se ha añadido al "extremo +" de un microtúbulo, se produce la hidrólisis del GTP en el dímero inmediatamente anterior al recién incorporado. Como resultado, el cuerpo del microtúbulo estará compuesto de tubulina GDP, mientras que en los extremos siempre existirá al menos una capa de dímeros de tubulina GTP. Este alto contenido de tubulina GDP en los polímeros, que tiende a despolimerizar, constituye la base de la inestabilidad dinámica y de la elevada dinamicidad de estos polímeros.

La tubulina GDP, aunque incapaz de polimerizar para formar microtúbulos, es capaz de ensamblar formando estructuras anulares (Howard y Timasheff, 1986). La estructura de estos anillos ha sido estudiada a baja resolución utilizando técnicas de dispersión de rayos-X a bajo ángulo (SAXS) y criomicroscopía electrónica (Díaz y col., 1994; Nicholson y col., 1999). Estas estructuras

corresponden a dobles anillos concéntricos, formados por 24 y 32 monómeros de tubulina (Díaz y col., 1994). La comparación de la estructura de estos anillos con la de los microtúbulos, indica que los primeros corresponden a segmentos de pares de protofilamentos curvados tangencialmente a la superficie del microtúbulo, con ángulos de 30 y 22.5° por dímero de tubulina (Díaz y col., 1994). Adicionalmente, una estructura curvada de protofilamentos de tubulina, similar a la observada en los anillos de tubulina GDP, también se ha observado en protofilamentos de microtúbulos que están despolimerizando (Chretien y col., 1995), sugiriendo que el GDP induce una curvatura en el dímero de tubulina que impide la formación de protofilamentos rectos, necesarios para el establecimiento de las interacciones laterales de los microtúbulos (figura 10). Existe un equilibrio entre las conformaciones recta (que puede formar microtúbulos) y curva (que puede formar anillos) de tubulina (Melki y col., 1989) y el interruptor binario que controla la naturaleza del producto final es la ocupación del "sitio E" de la subunidad beta de la tubulina por un complejo coordinado nucleótido-metal (Shearwin y col., 1994). Lógicamente, este equilibrio se puede desplazar por ligandos exógenos (Shearwin y Timasheff, 1992; Shearwin y Timasheff, 1994).

3.4. Bases bioquímicas de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos

El modelo más aceptado para explicar la inestabilidad dinámica de los microtúbulos es el modelo del tapón (Pantaloni y Carlier, 1986). Este modelo propone que aunque prácticamente todo el GTP de la tubulina se ha hidrolizado a GDP al polimerizar, existe un tapón ("cap") en el extremo del microtúbulo que está creciendo, que no ha hidrolizado el GTP y este tapón de tubulina GTP estabiliza al microtúbulo, impidiendo la despolimerización. La pérdida de este tapón se traduce en la despolimerización inmediata del microtúbulo, liberando así la energía almacenada tras la hidrólisis del GTP (figura 8). Como cabe esperar, los microtúbulos ensamblados con análogos de GTP lentamente hidrolizables son mucho más estables que los ensamblados a partir de tubulina GTP (Hyman y col., 1992).

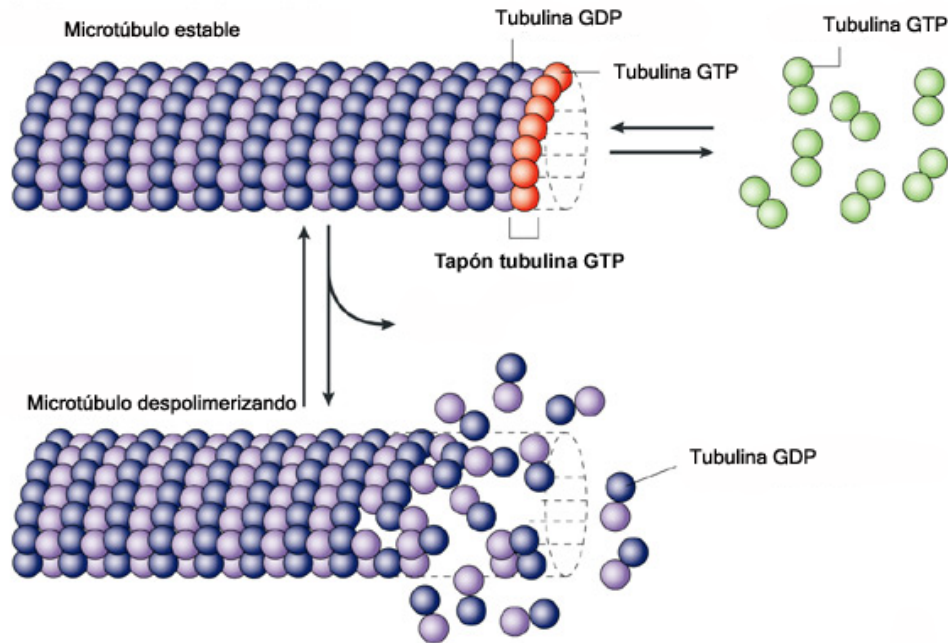


Figura 8. Dinámica de la polimerización de tubulina y modelo del tapón de tubulina *GTP*. El *GTP* unido a la tubulina se hidroliza a *GDP* y fosfato inorgánico (*Pi*) al mismo tiempo que la tubulina se añade al extremo del microtúbulo o muy poco tiempo después. Finalmente, el *Pi* se disocia del microtúbulo, dejando un microtúbulo compuesto de tubulina *GDP*. Un microtúbulo que tiene un tapón de tubulina *GTP* o *GDP-Pi* es estable a la despolimerización, pero la pérdida de éste resulta en la despolimerización del microtúbulo. Tomado de (Jordan y Wilson, 2004).

3.5. Bases estructurales de la inestabilidad dinámica de los microtúbulos

Aunque se desconoce la estructura tridimensional a alta resolución de la tubulina *GTP* no polimerizada, se piensa que la tubulina *GDP* que se encuentra en los polímeros laminares inducidos por Zn^{2+} (Lowe y col., 2001; Nogales y col., 1998b) debe estar en una conformación similar, debido a las restricciones de las subunidades adyacentes en el polímero (dado que los protofilamentos de estas láminas, muy parecidos a los de los microtúbulos, son rectos, denominaremos a esta estructura "recta"). Tampoco se conoce la estructura a alta resolución de la tubulina *GDP* no polimerizada en disolución, pero se piensa que debe ser similar a la que la tubulina adopta en el complejo tubulina-stathmina-colchicina (Ravelli y col., 2004), dado que la conformación que se observa en estas estructuras parece ser muy similar a la estructura de tubulina *GDP* en los protofilamentos curvados de microtúbulos que están despolimerizando (Gigant y col., 2000) (ya que la estructura de estos oligómeros de tubulina es curvada, denominaremos a esta estructura "curva").

Una comparación de los dímeros de tubulina en el complejo tubulina-stathmina-colchicina ("estructura inactiva") con los dímeros de las láminas de Zn^{2+} ("estructura activa"), permitiría observar los cambios conformacionales existentes entre las estructuras activa e inactiva de la tubulina. Se observan tres diferencias importantes:

1. Se requiere una rotación de 12° para superponer las subunidades alfa y beta en ambas estructuras.

2. La orientación relativa de los tres dominios de cada monómero es diferente (figura 9). El dominio de unión a nucleótido y el dominio C-terminal forman un bloque cuyos átomos se superponen en ambas estructuras, mientras que los dominios intermedios presentan una rotación de 8 y 11° para alfa y beta, respectivamente (Ravelli y col., 2004).

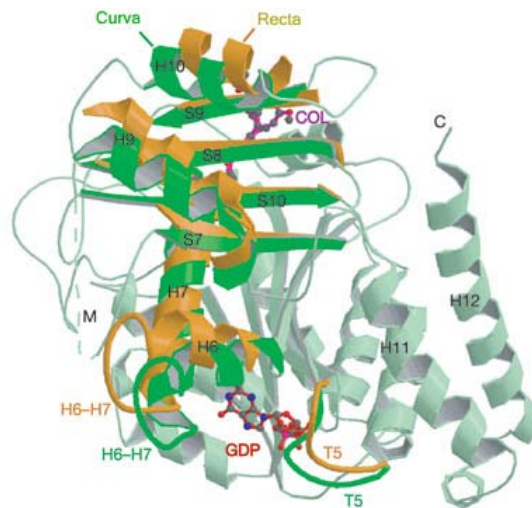


Figura 9. Cambios en la subunidad beta de la tubulina entre las estructuras recta y curva. Superposición de los dominios de unión a nucleótido y C-terminal de la estructura de tubulina en el protofilamento de láminas inducidas por Zn^{2+} (Nogales y col., 1998b) y de la estructura en complejo con stathmina. Tomado de (Ravelli y col., 2004). Se observa una rotación de 11° entre los dominios intermedios de ambas estructuras.

3. Existen cambios locales en la estructura, entre los que destaca la diferencia en la conformación de los lazos T5 y H6-H7, que se acompaña de un desplazamiento de la hélice H7 a lo largo de su eje. Esta hélice conecta el dominio de unión a nucleótido con el dominio intermedio. La consecuencia del desplazamiento de esta hélice tiene un efecto doble; por un lado el dominio

intermedio rota, alejándose del dominio de unión a nucleótido, tal y como se ha descrito en el punto 2. Por otro lado, el desplazamiento de esta hélice alfa "empuja" a la subunidad inferior, provocando la rotación descrita en 1 (figura 10). Estos cambios en la estructura generan la conformación curva de la tubulina, que es incapaz de formar microtúbulos porque no puede establecer los contactos laterales necesarios para formar estos polímeros (Ravelli y col., 2004).

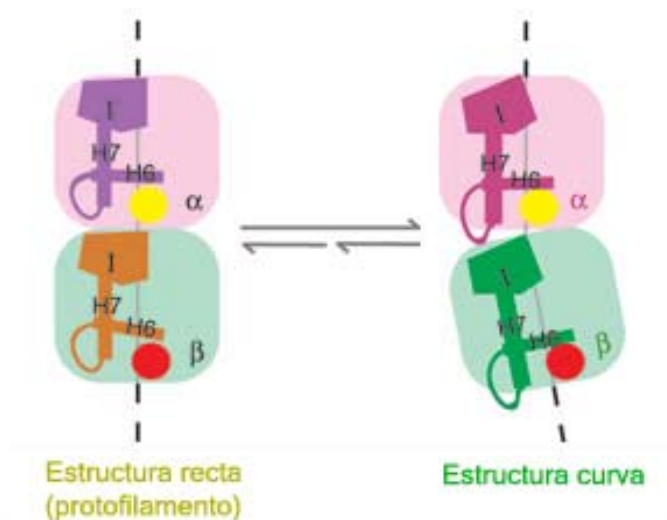


Figura 10. Representación simplificada del cambio de conformación recta a curva del dímero de tubulina. Desplazamiento del dominio intermedio (I) en los monómeros de tubulina durante el cambio de conformación de recta a curva. El desplazamiento de la hélice H7 que conecta los dominios N-terminal e intermedio, obliga a rotar a ambos dominios entre sí y, a su vez, desplaza a la subunidad de tubulina inmediatamente anterior, induciendo la conformación curva de tubulina. Tomado de (Ravelli y col., 2004).

Es interesante mencionar que el resto de estructuras de alta resolución de tubulina de las que se dispone actualmente, γ -tubulina (Aldaz y col., 2005) y tubulina de bacterias (Schlieper y col., 2005), también presentan una conformación curva similar a la que adopta la subunidad beta en el complejo tubulina-stathmina-colchicina (estructura curva). Esto sugiere que la tubulina, en su estado basal, estaría en una conformación curva, mientras que la conformación recta sólo se observaría dentro de los protofilamentos de los microtúbulos.

Se ha de puntualizar, no obstante, que los cambios que acabamos de describir no dependen exclusivamente de la hidrólisis del GTP, ya que se observan tanto en la subunidad alfa, unida a GTP, como en la subunidad beta unida a GDP,

aunque la magnitud de los cambios en alfa es menor que los de beta (Ravelli y col., 2004). Además, algunos autores sugieren que la stathmina podría inducir alguna modificación en la estructura del dímero de tubulina, que no se observaría en su ausencia (Wang y Nogales, 2005). De hecho, se ha publicado recientemente un mapa de criomicroscopía electrónica de anillos de tubulina GDP en ausencia de proteínas despolimerizadoras (Wang y Nogales, 2005) en el que se observan diferencias entre las interfases intradímero (con GTP) e interdímero (con GDP). La interfase interdímero, que contiene GDP, está más curvada que la interfase intradímero, que contiene GTP. Además, el ajuste de las estructuras de alta resolución en este mapa mejora ligeramente si se ajusta la conformación curvada a la subunidad beta y la conformación recta a la subunidad alfa, sugiriendo diferentes conformaciones para cada monómero (Wang y Nogales, 2005).

Por otro lado, algunos autores han logrado observar diferencias en las conformaciones y orientaciones relativas de los monómeros alfa y beta en los microtúbulos. Ajustando por separado las diferentes conformaciones conocidas (recta y curva) de los monómeros de tubulina, a sus mapas de criomicroscopía electrónica, Krebs y colaboradores han propuesto una explicación estructural a la inestabilidad dinámica de los microtúbulos (Krebs y col., 2005). En este modelo, se propone que la posición relativa de los monómeros dentro del microtúbulo estaría en una posición intermedia entre la posición totalmente recta de las láminas de Zn^{2+} (Nogales y col., 1998b) y la conformación curva del complejo tubulina-stathmina-colchicina (Ravelli y col., 2004) (figura 11). No obstante, para observar las diferencias entre las conformaciones de alfa y beta en los microtúbulos, los autores se basaron en datos experimentales con una relación señal/ruido muy débil (Krebs y col., 2004), que hace que estos datos se deban tomar con precaución.

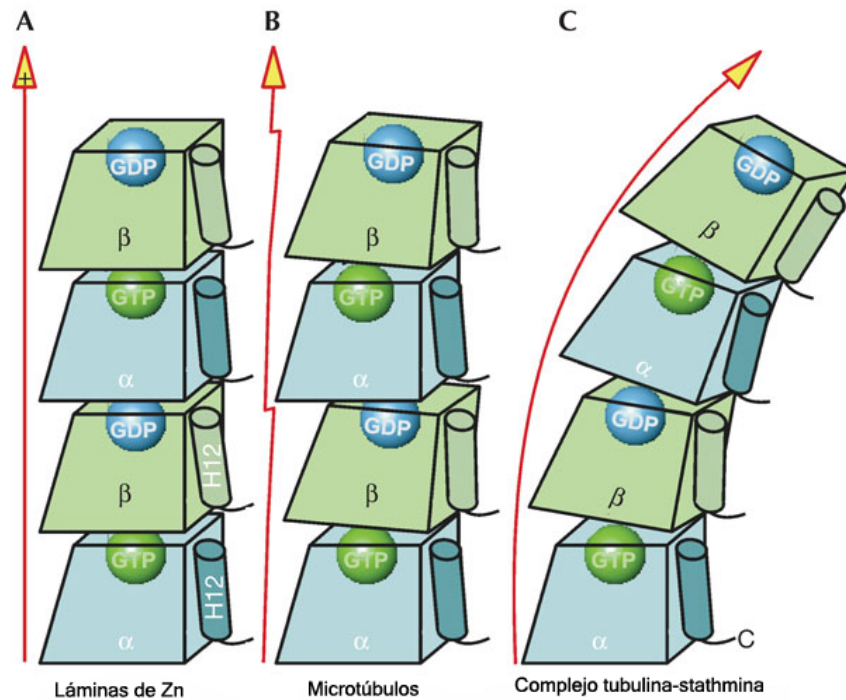


Figura 11. Posiciones relativas de los monómeros de tubulina dentro de los diferentes tipos de protofilamento. A. Conformación recta de las láminas de Zn²⁺. B. Conformación que adopta la tubulina en el microtúbulo tras la hidrólisis del GTP. C. Conformación curva (inactiva) de la tubulina. Durante la polimerización, la subunidad beta de la tubulina sufre un cambio estructural tras la hidrólisis del nucleótido, que genera la conformación intermedia de esa subunidad (B). Esta conformación está relacionada con la conformación curvada y permanece estabilizada por el entramado del microtúbulo y por el tapón de tubulina GTP de los extremos de los microtúbulos. El cambio conformacional de la subunidad alfa es mucho menor que el de subunidad beta. Si la velocidad de incorporación de dímeros de tubulina al "extremo +" de los microtúbulos es baja y la tubulina GDP queda expuesta en el "extremo +" del microtúbulo, esta tubulina GDP adopta la conformación curva y se induce la despolimerización muy rápidamente (C). Tomado de (Krebs y col., 2005).

Tras la polimerización, el GTP de la subunidad beta se hidroliza y la hidrólisis induce un cambio hacia la conformación curva, pero debido a las restricciones estructurales impuestas por los dímeros adyacentes del microtúbulo, el cambio conformacional no se puede completar. En su lugar, adopta una conformación intermedia "semicurva", mantenida por los contactos axiales y laterales, entre la conformación recta observada en las láminas de Zn²⁺ y la conformación curva observada en el complejo tubulina-stathmina-colchicina (figura 12).

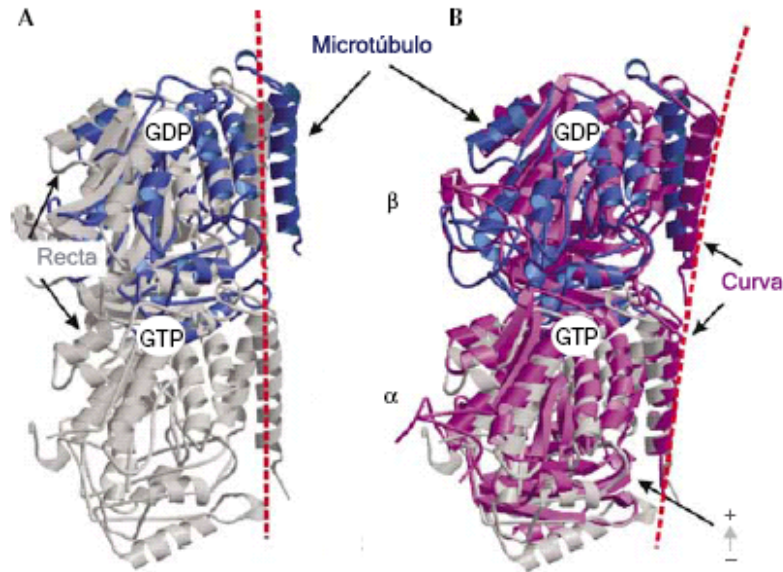


Figura 12. Diferencias estructurales de los dímeros de tubulina en las diferentes conformaciones observadas. A. Relación de los dímeros de tubulina en los microtúbulos (color azul) con la conformación recta de la tubulina en las láminas inducidas por Zn^{2+} (color gris). B. Relación de los dímeros de tubulina en los microtúbulos (color azul) con la conformación curvada del complejo tubulina-stathmina (magenta). Las subunidades alfa (abajo) de cada estructura están superimpuestas. Tomado de (Krebs y col., 2005).

El microtúbulo puede permanecer intacto en este estado meta-estable durante cierto tiempo, ya que existe un tapón en el "extremo +" de tubulina GTP, que adopta la conformación recta y este tapón parece ser suficiente para prevenir la despolimerización del microtúbulo, que comienza desde los extremos y no desde el centro del microtúbulo. Si el microtúbulo crece más lentamente y la hidrólisis de GTP alcanza al extremo del microtúbulo, el tapón de tubulina GTP se pierde y la posibilidad de despolimerización desde ese extremo es mucho mayor (Krebs y col., 2005).

4. La tubulina como diana farmacológica

La importancia vital de los microtúbulos en el proceso de la mitosis (son los componentes principales del huso mitótico) los ha convertido en dianas muy importantes de fármacos antitumorales, que actúan alterando el funcionamiento de éstos. Desde que en 1967, la tubulina se identificara como la proteína de unión a colchicina, un veneno natural con efectos sobre el ciclo celular y en particular sobre la morfología del huso mitótico (Borisy y Taylor, 1967a; Borisy y Taylor,

1967b), el interés por esta proteína como diana antitumoral ha ido creciendo a lo largo de los años.

Actualmente, un grupo muy diverso de compuestos con actividad antitumoral, cuya diana celular es la tubulina, se usan satisfactoriamente en el tratamiento del cáncer o están siendo objeto de ensayos clínicos (Mani y col., 2004). En la tabla 1 se muestran estos compuestos, sus usos terapéuticos y la fase de desarrollo clínico en que se encuentran.

Sitio de unión	Compuestos	Usos terapéuticos	Etapas de desarrollo clínico
Dominio Vinca	Vinblastina (Velban)	Enfermedad de Hodgkin, cáncer de testículo	En uso clínico. 22 pruebas de combinación en progreso
	Vincristina (Oncovin)	Leucemia, linfomas	En uso clínico. 108 pruebas de combinación en progreso
	Vinorelbina (Navelbine)	Tumores sólidos, linfomas y cáncer de pulmón	En uso clínico. 29 pruebas en fase clínica I-III (sólo o en combinación)
	Vinflunina	Cáncer de mama, cáncer de pulmón, vejiga	Fase III
	Criptoficina 52	Tumores sólidos	Fase III terminada
	Halicondrinas (E7389)	-	Fase I
	Dolastatinas (TZT-1027)	Potencial agente marcador vascular	Fase II completada
Sitio de Colchicina	Hemiasterlinas (HTI-286)	-	Fase I
	Colchicina	Enfermedades no neoplásicas (gota, fiebre mediterránea familiar)	Falló las pruebas clínicas, por su citotoxicidad
	Combrestatinas (AVE8062A, CA-1P, CA-4P, N-acetilcolchicinol-O-fosfato, ZD6126)	Potencial agente marcador vascular	Fase I, II
	2-Metoxiestradiol	-	Fase I
Sitio de Taxol	Metoxibenzeno-sulfonamida (ABT-751, E7010)	Tumores sólidos	Fase I, II
	Paclitaxel (Taxol), TL00319	Tumores de ovarios, mama y pulmón, sarcoma de Kaposi. En pruebas con muchos otros tumores	En uso clínico. Pruebas Fase I-III en USA; TL00139 en fase I
	Docetaxel (Taxotere)	Tumores de próstata, cerebro y pulmón	En uso clínico. 8 pruebas en USA en fase I-III
	Epotilonas (BMS-247550, epotilonas B y D)	Tumores resistentes a paclitaxel	Fase I-III
	Discodermolida	-	Falló las pruebas clínicas, por su elevada citotoxicidad

Tabla 1. Compuestos antimetabólicos, sus sitios de unión en la tubulina y sus usos terapéuticos o fase de desarrollo clínico. Modificada de (Jordan y Wilson, 2004).

Hasta la fecha se han identificado cuatro sitios principales de unión de ligandos antimitóticos dentro de la molécula de tubulina: sitio de colchicina, de alcaloides de la vinca, de taxol y de laulimalida (figura 13).

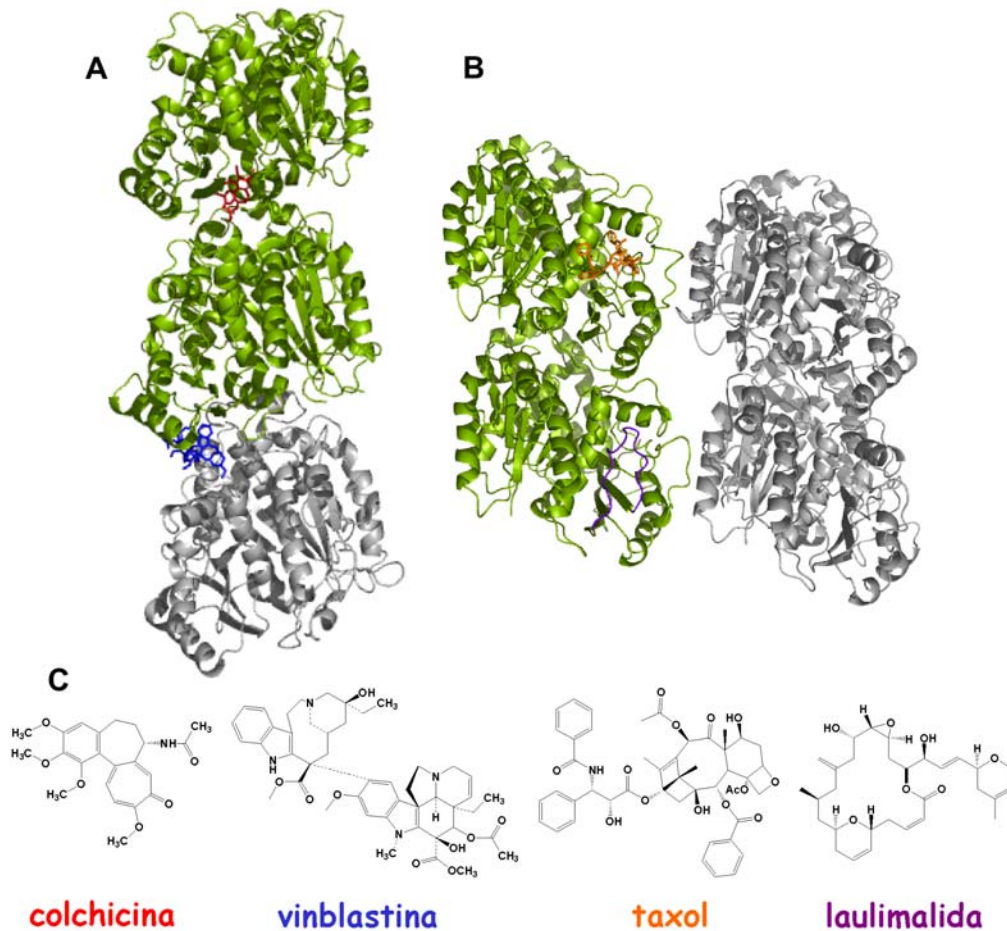


Figura 13. Diferentes sitios de unión de ligandos antimitóticos en el dímero de tubulina. A. Tubulina unida a colchicina (rojo) y vinblastina (azul) unida a uno de los dos sitios que existen en el dímero de tubulina. B. Representación de un trozo de pared del microtúbulo con taxol (naranja) unido. El largo lazo de color violeta forma parte del sitio de unión propuesto para la laulimalida. Tanto en A como en B, la subunidad superior es beta y la inferior es alfa. Las subunidades de color gris corresponden al siguiente dímero en la estructura con código PDB 1Z2B (A) y a un dímero de tubulina en el protofilamento adyacente en el modelo de microtúbulo de (Li y col., 2002) (B). C. Fórmulas químicas de compuestos antitumorales que tienen como diana la tubulina. Para facilitar la visualización, los colores de los ligandos en A y B coinciden con los colores de los nombres de los compuestos en C.

Todos estos compuestos ejercen sus efectos inhibitorios sobre la proliferación celular, mediante el bloqueo de la dinámica del huso mitótico, deteniendo las células en mitosis. Por ello, los compuestos que se unen a tubulina se denominan a menudo antimitóticos. A concentraciones relativamente altas, estos compuestos afectan la polimerización, estabilizan o desestabilizan los microtúbulos

y modifican la masa de polímeros en la célula o *in vitro*. Los compuestos antimitóticos que se unen a tubulina se pueden clasificar en dos grandes grupos en función del punto donde bloqueen el ciclo GTPasa de la tubulina (figura 7): ligandos activadores o desestabilizadores de tubulina, es decir, los que estabilizan o los que desestabilizan microtúbulos (figura 14).

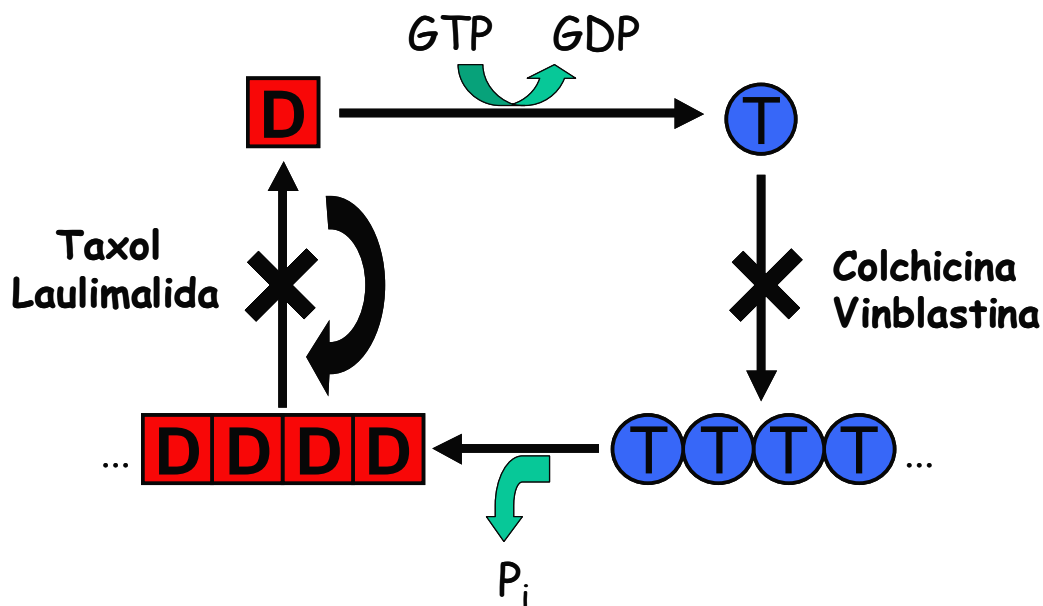


Figura 14. Esquema simplificado del ciclo de actividad GTPasa de la tubulina y los ligandos que bloquean este ciclo. El taxol y la laulimalida estabilizan microtúbulos, mientras que la colchicina y la vinblastina impiden la polimerización de tubulina.

A concentraciones bajas, pero clínicamente relevantes, estos compuestos no modifican la masa total de microtúbulos pero alteran la dinámica de los microtúbulos, reteniendo la capacidad para bloquear la mitosis (Jordan y col., 1993).

4.1. Ligandos desactivadores de tubulina

4.1.1. Compuestos que se unen al dominio vinca

Los alcaloides de la vinca son compuestos naturales obtenidos originalmente hace unos 45 años de las hojas de la vinca de Madagascar y descritos como potentes antileucémicos (Cutts y col., 1960; Johnson y col., 1960; Warwick y col., 1960). Desde entonces, estos compuestos se han usado para el tratamiento de leucemias, linfomas y otros tipos de tumores sólidos. A los dos compuestos naturales aislados

originalmente, vinblastina y vincristina, se les sumaron algunos derivados semi-sintéticos, entre los que destaca la vinorelbina que también se usa hoy en día como fármaco antitumoral (Duflos y col., 2002). Además, también existen otros derivados en fases clínicas de desarrollo, como son la vinflunina (Duflos y col., 2002), halicondrinas (Bai y col., 1991), hemiasterlinas (Anderson y col., 1997), espongistatinas (Bai y col., 1993), dolastatinas (Bai y col., 1990) y criptoficinas (Smith y col., 1994). Los efectos secundarios más notables de este tipo de compuestos son la neuropatía y la mielosupresión reversible (presumiblemente por la alteración de los microtúbulos de los axones neuronales), aunque las causas de estos efectos no se conocen con exactitud (Quasthoff y Hartung, 2002).

Los alcaloides de la vinca se unen tanto a tubulina no polimerizada como a microtúbulos y sus acciones son dependientes de la concentración. A concentraciones muy altas (del orden de μM) inducen a la tubulina a formar polímeros espirales (Haskins y col., 1981; Jordan y col., 1986). A concentraciones relativamente altas (10-100 nM) causan la despolimerización de los microtúbulos y deshacen el huso mitótico, bloqueando las células en mitosis (Jordan y col., 1991). Sin embargo, a concentraciones más bajas, los alcaloides de la vinca suprimen la dinámica de los microtúbulos sin despolimerizar el huso mitótico, aunque aún son capaces de bloquear las células en mitosis e inducir apoptosis (Jordan y col., 1991; Toso y col., 1993).

La estructura de alta resolución de uno de los dos sitios de unión de los alcaloides de la vinca en el dímero de tubulina (Lee y col., 1975), se ha descrito recientemente por cristalografía de rayos X (Gigant y col., 2005). En esta estructura, la vinblastina se introduce como una cuña entre dos dímeros de tubulina, interaccionando con la subunidad alfa de uno y la beta del otro (figura 13) (Gigant y col., 2005). Esta interacción estabiliza axialmente los protofilamentos curvados que se observan en los microtúbulos despolimerizados con vinblastina (Haskins y col., 1981).

4.1.2. Compuestos que se unen al sitio de colchicina

La colchicina es un compuesto aislado en 1820 (Pelletier y Caventon, 1820) que destruye el huso mitótico. La tubulina se describió por primera vez como la proteína de unión de este compuesto en las células (Borisov y Taylor, 1967a). De forma similar a lo que ocurre con los alcaloides de la vinca, los ligandos que se unen al sitio de colchicina producen la despolimerización de los microtúbulos a elevadas concentraciones y suprimen la dinámica de los microtúbulos a concentraciones más bajas (Skoufias y Wilson, 1992). Actualmente, la colchicina se usa en el tratamiento de la gota, pero no ha superado las fases clínicas como antineoplásico, presumiblemente por su elevada citotoxicidad. No obstante, se han identificado otros compuestos naturales que se unen al sitio de colchicina, entre los que se incluyen las combretastinas (Hamel y Lin, 1983) o el 2-metoxi-estradiol (D'Amato y col., 1994), que se encuentran actualmente en fase clínica como potenciales fármacos antitumorales.

La estructura del sitio de unión de colchicina se ha descrito recientemente mediante cristalografía de rayos X (Ravelli y col., 2004). En esta estructura, la colchicina está mayoritariamente enterrada en el dominio intermedio de la subunidad beta de tubulina, aunque también interacciona con la subunidad alfa del mismo dímero (figura 13), lo que produce una estabilización del dímero de tubulina en una conformación que no permite el establecimiento de los contactos laterales necesarios para formar el microtúbulo (Ravelli y col., 2004).

4.2. Ligandos activadores de tubulina

4.2.1. Compuestos que se unen al sitio de taxol

El taxol (paclitaxel) fue el primer compuesto estabilizador de microtúbulos que se descubrió. Actualmente, es un fármaco antitumoral muy efectivo y una de las contribuciones más representativas a la farmacopea de moléculas quimioterapéuticas de la última década (Rowinsky, 1997). Es una molécula compleja que se aisló originalmente de la corteza del árbol del tejo, describiéndose sus efectos antileucémicos (Wani y col., 1971). Años después se publicó la primera

evidencia de que la citotoxicidad de este ligando podía deberse a su acción sobre el huso mitótico (Fuchs y Johnson, 1978). Finalmente, en 1980, se describió que el taxol era capaz de inducir la polimerización de microtúbulos en ausencia de GTP y estabilizarlos en condiciones despolimerizadoras, como el frío, el Ca^{2+} o la dilución (Schiff y col., 1979). En 1995, fue aprobado su uso clínico y actualmente se usa en el tratamiento de cáncer de ovarios, de mama, pulmón y sarcoma de Kaposi, entre otros (Jordan y Wilson, 2004).

Su mecanismo de acción es diferente al de los ligandos que se unen al sitio de los alcaloides de la vinca o al de colchicina aunque, al igual que para estos dos últimos, los efectos sobre los microtúbulos son dependientes de la concentración. A concentraciones elevadas de taxol, la masa de polímero formado se incrementa notablemente, mientras que a concentraciones bajas ($< 10 \text{ nM}$) no se observa efecto sobre la masa total del polímero, aunque sí un bloqueo de la dinámica de los microtúbulos (Derry y col., 1998; Jordan y col., 1993).

De cualquier forma, aparte del uso clínico satisfactorio del taxol y del docetaxel (o taxotere, que es un análogo relacionado), estos compuestos tienen varias desventajas que limitan su aplicabilidad, como son su baja solubilidad acuosa, el desarrollo de resistencias de las células tumorales debido a la presencia de mutaciones en el sitio de taxol (Giannakakou y col., 1997) o a la sobre-expresión de la glicoproteína P, que bombea estos ligandos hacia el exterior de la célula (Gottesman y col., 1996; Litman y col., 2001). Debido a esto, en los últimos años se ha disparado la búsqueda de nuevos compuestos con actividad similar a la del taxol, pero que carezcan de estos inconvenientes. Multitud de búsquedas en múltiples fuentes (incluyendo corales, esponjas marinas, bacterias, plantas o productos de síntesis química.) han resultado en el descubrimiento de compuestos, estructuralmente no relacionados, que se unen al sitio de taxol, estabilizando los microtúbulos. Estos compuestos son: epotilonas, discodermolida, dictiostatina, sarcodictinas, eleuterobinas, ciertos derivados esteroides, ciclostreptina y tacialonolidas.

a. *Epotilonas*. Las epotilonas, aisladas originalmente de la bacteria *Sorangium celulosum* (Gerth y col., 1996; Höfle y col., 1996), son uno de los grupos de ligandos estabilizadores de microtúbulos más prometedores como futuros agentes quimioterapéuticos. De hecho, la epotilona B está actualmente en fase II de desarrollo clínico por la compañía Novartis, su análogo BMS-247550 está en fase II/III por Bristol-Mayers Squibb y la deoxi-epotilona B y el análogo C21-amino-epoB han entrado también en fase clínica (Altmann, 2003). Las epotilonas, como agentes antitumorales, ofrecen una serie de ventajas con respecto al taxol y al docetaxel. Dado que son compuestos bacterianos, las epotilonas se pueden obtener por fermentación en grandes cantidades (Mulzer y col., 2000). Además, tienen una mayor solubilidad acuosa (Höfle y col., 1996) y son un sustrato mucho peor para la glicoproteína P que el taxol o el docetaxel y por tanto, son más efectivos en células que tienen un fenotipo de resistencia a múltiples drogas (MDR) (Bollag y col., 1995; Kowalski y col., 1997b). Por último, su arquitectura molecular es relativamente sencilla y esto ha permitido la síntesis química completa de las epotilonas naturales y de una gran variedad de análogos (Balog y col., 1996); (Nicolaou y col., 1997); (Nicolaou y col., 1998); (Nicolaou y col., 2000c); (Nicolaou y col., 2000a; Nicolaou y col., 2000b; Nicolaou y col., 2001a; Nicolaou y col., 2001b; Nicolaou y col., 2002; Nicolaou y col., 2003).

b. *Discodermolida* y *dictiostatina*. La discodermolida se aisló originalmente de la esponja marina *Discodermia dissoluta* (Gunasekera y col., 1990) y se describió como un potente inmunosupresor (Longley y col., 1991; Longley y col., 1993). Años después, se comprobó la espectacular potencia de este compuesto en la inducción de haces de microtúbulos en células, además de inhibir fuertemente la unión del taxol a su sitio en los microtúbulos (Kowalski y col., 1997a). De manera interesante, se ha descrito un comportamiento citotóxico sinérgico entre discodermolida y taxol a pesar de que ambos compiten por el mismo sitio de unión (Honore y col., 2003; Martello y col., 2000). Estos resultados plantean la cuestión de si un tratamiento combinado taxol/discodermolida causará una regresión tumoral sinérgica. Desafortunadamente, la discodermolida no ha superado las fases clínicas

de desarrollo como fármaco antitumoral debido a su elevada toxicidad. La dictiostatina es un compuesto aislado originalmente de una esponja marina (género *Spongia*) (Isbrucker y col., 2003). Las estructuras químicas de la discodermolida y la dictiostatina son muy similares, pero la última es un ciclo, mientras que la primera es una molécula lineal. Las células que presentan fenotipo MDR son sensibles a estos ligandos (Isbrucker y col., 2003; Kowalski y col., 1997a).

c. Sarcodictinas y eleuterobina. Las sarcodictinas y la eleuterobina, se aislaron originalmente de corales marinos (*Sarcodictyon roseum* y *Eleutherobia* sp., respectivamente (Ketzinel y col., 1996; Lindel y col., 1997)). Ambos compuestos comparten un macrociclo principal y se diferencian sólo en las cadenas laterales de este macrociclo. Tienen una actividad similar a la del taxol, aunque más débil (Hamel y col., 1999; Long y col., 1998). Desafortunadamente, el interés terapéutico de estos ligandos es pequeño debido a que las células con fenotipo MDR son resistentes a estos ligandos (McDaid y col., 1999).

d. *Derivados esteroideos*. Estos compuestos se descubrieron cuando se intentaba sintetizar análogos del metabolito estrógeno 2-metoxi-estradiol, cuya unión débil al sitio de colchicina había sido previamente descrita (D'Amato y col., 1994). Como consecuencia de diferentes modificaciones químicas en esta molécula, se sintetizó, entre otros, el análogo 3,17 β -diacetoxi-2-etoxi-6-oxo-B-homo-estra-1,3,5(10)-trieno que, sorprendentemente, exhibió una débil actividad similar a la del taxol (Verdier-Pinard y col., 2000).

e. *Ciclostreptina*. La ciclostreptina se aisló originalmente del medio de cultivo de bacterias del género *Streptomyces* y se describió como estabilizador de microtúbulos (Sato y col., 2000a; Sato y col., 2000b). Este ligando compite fuertemente con el taxol por su sitio en los microtúbulos, a pesar de tener una actividad estabilizadora de microtúbulos débil (Edler y col., 2005). De forma interesante, las células resistentes a taxol o a epotilonas (bien por mutaciones en el sitio de unión o por sobre-expresión de la glicoproteína P) son sensibles a este ligando (Edler y col., 2005). La estructura química de este ligando es especialmente interesante ya que presenta grupos que podrían reaccionar irreversiblemente con

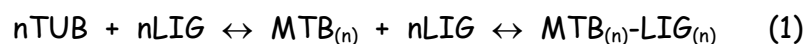
proteínas (Vanderwal y col., 2003). De hecho, se ha detectado previamente la unión irreversible de la ciclostreptina a la proteína carboxilesterasa-1 tras la incubación de un derivado fluorescente de ciclostreptina con el proteoma de corazón de ratón (Adam y col., 2003).

f. *Tacalonolidas*. Las tacalonolidas A y E son parte de un grupo de esteroides químicamente relacionados que se han aislado de la planta *Tacca chantrieri* (Chen y col., 1987; Shen y col., 1991). Ambos compuestos poseen una débil actividad estabilizadora de microtúbulos en células similar a la del taxol y, además, son peores sustratos para la glicoproteína P que el taxol (Tinley y col., 2003).

4.2.1.1. Mecanismo de acción del taxol

El mecanismo de inducción del ensamblaje y estabilización de microtúbulos por taxol, se estudió en un principio mediante técnicas de baja y media resolución, como SAXS y microscopía electrónica (Andreu y col., 1992; Andreu y col., 1994; Díaz y col., 1996). Estos estudios situaban al taxol en la interfase de dos protofilamentos, estabilizando de esta manera los contactos laterales entre ellos. Estudios más recientes, de alta resolución, sitúan al taxol unido a un bolsillo hidrofóbico en el lumen de los microtúbulos, entre el dominio intermedio y el dominio N-terminal de la subunidad beta tubulina y en contacto con el lazo M (que es el elemento principal de las interacciones laterales entre protofilamentos de los microtúbulos), corroborando la hipótesis propuesta previamente (Downing, 2000; Nogales y col., 1999). Parece, por tanto, que la acción esencial del taxol es estabilizar al lazo M de la tubulina en una conformación que favorece la estabilidad de los contactos laterales entre protofilamentos (Li y col., 2002) (figura 15). Otros autores sugieren que el taxol actúa, además, induciendo un efecto conformacional desde su sitio de unión a la región de unión del fosfato gamma en la subunidad beta, contrarrestando así el cambio producido por la pérdida de éste tras la polimerización (Amos y Lowe, 1999). La transmisión de este cambio conformacional se podría efectuar a través de la hélice H7, ya que ésta contacta

con la molécula de taxol y con la de nucleótido (figura 15). Otra posibilidad es que el taxol establezca la conformación de la tubulina contra el movimiento del dominio intermedio con respecto al dominio de unión de nucleótido (Amos y Lowe, 1999). Un movimiento en las posiciones relativas de estos dos dominios se observa tanto en la estructura de FtsZ unida a GDP (Nogales y col., 1998a) como en la estructura del complejo tubulina-stathmina-colchicina, que se supone ha de ser similar a la forma inactiva tubulina GDP (Ravelli y col., 2004). Unido en la interfase de estos dos dominios, el taxol estaría en una posición adecuada para inhibir este movimiento (figura 15). Sin embargo, desde el punto de vista meramente termodinámico, ninguno de esos mecanismos son necesarios para inducir el ensamblaje de tubulina y estabilizar microtúbulos, ya que el solo hecho de que el taxol se una solamente a los microtúbulos (con alta afinidad) y no a la tubulina dimérica, implica un desplazamiento del equilibrio de polimerización hacia la forma polimerizada (Díaz y col., 1993) (ecuación 1)



donde $\text{MTB}_{(n)}$ representa a un microtúbulo compuesto de "n" dímeros de tubulina, TUB representa a un dímero de tubulina y LIG representa cualquier ligando que se una reversiblemente al sitio de taxol. Dado que el taxol se une con alta afinidad a los microtúbulos, el equilibrio estará desplazado hacia la derecha (es decir, hacia la forma polimerizada y unida a ligando) en la ecuación 1.

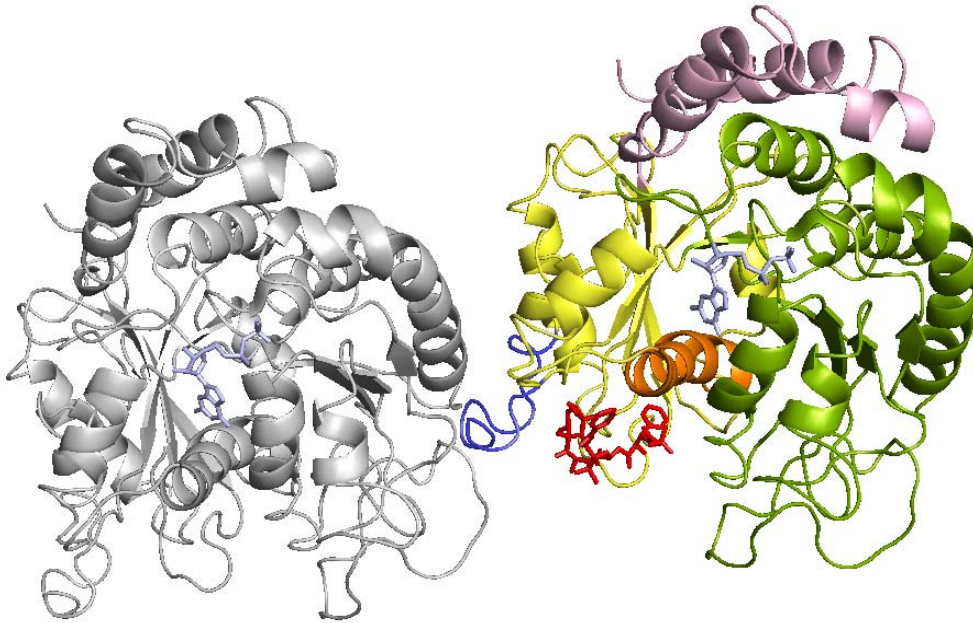


Figura 15. Mecanismo de acción del taxol. Representación de dos subunidades beta tubulina en dos protofilamentos adyacentes de un microtúbulo, vistas desde el "extremo +". El GDP y el taxol se muestran en modelo de barras (azul claro y rojo, respectivamente). Existen varias hipótesis sobre cómo el taxol estabiliza los microtúbulos; es posible que el taxol estabilice el lazo M (azul oscuro) de la subunidad beta de la tubulina en una conformación que favorece la estabilidad de los contactos laterales entre protofilamentos (Li y col., 2002). También es posible que el taxol actúe induciendo un efecto conformacional desde su sitio a la región de unión del fosfato gamma, contrarrestando el cambio producido por la pérdida de éste. Se ha propuesto que la transmisión de este cambio conformacional se podría efectuar a través de la hélice H7 (naranja), ya que ésta contacta con la molécula de taxol y con la de nucleótido (Amos y Lowe, 1999). Otra posibilidad es que el taxol estabilice la conformación de la tubulina contra el movimiento del dominio intermedio (amarillo) con respecto al dominio de unión de nucleótido (verde). El dominio C-terminal se muestra coloreado en violeta. La posición del taxol, unido entre estos dos dominios, sería adecuada para inhibir este movimiento.

Por supuesto es también posible que el efecto del taxol sea una combinación de todo lo descrito anteriormente. En cualquier caso, lo que sí que parece claro es que el efecto del taxol es estabilizar un estado conformacional, más que servir como "pegamento" entre los protofilamentos y la presencia del taxol compensaría así el estrés conformacional que se produce tras la hidrólisis del nucleótido y que tiende a desestabilizar el microtúbulo (Krebs y col., 2005).

A diferencia de la colchicina o los alcaloides de la vinca, los compuestos que se unen al sitio de taxol no se unen al dímero de tubulina, sino que sólo se unen a los microtúbulos. Es posible que se necesite el polímero para crear el sitio completo o que sea necesaria la conformación de la proteína polimerizada para tener un sitio de alta afinidad al que se pueda unir el taxol (Díaz y col., 1993). Además, este sitio

se encuentra en el interior de los microtúbulos (Nogales y col., 1999), lo que está en desacuerdo con los datos cinéticos de la unión de análogos fluorescentes de taxol (flutax), cuya velocidad de unión estaría limitada por difusión (Díaz y col., 2003; Díaz y col., 2000). Además, la unión del taxol en el interior de los microtúbulos es totalmente incompatible con la formación de complejos terciarios flutax-anticuerpo-microtúbulo que han sido recientemente descritos (Díaz y col., 2005). Por ello, se ha propuesto la unión previa del taxol a un sitio accesible en la superficie externa de los microtúbulos y una posterior interiorización a través de los poros de la pared del microtúbulo mediante un mecanismo de translocación hacia el sitio en el interior del microtúbulo (Díaz y col., 2003).

4.2.2. Compuestos que se unen al sitio de laulimalida

La laulimalida se aisló originalmente como un agente citotóxico de esponjas procedentes de Indonesia, Vanuatu y Okinawa (Corley y col., 1988; Quiñoa y col., 1988); (Jefford y col., 1996). Posteriormente, se describió su actividad estabilizadora de microtúbulos, idéntica a la del taxol (Mooberry y col., 1999) y su unión a un sitio diferente al de éste (Pryor y col., 2002).

El pelorusido A se aisló también de una esponja marina (*Mycale hentscheli*) (West y col., 2000) y posee elevada citotoxicidad con unos efectos en células similares a los del taxol (Hood y col., 2002).

La laulimalida, al igual que el taxol, es capaz de inducir el ensamblaje de tubulina para formar microtúbulos y se une a éstos con estequiometría 1:1 (una molécula de ligando por dímero de tubulina), es decir, se puede unir a la vez una molécula de taxol y otra de laulimalida en el mismo dímero de tubulina de un microtúbulo (Pryor y col., 2002). Además, taxol y laulimalida inducen la polimerización de tubulina *in vitro* de forma sinérgica, y este efecto es máximo cuando la relación taxol/laulimalida es 1:1 (Gapud y col., 2004). Como es de esperar, las células con mutaciones en el sitio de taxol resistentes a éste son sensibles a laulimalida y pelorusido A (Gaitanos y col., 2004; Pryor y col., 2002). Además, las células con fenotipo MDR son sensibles a estos dos ligandos, lo que indica que son

peores sustratos para la glicoproteína P que el taxol (Gaitanos y col., 2004; Pryor y col., 2002).

El sitio de unión de laulimalida y pelorusido A en el dímero de tubulina no se conoce, aunque aproximaciones computacionales han predicho que éste podría estar situado en alfa tubulina, cerca del lazo B9-B10, en un sitio que sería equivalente al de taxol en beta tubulina (figura 13) (Pineda y col., 2004). No obstante, no existen aún evidencias experimentales que avalen esta hipótesis.

Materialles y Métodos

1. Ligandos y productos químicos

1.1. Ligandos

Para el desarrollo de este trabajo se ha usado el máximo número posible de compuestos previamente descritos en la bibliografía como estabilizadores de microtúbulos (figura 1 de Resultados). El taxol (Schiff y col., 1979) fue donado por M. Suffness del Instituto Nacional del Cáncer (Bethesda, MD). El docetaxel (Bissery y col., 1991) proviene de Rhône Poulenc Rorer, Aventis (Schiltigheim, Francia). Las epotilonas (Bollag y col., 1995), sarcodictinas (Hamel y col., 1999) y eleuterobina (Hamel y col., 1999; Long y col., 1998) se sintetizaron en el laboratorio del Dr. Nicolaou del Instituto Skags de Química Biológica (Instituto de Investigación Scripps, La Jolla, CA). El lonafarnib (Shi y col., 2000) proviene del Instituto de Investigación Schering Plough (Kenilworth, NJ). La ciclostreptina (Sato y col., 2000a) fue donada por el Dr. Sorensen de la Universidad de Princeton (Princeton, NJ). El esteroide (3,17 β -diacetoxi- 2-etoxi- 6-oxo-B-homo- estra- 1,3,5(10)- trieno) (Verdier-Pinard y col., 2000) fue donado por el Dr. Hamel del NIH (Frederick, MD). El Dr. G. Appendino de la Universidad del Piamonte Oriental (Italia), nos cedió los poliésteres de jatrofano (Miglietta y col., 2003). Las tacalonolidas (Tinley y col., 2003) provienen de la Dra. Mooberry de la Fundación Suroeste par la Investigación Biomédica (San Antonio, TX). El Dr. Paterson del Laboratorio de Química de la Universidad de Cambridge (UK) nos envió la dictiostatina (Isbrucker y col., 2003), la discodermolida (Kowalski y col., 1997a) y la laulimalida (Mooberry y col., 1999). El pelorusido A (Hood y col., 2002) proviene del Dr. Miller de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Victoria de Wellington (Nueva Zelanda). Existen, además, otros compuestos descritos como agentes estabilizadores de microtúbulos, que no se han utilizado en este trabajo: benzofenonas de poli-isoprenilo (Roux y col., 2000), GS-164 (Shintani y col., 1997), cerataminas (Karjala y col., 2005), partenolida (Miglietta y col., 2004), custonolida (Bocca y col., 2004), ferulenol (Bocca y col., 2002) y rhazinilam (Dupont y col., 1999). El flutax-2 (derivado fluorescente de taxol, (Evangelio y col., 1998)) se sintetizó en el laboratorio del Dr. Amat-Guerri en el Instituto de

Química Orgánica (CSIC, Madrid). La luteína (Crabtree y col., 2001) y el dicumarol (Madari y col., 2003) son de Sigma. El [³H]-taxol (actividad específica 16.2 Ci/mmol) proviene del Departamento de Síntesis y Química de Fármacos del Instituto Nacional del Cáncer (Frederick, MD). La [¹⁴C]-epotilona B (actividad específica 111 Ci/mmol) proviene de Novartis Pharma AG y la [³H]-discodermolida (actividad específica 14.4 Ci/mmol) fue cedida por Novartis Pharmaceuticals Corp. Todos los compuestos se diluyeron en DMSO a una concentración final de 5-10 mM y se almacenaron a -20°C.

La pureza de los ligandos se comprobó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, absorbancia a 220 nm) usando una columna de fase inversa C18 (Supercosil, LC18-DB, 250x4.6 mm) equilibrada en 70/30 metanol/agua (v/v) o 50/50 acetonitrilo/agua (v/v) con un flujo isocrático de 1 ml/min en un cromatógrafo Shimadzu 10AD equipado con un detector espectrofotométrico UV-visible Shimadzu SPD10AV.

El taxol, docetaxel, pelorusido A, laulimalida, ciclostreptina y las tacalonolidas también se caracterizaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) en un cromatógrafo Agilent 110 LC/MSD, usando una columna de fase reversa C18 y un flujo isocrático (1 mL/min) de acetonitrilo/agua 5/95 (v/v) durante 5 min, seguido de un gradiente lineal hasta 100 % acetonitrilo en 30 min. Ambos disolventes, agua y acetonitrilo, contenían 0.04 % de ácido trifluoroacético. En el detector de masas, el voltaje del capilar se ajustó a 5000 V, la energía de colisión se fijó a 150 eV y se usó nitrógeno a 350 °C como gas de secado.

La solubilidad de los ligandos a las concentraciones experimentales usadas se comprobó con controles paralelos a cada experimento que sólo contenían ligando.

1.2. Productos químicos

El SDS (dodecil sulfato sódico) y el EGTA (tetra-acetato de etilenglicol) fueron de Sigma Chemical Co. El Sephadex G25 y el DEAE Sephadex A50 fueron de Amersham. El GTP fue de Roche y el GDP de Sigma. El glicerol (grado analítico), el

DMSO (grado espectroscopía), el metanol (grado HPLC), el etanol (grado espectroscopía), el fosfato monosódico y disódico (grado analítico), el EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético), el borohidruro sódico, el cloruro magnésico y el acetato de uranilo fueron de Merck. El cloruro de guanidina fue de United States Biochemical Corp. El acetonitrilo fue de Scharlau CEIME (grado HPLC). Todos los demás productos utilizados en este trabajo fueron de Merck de grado analítico o mejor.

1.3. Tampones

Tampón PEDTA4-1mM GTP: 10 mM fosfato sódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), 1 mM EDTA, 4 mM MgCl_2 y 1 mM GTP, pH 7.0

Tampón PEDTA4-1mM GDP: 10 mM fosfato sódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), 1 mM EDTA, 4 mM MgCl_2 y 1 mM GDP, pH 7.0

Tampón PEDTA7-1mM GTP: 10 mM fosfato sódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), 1 mM EDTA, 7 mM MgCl_2 y 1 mM GTP, pH 7.0

Tampón PEDTA-0.1 mM GTP: 10 mM fosfato sódico, 1 mM EDTA, 0.1 mM GTP, pH 7.0

Tampón PEDTA-1 mM GTP: 10 mM fosfato sódico, 1 mM EDTA, 1 mM GTP, pH 7.0

Tampón GAB-1mM GTP: 10 mM fosfato sódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), 3.4 M glicerol, 1 mM EGTA, 6 mM MgCl_2 , 1 mM GTP, pH 6.5

Tampón GAB-0.1mM GTP: 10 mM fosfato sódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), 3.4 M glicerol, 1 mM EGTA, 6 mM MgCl_2 , 0.1 mM GTP, pH 6.5

Tampón AB-1mM GTP: 100 mM Mes, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 1 mM 2-mercaptoetanol, pH 6.7

Tampón A: 5 /95 acetónitrilo/agua (v/v), 0.5 % ácido acético

Tampón B: 95 /5 acetónitrilo/agua (v/v), 0.5 % ácido acético

Tampón PBS: 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM NaH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.2

Tampón PEM: 0,1 M Pipes, 2 mM MgCl₂, 1mM EGTA, pH 6.8

2. Proteínas

2.1. Preparación de tubulina

Los cerebros bovinos empleados para la purificación de tubulina procedían del Matadero Madrid Norte de San Agustín de Guadalix, Madrid. La tubulina se preparó a partir de cerebro de choto (menor de 24 meses) por el procedimiento de Weisenberg con algunas modificaciones (Lee y col., 1973; Weisenberg y col., 1968) (Andreu y col., 1984) y se almacenó en nitrógeno líquido en un tampón que contenía 1M de sacarosa. El protocolo de purificación consistió en la homegeneización de los cerebros (usando un homogeneizador de aspas) y la eliminación de las membranas celulares por centrifugación. Tras esto, se procedió al fraccionamiento con sulfato amónico (32 %) y la posterior precipitación de la proteína (43 % sulfato amónico). El precipitado se resuspendió y la tubulina se purificó por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex A50. El eluido se precipitó con sulfato amónico y se resuspendió en un volumen pequeño para cargarlo en una columna de cromatografía de filtración en gel Sephadex G25, seguida de una nueva precipitación con Mg²⁺ para seleccionar sólo la proteína activa (capaz de polimerizar). El exceso de Mg²⁺ se eliminó por diálisis durante toda la noche en un tampón que contenía 1 M sacarosa como estabilizador. Normalmente, se partía de

8-9 cerebros de choto (unos 2-3 kg) y se obtenían unos 400-600 mg de tubulina pura (>98 %) y activa.

Antes de cada experimento, la proteína se descongeló rápidamente y se equilibró en el tampón deseado mediante cromatografía de filtración en gel (Sephadex G25). Las fracciones eluidas con elevada densidad óptica (λ 295 nm) se juntaron y se centrifugaron durante 10 minutos a 4°C a 90000 g para eliminar posibles agregados proteicos. Las concentraciones de tubulina se determinaron espectrofotométricamente empleando los siguientes coeficientes de extinción molar: $\epsilon_{275} = 109000 \text{ M}^{-1}$ en 6 M cloruro de guanidina y $\epsilon_{275} = 107000 \text{ M}^{-1}$ en tampón 10 mM fosfato sódico, 0.5% SDS, pH 7.0 (Andreu y col., 1984). Las concentraciones muy bajas de proteína se midieron espectrofluorimétricamente en tampón 10 mM fosfato sódico, 0.5% SDS, pH 7.0 (λ_{exc} 280 nm y λ_{em} 320 nm), utilizando estándares de tubulina cuya concentración se había determinado anteriormente espectrofotométricamente.

2.1.1. Preparación de tubulina GDP

Para obtener disoluciones homogéneas de tubulina GDP (Díaz y Andreu, 1993) se tomaron unos 20-40 mg de proteína y se eliminó la sacarosa que contenía el tampón de almacenamiento mediante una columna semiseca de centrífuga de Sephadex G25 (0.9 x 10 cm) equilibrada en tampón 10 mM fosfato sódico, 1 mM EDTA, 1 mM GDP, pH 7.0. El eluido se incubó en hielo durante 10 minutos con 10 mM de GDP. El exceso de nucleótido se eliminó mediante cromatografía de filtración en gel de Sephadex G25 (0.9 x 10 cm). Las fracciones eluidas con elevada densidad óptica (λ 295 nm) se juntaron y se centrifugaron durante 10 minutos a 4 °C a 90000 g. La concentración final de proteína se midió espectrofotométricamente empleando los coeficientes de extinción anteriormente descritos.

2.1.2. Preparación de tubulina GTP

Para obtener disoluciones homogéneas de tubulina GTP (Díaz y Andreu, 1993) se tomaron unos 20-40 mg de proteína y se eliminó la sacarosa que contenía el tampón

de almacenamiento mediante una columna semi-seca de centrífuga de Sephadex G25 (0.9 x 10 cm) equilibrada en tampón 10 mM fosfato sódico, 1 mM EDTA, 0.1 mM GTP, pH 7.0 y el eluido se cargó en una columna de Sephadex G25 (0.9 x 10 cm). Las fracciones eluidas con elevada densidad óptica a 295 nm se colectaron y se centrifugaron durante 10 minutos a 4 °C a 90000 g. La concentración final de proteína se midió espectrofotométricamente como se ha descrito anteriormente.

Alternativamente, con objeto comparativo, se preparó tubulina GDP y se añadió posteriormente GTP hasta una concentración final de 1 mM.

2.2. Preparación de proteína microtubular

La proteína microtubular (MTP, es decir tubulina y proteínas asociadas a microtúbulos) de cerebro bovino se preparó mediante dos ciclos de polimerización/despolimerización tal y como se ha descrito anteriormente (de Pereda y col., 1995). El protocolo consistió en la homogeneización de los cerebros, eliminación de las membranas celulares por centrifugación. Posteriormente, la proteína microtubular se purificó mediante dos ciclos de polimerización y despolimerización, usando tampones que contenían 3.5 M glicerol y ciclos de calentamiento a 37 °C para polimerizar, y enfriamiento a 4 °C para despolimerizar los microtúbulos (de Pereda y col., 1995).

La concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) usando como reactivo *BioRad protein assay* (BioRad) y albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Las concentraciones de proteína microtubular se calcularon multiplicando las concentraciones obtenidas por un factor de 1.20 para disoluciones acuosas neutras y por 1.38 para disoluciones con 1M NaCl, para corregir por la diferencia entre el patrón (BSA) y la proteína microtubular (de Pereda y col., 1995).

2.3. Preparación de microtúbulos estabilizados

Se cargaron 40 mg de tubulina pura en una columna de cromatografía por filtración en gel de Sephadex G25 (0.9 x 25 cm) equilibrada con dos volúmenes de tampón 10

mM fosfato sódico, 1 mM EGTA, 0.1 mM GTP, 3.4 M glicerol, pH 6.8. Las fracciones de mayor densidad óptica (λ 295 nm) se juntaron y se centrifugaron a 90000 g, 4° durante 10 minutos, para eliminar los posibles agregados. La concentración de proteína se ajustó a 50 μ M, se añadió Mg^{2+} y GTP hasta una concentración final de 6 mM y 1 mM, respectivamente y se comprobó que el pH de la disolución era 6.5. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 37°C para inducir la polimerización de microtúbulos, se añadió glutaraldehído hasta una concentración final de 20 mM y se incubó la muestra a 37 °C durante otros 10 minutos. El exceso de glutaraldehído se eliminó incubando la muestra en hielo con una disolución 40 mM $NaBH_4$ durante 10 minutos y eliminando las burbujas producidas, al vacío o por centrifugación suave. La muestra se dializó durante toda la noche usando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer 10K (Pierce) frente al tampón GAB-0.1 mM GTP. Tras la diálisis, los microtúbulos estabilizados se congelaron gota a gota y se almacenaron en nitrógeno líquido. Se ha comprobado por sedimentación que siguiendo este procedimiento, alrededor de un 80% de la proteína total se encuentra polimerizada (formando parte de los microtúbulos) y la estequiometría, cinética y especificidad de unión del flutax-2 a estos polímeros es la misma que para microtúbulos control no estabilizados. Además, cuando se observan por microscopía electrónica, estos microtúbulos tienen una morfología idéntica a los no estabilizados (Díaz y col., 2000).

2.3.1. Medida de la concentración de sitios de taxol en microtúbulos estabilizados

Para medir la concentración de sitios de taxol en los microtúbulos estabilizados, se midió la concentración total de tubulina espectrofotométricamente, como se ha descrito anteriormente, y se prepararon diluciones con una concentración total de tubulina de 2 μ M. Estas diluciones se incubaron a temperatura ambiente con 5 μ M de flutax-2, en presencia o ausencia de 100 μ M de docetaxel. Los microtúbulos se precipitaron por centrifugación a 90000 g, a 25°C durante 20 minutos. Se separaron cuidadosamente los sobrenadantes de los precipitados, los últimos se

resuspendieron en tampón 10mM fosfato sódico, 1% SDS, pH 7.0, y ambos se diluyeron 5 veces en ese mismo tampón. La concentración de flutax-2 se determinó espectrofluorimétricamente (λ_{exc} 495 nm y λ_{em} 520 nm; aperturas de 2 y 5 nm, respectivamente). Para calcular la concentración de sitios de taxol en los microtúbulos estabilizados, se ha de restar la concentración de flutax-2 en el precipitado en presencia de docetaxel, a la concentración de flutax-2 en el precipitado en ausencia de docetaxel. La cantidad resultante es la concentración de flutax-2 unido reversiblemente en condiciones de saturación, que es igual a la concentración de sitios de taxol en la muestra y que puede ser extrapolado a la muestra de partida. Aproximadamente un 95% de los dímeros en los microtúbulos estabilizados son capaces de unir taxol reversiblemente. La concentración de sitios en los microtúbulos estabilizados decae lentamente a 4°C con una velocidad de 0.02 a 0.05 días⁻¹ (tiempo de vida medio de 5 y 2 semanas, respectivamente). El almacenamiento en nitrógeno líquido de los microtúbulos estabilizados, permite mantener constante la concentración de sitios de unión de taxol durante años.

3. Efectos de los ligandos en células

Los experimentos destinados al estudio comparativo del efecto de los ligandos en las células, se realizaron en el laboratorio de la Dra. Isabel Barasoain del Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid.

3.1. Cultivos celulares

Las células humanas de carcinoma de ovario (1A9), carcinoma de pulmón (A549, cedidas por la Dra. Giannakakou del Instituto del Cáncer Winship, en la Escuela de Medicina de la Universidad Emory, Atlanta, GA) y de leucemia monocítica (U937) se cultivaron en medio RPMI-1640 complementado con un 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-Glutamina, 40 µg/mL gentamicina, 100 IU/mL penicilina y 100 µg/mL de estreptomina.

3.2. Inmunofluorescencia indirecta

Las células A549 (100000/mL) se cultivaron en placas de 24 pocillos sobre cubres redondos de 12mm durante la noche. A la mañana siguiente se añadieron los ligandos a diferentes concentraciones o el volumen equivalente de DMSO (cantidad residual de DMSO menor del 0.5%) y se incubaron durante 24 horas más. Para no perder las células que pudieran estar despegadas, las placas se lavaron por centrifugación y las células en los cubres se permeabilizaron durante 90 segundos con 0.5 % Triton X100 en PEM (0,1 M Pipes, 2 mM MgCl₂, 1mM EGTA, pH 6.8) y se fijaron con 3.7% formaldehído en PEM durante 30 minutos, como se ha descrito previamente (de Ines y col., 1994). Después de lavar con PBS, los citoesqueletos se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti alfa-tubulina DM1A (Sigma) a una dilución 1/400 en PBS con BSA 1% durante una hora a 37 °C, se lavaron dos veces en PBS y se incubaron durante una hora más con anticuerpos de cabra anti inmunoglobulinas de ratón marcados con FITC (Sigma) a una dilución 1/100 en PBS con BSA 1%. Los cubres se lavaron en PBS, y el ADN se tiñó con 0.1 g/mL Hoechst 33342 (Sigma) en PBS durante 30 minutos. Las muestras se examinaron y se fotografiaron usando un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan equipado con una cámara CCD Hamamatsu 4742-95.

3.3. Ensayos de citotoxicidad

Las células 1A9 ó A549 se distribuyeron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10.000 células por pocillo en 50 µl de medio de cultivo. Al día siguiente se añadieron 50 µl de diluciones seriadas (desde 0.005 nM hasta 40 µM) de ligando y se incubaron durante 72 horas más. Tras esta incubación, se determinaron la células viables mediante un ensayo MTT (Smith y col., 1988) con algunas modificaciones. 20 µL de 2.5 mg/mL MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolio) se añadieron a cada pocillo y se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Después se añadió solubilizador de MTT (10% SDS, 45% dimetilformamida, pH 5.5) y las placas se incubaron de nuevo a 37°C durante toda la noche, para solubilizar el precipitado azul de formazán antes de medir la absorbancia de los

pocillos a 595/690 nm en un lector de placas Titertek MultiScan MC. Como blancos, se utilizaron pocillos que no contenían células y como controles de crecimiento, pocillos con células sin ligando. Las IC_{50} se calcularon de la curva dosis-respuesta y se expresaron como el promedio de al menos cuatro experimentos diferentes.

3.4. Análisis de ciclo celular

El efecto de los ligandos sobre la progresión del ciclo celular se realizó determinando el contenido en ADN (teñido con ioduro de propidio) mediante citometría de flujo. Se incubaron células U937 (300000/mL) con diferentes concentraciones de ligando durante 17 horas, se lavaron con PBS, se fijaron con 70/30 etanol/agua (v/v) a 4 °C, durante una hora. Las muestras se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 500 μ L de PBS, que contenía 60 μ g/mL de RNasa A libre de DNasa, y 50 μ g/mL de ioduro de propidio. Las muestras se incubaron de nuevo a 37 °C, durante 30 minutos y se analizaron en un citómetro de flujo Coulter Epics XL, tal como se ha descrito anteriormente (Andreu y Barasoain, 2001).

4. Modulación del ensamblaje de tubulina por ligando

4.1. Ensamblaje de tubulina inducido por ligando

Se prepararon muestras de tubulina GTP o tubulina GDP, libres de proteínas asociadas a microtúbulos, en el tampón deseado, tal y como se ha descrito anteriormente y la concentración crítica del ensamblaje se midió empleando diferentes concentraciones de tubulina en tampón PEDTA4-1mM GTP o PEDTA1-1mM GDP, respectivamente. Experimentos control muestran que en estos tampones la tubulina es incapaz de ensamblar en ausencia de ligandos a concentraciones menores de 200 μ M (Díaz y col., 1993). Para determinar las concentraciones críticas del ensamblaje de tubulina inducido por ligando, se incubaron concentraciones crecientes de tubulina GTP, o GDP, desde 1 hasta 60 μ M (dependiendo del ligando) a 37 °C durante 30 minutos, en presencia del ligando a

una concentración 10% en exceso sobre la concentración de tubulina. Los polímeros se sedimentaron por centrifugación a 90000 g, durante 20 minutos a 37°C. Los sobrenadantes se separaron cuidadosamente de los precipitados y éstos se resuspendieron en tampón 10 mM fosfato sódico, 1% SDS, pH 7.0. Los precipitados y los sobrenadantes se diluyeron 10 veces en el mismo tampón y sus concentraciones se determinaron fluorimétricamente empleando un espectrofluorímetro Fluorolog-3-221 (Jobin Yvon-Spex, Longjumeau, Francia), tal y como se ha descrito anteriormente.

Considerando una polimerización por condensación nucleada no covalente, la concentración crítica es igual a la concentración de tubulina en el sobrenadante (que debe ser igual a la concentración de tubulina dada por la extrapolación y = 0 de la representación $[\text{tubulina}]_{\text{precipitado}} \text{ vs } [\text{tubulina}]_{\text{total}}$ (Oosawa y Asakura, 1975)). Las constantes aparentes de crecimiento del polímero ($K_{\text{el}}^{\text{ap}}$) corresponden al recíproco de la concentración crítica (Oosawa y Asakura, 1975). Los polímeros ensamblados se observaron por microscopía electrónica tal y como se describe más adelante.

4.2. Modulación del ensamblaje de tubulina por ligando

La modulación del ensamblaje de tubulina por ligando, es decir, la variación inducida por ligando de la concentración crítica del ensamblaje de tubulina, se determinó incubando muestras de tubulina GTP (15 y 20 μM) en presencia de un 10% exceso de ligando (con respecto a la concentración de tubulina), en tampón GAB-1mM GTP. En este tampón, la tubulina es capaz de ensamblar por sí sola en ausencia de ligando, con una concentración crítica de $3.3 \pm 0.02 \mu\text{M}$ (37 °C). Los polímeros formados se precipitaron por centrifugación a 90000 g durante 20 minutos a 37 °C, y los precipitados y sobrenadantes se procesaron como se ha descrito anteriormente. Las concentraciones de tubulina se midieron fluorimétricamente como se describió previamente.

4.3. Modulación del ensamblaje de proteína microtubular por los ligandos

El efecto de los ligandos sobre la polimerización también se ensayó en un sistema que contenía proteínas asociadas a microtúbulos, de la siguiente manera: 1mg/mL de proteína microtubular se incubó en tampón 100 mM Mes, 1 mM EGTA, 1 mM MgSO₄, 1 mM 2-mercaptoetanol, pH 6.7 (tampón AB-1mM GTP) durante 30 minutos a 37°C en la presencia de un 10% de exceso de ligando sobre la concentración de proteína microtubular. Los polímeros se precipitaron a 90000 g durante 20 minutos en un rotor pre-equilibrado a 37°C. Los sobrenadantes se separaron cuidadosamente de los precipitados y éstos se resuspendieron en una disolución 1 M NaCl. Las concentraciones de proteína microtubular se midieron por el método de Bradford como se ha descrito anteriormente.

4.4. Estabilización de los microtúbulos frente al frío por los ligandos

Para comprobar el efecto de los ligandos sobre la despolimerización de los microtúbulos inducida por frío, se incubaron disoluciones de tubulina 15 y 20 μ M en presencia de un 10% exceso de ligando (sobre la concentración de tubulina) en tampón GAB-1mM GTP a 37°C durante 30 minutos. Tras esta incubación, una vez producido el ensamblaje, las muestras se incubaron durante 10 minutos a 4 °C. Los polímeros de las muestras se precipitaron por centrifugación y los precipitados y los sobrenadantes se procesaron como se ha descrito antes. La concentración de proteína se determinó fluorimétricamente como se ha descrito anteriormente.

5. Estructura de los microtúbulos inducidos por ligando

5.1. Microscopía electrónica

25-30 μ L de las muestras (normalmente 20-30 μ M) se adsorbieron sobre rejillas de cobre cubiertas por *formvar*, se tiñeron con 1% de acetato de uranilo durante 30 segundos y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1230 (Jeol, Tokio, Japón). El número de protofilamentos de los microtúbulos y el tipo de red que formaban se determinó a partir de los patrones de bandas observados en las micrografías, tal y como se describe en (Wade y col., 1990).

5.2. Medidas de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)

Las medidas de dispersión de rayos X se llevaron a cabo en la estación 2.1 (difracción no cristalina con resolución temporal) de la fuente de radiación sincrotrón en el laboratorio de Daresbury (Daresbury, Inglaterra). La cámara de detección se situó a una distancia de 3 metros de la muestra, de tal forma que se cubrió un rango de vectores de dispersión S (definido como el inverso del espaciado de Braggs, $2(\sin\theta)/\lambda$) desde 0.02 hasta 0.33 nm^{-1} . La intensidad de los rayos X era de aproximadamente 4×10^{11} fotones s^{-1} en una sección de muestra de $0.6 \times 7 \text{ mm}^2$. Los valores absolutos de los vectores de dispersión se obtuvieron por referencia a las repeticiones de 67 nm del colágeno de cola hidratada de rata. Los perfiles de dispersión se grabaron cada 15-60 segundos. Los posibles daños por radiación de las muestras, debido a la elevada intensidad del haz, se minimizaron colocando la muestra en una celda oscilante. En caso de daño por radiación, se eliminaron los datos afectados antes de promediarlos.

El procesamiento de datos se realizó usando el conjunto de programas facilitado por el *Proyecto Computacional Colaborativo para la Difracción de Fibra y la Dispersión en Disolución* (www.ccp13.ac.uk/software/software.htm). Los datos se normalizaron por la intensidad del haz y por la respuesta del detector antes de ser procesados.

Los datos de SAXS se interpretaron por referencia a su espectro de difracción de fibra, basado en un entramado helicoidal de la superficie de los microtúbulos (Amos y Klug, 1974), como se ha descrito previamente (Andreu y col., 1992; Andreu y col., 1994). Los radios helicoidales de los microtúbulos y el número de protofilamentos de éstos se calcularon por interpolación, usando los resultados previamente descritos (Andreu y col., 1992; Andreu y col., 1994; Díaz y col., 1994).

6. Interacción de los ligandos con los microtúbulos

6.1. Determinación de la unión de ligandos a microtúbulos

6.1.1. Determinación de la unión de ligandos a microtúbulos por HPLC

Se incubaron muestras que contenían 30 μM de sitios de taxol en microtúbulos estabilizados (preparados como se ha descrito anteriormente) o nativos, no estabilizados (ensamblados a partir de 30 μM tubulina GTP en tampón GAB-1 mM GTP), en presencia del ligando durante 30-120 minutos a la temperatura deseada. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron a 90000 g, los sobrenadantes se separaron de los precipitados y éstos se resuspendieron en tampón 10 mM fosfato sódico, pH 7.0. Se extrajeron tres veces con un volumen de diclorometano, se secaron al vacío y se resuspendieron en 25 μL de metanol/agua 70/30 (v/v) o acetonitrilo/agua 50/50 (v/v). Las muestras se procesaron por HPLC como se ha descrito anteriormente usando el correspondiente tampón como fase móvil.

6.1.2. Unión de pelorusido A a los microtúbulos

La detección de la unión del peloruside A (y laulimalida como control) a los microtúbulos se realizó por espectrometría de masas MALDI-TOF, en el servicio de espectrometría de masas del Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC (Madrid). Las muestras, conteniendo los ligandos, se mezclaron con un volumen idéntico (0.5 μL) de matriz (ácido 2,5-dihidroxibenzoico 10 mg ml^{-1}) y se secaron al aire, antes de ser analizadas utilizando un aparato BIFLEX III (Bruker-Franzen Analytik, Bremen, Alemania). Las muestras se analizaron polaridad positiva, modo reflector y, normalmente, 100 pulsos láser se sumaron en un solo espectro. La calibración externa se realizó registrando los picos monoisotópicos de la angiotensina (m/z 1046.5) y de la matriz CCA (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico; m/z 379).

6.1.3. Interacción de la ciclostreptina con tubulina no polimerizada y con microtúbulos

6.1.3.1. Unión de la ciclostreptina a los microtúbulos

Los análisis correspondientes a los experimentos de unión de la ciclostreptina se realizaron en el Departamento de Química Analítica de PharmaMar (Comenar Viejo, Madrid) como se describe a continuación. Muestras que contenían ciclostreptina y microtúbulos estabilizados (20 y 30 μM de ciclostreptina con 25 y 35 μM de microtúbulos, respectivamente) se incubaron durante 30 minutos a 25 °C en tampón GAB-0.1 mM GTP. De forma paralela, se realizaron experimentos control con microtúbulos no estabilizados polimerizados en tampón GAB-1mM GTP, a partir de 20 μM de tubulina y 25 μM de ciclostreptina. Las muestras se centrifugaron a 90000 g durante 10 minutos, a 25 °C. Los sobrenadantes se separaron cuidadosamente de los precipitados y éstos se resuspendieron en tampón 10 mM fosfato sódico, pH 7.0. Tanto los precipitados como los sobrenadantes se extrajeron tres veces con un volumen de diclorometano, se secaron al vacío y se disolvieron en 200 μL de metanol. Como estándar interno, se utilizaron concentraciones conocidas de docetaxel. Las concentraciones de ciclostreptina unida a los microtúbulos precipitados y libre en el sobrenadante se determinaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) en un cromatógrafo Agilent 110 LC/MSD. 100 μL de las disoluciones extraídas se inyectaron en una columna de fase inversa C18 y se analizaron a un flujo isocrático (1 mL/min) de agua/acetonitrilo 95/5 durante 5 min y después se aplicó un gradiente lineal hasta 100 % acetonitrilo en 30 min. Ambos disolventes, agua y acetonitrilo, contenían 0.04 % de ácido trifluoroacético. En el detector de masas, el voltaje del capilar se ajustó a 5000 V, la energía de colisión fue de 150 eV y se usó nitrógeno a 350 °C como gas de secado.

6.1.3.2. Caracterización de la molécula de ciclostreptina por espectrometría de masas

Con objeto de determinar los residuos de tubulina modificados por ciclostreptina, se caracterizó en primer lugar la molécula de ciclostreptina y su espectro de fragmentación por espectrometría de masas. Todos los experimentos de espectrometría de masas realizados con este fin se realizaron en el servicio de proteómica del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (Madrid) utilizando un sistema híbrido 4000 Q-Trap LC/MS/MS (Applied Biosystems /MDS Sciex, Concord, ON, Canada).

La figura 16 muestra el espectro de masas de la ciclostreptina. El pico con relación masa/carga (m/z) 401.2 corresponde a la señal de la masa monoisotópica de la molécula de ciclostreptina monoprotonada. También se observan los aductos de sodio y potasio (figura 16).

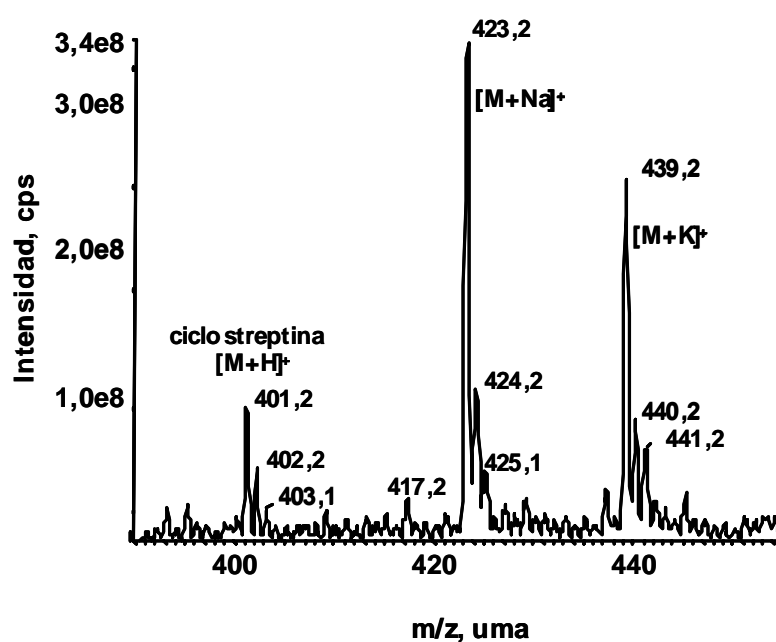


Figura 16. Espectro de masas de la molécula de ciclostreptina. Se observan los picos correspondientes a la masa monoisotópica de la molécula de ciclostreptina monoprotonada (401.2 Da) y a los aductos de sodio (423.2 Da) y potasio (439.2 Da).

Cuando la molécula de ciclostreptina se rompe, se generan fragmentos que corresponden a roturas simples o múltiples de la molécula (figura 17A). Estos fragmentos se pueden usar posteriormente para seleccionar los péptidos de tubulina modificados por ciclostreptina, usando la técnica de selección del ion precursor (*precursor ion scanning*, PIS), que permite seleccionar un determinado

ion precursor (correspondiente a un péptido tríptico, por ejemplo) a través de la monitorización de la generación de uno o varios de los fragmentos que, se sabe de antemano, va a liberar cuando este ion precursor sea fragmentado. De esta forma, cuando la molécula de ciclostreptina se fragmente, va a liberar los iones que se observan en la figura 17A. Usando los parámetros de adquisición de datos optimizados para el análisis mediante selección del ion precursor de péptidos trípticos y quimotrípticos, el fragmento que mejor selecciona el ion precursor (correspondiente en este caso a la molécula de ciclostreptina monoprotónada, m/z 401.2 Da) es el fragmento con m/z 249 Da (figura 17B). La eficiencia de selección del ion precursor es, de alguna manera, menor para el resto de fragmentos generados al romper la molécula de ciclostreptina (figura 17C).

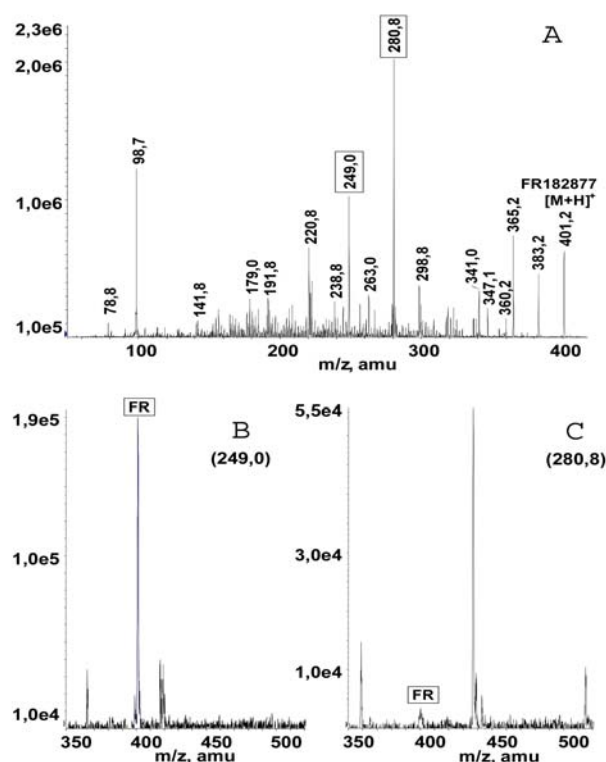


Figura 17. Espectro de fragmentación de la molécula de ciclostreptina. A. Espectro de MS/MS que muestra los fragmentos correspondientes a roturas simples o múltiples de la molécula de ciclostreptina. Abajo. Espectro de masas que muestra la selección del ion precursor (m/z 401.2 Da, en la figura marcado como FR) cuando se monitoriza la generación del fragmento a m/z 249.0 Da (B) o 280.8 Da (C). Se utilizaron los parámetros de adquisición optimizados para el análisis mediante selección del ion precursor (*precursor ion scanning*, PIS) de péptidos trípticos y quimotrípticos, que se describen en detalle en el texto. Como se puede observar, la señal del ion parental se selecciona de forma más eficiente cuando se monitoriza la señal correspondiente a la generación del fragmento a 249.0 Da. La eficiencia de la selección del ion precursor fue más baja monitorizando la generación de otros 6 fragmentos presentes en el espectro de MS/MS (panel A: 78.8, 98.7, 220.8, 298.8, 365.1 y 383.2 Da).

6.1.3.3. Determinación de los residuos de tubulina modificados por ciclostreptina en los microtúbulos

Se polimerizaron microtúbulos en tampón GAB-1mM GTP a partir de 20 μM de tubulina, en presencia de DMSO o 25 μM de ciclostreptina a 37 °C durante 50 minutos. Los microtúbulos se precipitaron por centrifugación a 90000 g durante 10 minutos a 37 °C. Los sobrenadantes se retiraron cuidadosamente con una pipeta y los precipitados se lavaron dos veces con agua destilada y se resuspendieron en 200 μL de tampón 50 mM HCO_3NH_4 , 12 mM EDTA, 0.01% SDS, pH 7.6, para despolimerizar los microtúbulos. Las muestras se diluyeron después en tampón de digestión (50 mM NH_4HCO_3) y se digirieron con tripsina (grado secuenciación, Promega, Madison, WI) o quimotripsina (Tipo VII, tratada con TLCK, Sigma, St. Louis, MO) usando 1 μg de enzima por reacción. La digestión con tripsina se realizó a 37 °C durante 2 horas, mientras que la digestión con quimotripsina se realizó a 25 °C durante 1 hora. Tras la digestión, las muestras se secaron al vacío y se conservaron a -20 °C hasta su análisis por espectrometría de masas. Las muestras digeridas se disolvieron finalmente en tampón A (5/95 acetonitrilo/agua (v/v), 0.5 % ácido acético).

Los péptidos trípticos, o quimotrípticos, resultantes de las muestras control, o tratadas con ciclostreptina, se inyectaron en una micro-columna de fase inversa C18 (300 μm ID x 5 mm PepMap™, LC Packings, Amsterdam, Holanda) para eliminar sales y se analizaron en un gradiente continuo de acetonitrilo de 0 a 50 % de tampón B en 45 minutos (95/5 acetonitrilo/agua (v/v), 0.5 % ácido acético) y posteriormente de 50 a 90 % de tampón B en 1 minuto. Se utilizó una nano-columna de fase inversa C18 (100 μm ID x 15 cm, Discovery® BIO Wide pore, Supelco, Bellefonte, PA) a un flujo constante de 300 nL/min para eluir los péptidos directamente a un capilar emisor de nano-spray PicoTip™ (New Objective, Woburn, MA) para la ionización y fragmentación, en tiempo real, de los péptidos en un sistema híbrido 4000 Q-Trap LC/MS/MS (Applied Biosystems /MDS Sciex, Concord, ON, Canada) equipado con una fuente de iones nano-spray (Protana). La nano-cromatografía líquida se realizó automáticamente, usando un generador de

nano-gradiente (Ultimate nano-HPLC, LC Packings) acoplado a un inyector automático (Famos, LC Packings). El rango de masas del instrumento se fijó a m/z 50-1500 en modo cuadrupolo y m/z 350-1500 en modo trampa iónica Lineal (LIT). En el modo de resolución mejorada, LIT escaneó a 250 Da/s y los iones de interés (los que corresponden a los péptidos modificados por ciclostreptina) se seleccionaron mediante la selección de iones precursores por la generación del ion con m/z 249 Da. El voltaje del capilar se fijó a 3000 V. Se usó nitrógeno como gas cortina (valor 15) y como gas de colisión. Todos los cromatogramas y los espectros de MS/MS se analizaron con el programa Analyst 1.4.1 (Applied Biosystems).

6.1.3.4. Determinación de los residuos modificados por ciclostreptina en la tubulina no polimerizada

Muestras de tubulina GTP 20 μ M se incubaron durante 50 minutos a 37 °C en tampón PEDTA4-0.1 mM GTP. Previamente, se realizaron los controles necesarios para comprobar que en este tampón y a esta concentración, la tubulina es incapaz de polimerizar en presencia de ciclostreptina. Estas muestras se digirieron con tripsina y quimotripsina, y se trataron exactamente igual que se ha descrito con anterioridad para las muestras de microtúbulos.

Adicionalmente, para aumentar la sensibilidad, se realizaron experimentos de rastreo múltiple de iones precursores en alta sensibilidad (*multiple reaction monitoring*, MRM), que tienen mucha mayor sensibilidad que los experimentos de selección del ion precursor. Estos experimentos se realizaron en un sistema híbrido 4000 Q-Trap LC/MS/MS, ajustado para seleccionar primero los iones parentales correspondientes a los péptidos y, a su vez, de entre éstos, seleccionar sólo aquellos que liberan el ión a m/z 249 Da, cuando son fragmentados. El voltaje del capilar se ajustó a 3000 V y se usó nitrógeno como gas cortina (valor 15) y gas de colisión. La energía de colisión se ajustó a 20 eV.

6.2. Afinidad de unión de los ligandos por los microtúbulos

6.2.1. Medidas de anisotropía de fluorescencia

La anisotropía de fluorescencia representa la polarización de la luz emitida tras la excitación de una determinada muestra con luz polarizada. La despolarización de luz puede ser debida a diferentes fenómenos, mayoritariamente inherentes al tipo de muestra, como la difusión rotacional del fluoróforo (Lakowicz, 1999). Las medidas de anisotropía cuantifican el desplazamiento angular promedio que ocurre entre la absorción y la consecuente emisión de un fotón por parte del fluoróforo. Este desplazamiento va a depender en gran medida del tamaño y la forma del fluoróforo que rota. Así, la diferencia en los valores de difusión rotacional del flutax libre y unido a microtúbulos es enorme, con lo que se puede utilizar la anisotropía de fluorescencia para distinguir entre estos dos estados del flutax.

Las medidas de anisotropía de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorímetro de formato T, Fluorolog-3-321 (Jobin Yvon-Spex, Longjumeau, Francia) con excitación polarizada verticalmente y corregida por la sensibilidad de cada canal con excitación polarizada horizontalmente. Las medidas a 4 °C fueron realizadas en atmósfera de nitrógeno seco para evitar que la cubeta se empañase.

Las medidas múltiples de anisotropía de fluorescencia se realizaron en un lector de placas PolarStar (BMG Lab Technologies, Offenburg, Alemania) a diferentes temperaturas. Las muestras fueron excitadas con 200 pulsos de luz polarizada verticalmente (usando un filtro 485P, con un paso de banda de 480-492 nm) y la emisión se analizó simultáneamente con filtros de polarización horizontal y vertical (usando un filtro 520P, con un paso de banda de 515-550 nm). La ganancia de ambos canales se ajustó en base a la anisotropía del flutax-2 libre ($r = 0.055$ y polarización = 0.080, en tampón GAB a 25°C) en pocillos que contenían flutax-2 sin microtúbulos. Los blancos se midieron en pocillos con microtúbulos sin flutax-2 y se restaron de los valores de intensidad de fluorescencia de cada pocillo (normalmente el valor del blanco representó menos del 4% del valor medido).

6.2.2. Determinación de constantes de afinidad de flutax-2 a microtúbulos estabilizados

La unión del flutax-2 (figura 18) a los microtúbulos estabilizados se realizó aprovechando el incremento en la señal de anisotropía de fluorescencia producida por la unión del ligando a los microtúbulos.

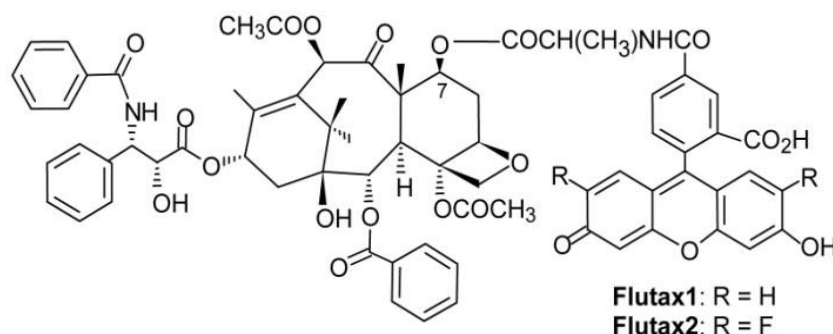


Figura 18. Fórmulas químicas del flutax-1 y flutax-2. Ambos son análogos fluorescentes de taxol usados como sonda del sitio de unión de éste en los microtúbulos (Evangelio y col., 1998).

El flutax-2 (50 nM) se tituló primero con concentraciones crecientes de sitios de unión en microtúbulos estabilizados en el tampón deseado. La fracción de flutax-2 unido viene dada por la ecuación 2

$$\frac{[F]_{unido}}{[F]_{total}} = \frac{r - r_{min}}{r_{max} - r_{min}} \quad (2)$$

donde $[F]_{unido}$ y $[F]_{total}$ son las concentraciones totales y unidas de flutax-2 respectivamente, r es el valor medido de anisotropía, el valor de r_{min} es 0.05 (anisotropía del flutax-2 libre en tampón GAB) y el valor de r_{max} es un parámetro ajustable. Asumiendo una unión con estequiometría 1:1, la concentración de sitios libres viene dada por la ecuación 3

$$[S] = [S]_{total} - [F]_{unido} \quad (3)$$

donde $[S]$ representa la concentración de sitios libres y $[S]_{\text{total}}$ la concentración de sitios totales. Teniendo en cuenta la constante de equilibrio para la reacción de unión (ecuación 4),



donde $[F]$ y $[S]$ representan la concentración de flutax-2 y de sitios de taxol libres, respectivamente y $[FS]$ representa la concentración de flutax-2 unido al sitio de taxol. K_{eq} es la constante de equilibrio de la reacción de unión. Teniendo en cuenta la ecuación de unión de un ligando a un sitio, de la ecuación 3 se deduce fácilmente la ecuación 5

$$r = r_{\min} + (r_{\max} - r_{\min}) \frac{K_{eq}[S]}{1 + K_{eq}[S]} \quad (5)$$

Para calcular los valores de K_{eq} , la ecuación (5) fue iterativamente ajustada a los datos r vs $[S]$, empleando diferentes valores de r_{\max} con SigmaPlot (Jandel Scientific) y escogiendo el mejor ajuste para cada temperatura y/o tampón.

6.2.3. Determinación de las constantes de afinidad de equilibrio de los ligandos a microtúbulos estabilizados

Dado que la unión de los ligandos a los microtúbulos no puede observarse espectroscópicamente con facilidad, las constantes de afinidad de los diferentes ligandos al sitio de unión de taxol en microtúbulos estabilizados se midieron por el desplazamiento del flutax-2. Las isotermas de desplazamiento se midieron al menos cuatro veces en al menos dos placas diferentes para cada ligando, usando un lector de fluorescencia para placas BMG Polastar, como se ha descrito anteriormente. Se emplearon microtúbulos estabilizados que habían sido almacenados en nitrógeno líquido.

Se preparó una mezcla de flutax-2 50 nM y sitios de taxol 50 nM (en microtúbulos estabilizados) en el tampón deseado y se depositaron 200 μL /pocillo en una placa de 96 pocillos evitando los pocillos de los bordes. Se añadieron concentraciones crecientes del ligando competidor (hasta 100 μM , dependiendo de la afinidad y la solubilidad del ligando). Las placas se agitaron orbitalmente durante 10 minutos a 250 rpm y la anisotropía de cada pocillo se midió como se ha descrito anteriormente.

La saturación fraccional del flutax-2 (ligando de referencia) en la presencia del ligando competidor ($v_x = [F]_{\text{unido}}/[S]_{\text{totales}}$) se calculó de la siguiente forma. Dado que la anisotropía es una propiedad aditiva, la anisotropía de una mezcla determinada es la suma de la anisotropía de sus componentes, cuantificada por la fracción molar de éstos. Las anisotropías del flutax-2 en los dos estados de referencia (unido en ausencia de competidor, r_{max} y totalmente desplazado, o libre, r_{min}) son conocidas y la unión del ligando flutax-2 en ausencia de competidor (v_0) se puede calcular a partir de la concentración de flutax-2 inicial, de los sitios de unión y de la constante de afinidad. Los valores de anisotropía medidos pueden ser transformados de esta forma en valores de saturación fraccional mediante la ecuación 6

$$v_x = v_0 \frac{(r - r_{\text{min}})}{(r_{\text{max}} - r_{\text{min}})} \quad (6)$$

y aplicando las ecuaciones 7, 8, 9, 10, 11 y 12

$$K_{eq}(F) = \frac{[SF]}{[S][F]} \quad (7)$$

$$K_{eq}(L) = \frac{[SL]}{[S][L]} \quad (8)$$

$$\frac{K_{eq}(L)}{K_{eq}(F)} = \frac{[SL][F]}{[SF][L]} \quad (9)$$

$$[F] = [F]_{total} - [SF] \quad (10)$$

$$[L] = [L]_{total} - [SL] \quad (11)$$

$$[S] = [S]_{total} - [SL] - [SF] \quad (12)$$

donde [L] representa la concentración del ligando competidor y [SL] representa la concentración de ligando competidor unido al sitio de taxol. $K_{eq}(L)$ y $K_{eq}(F)$ representan las constantes de equilibrio de unión del ligando competidor y del flutax-2, respectivamente. Sustituyendo se llega a la ecuación 13

$$\frac{K_{eq}(L)}{K_{eq}(F)} = \frac{[SL]([F]_{total} - ([S]_{total} - [SL]))}{([S]_{total} - [SL])([L]_{total} - [SL])} \quad (13)$$

Se empleó un programa específicamente desarrollado en nuestro laboratorio (J.F. Díaz, Equigra v5.0, no publicado) para realizar un ajuste por mínimos cuadrados del valor de la constante de equilibrio de unión del ligando competidor $K_{eq}(L)$ a los datos de v_x vs $[L]_{total}$, usando la ecuación 13 a partir de los valores conocidos de $[F]_{total}$, $[S]_{total}$, $[L]_{total}$ y $K_{eq}(F)$.

Una vez que las constantes de equilibrio de unión se midieron a diferentes temperaturas, la energía libre estándar de la unión a una determinada temperatura se puede calcular usando la ecuación 14

$$\Delta G_{app}^0 = -RT \ln K_{eq}(L) \quad (14)$$

y la entalpía y la entropía estándar aparente se calcularon a partir de la representación de Van't Hoff ($\ln K_{eq}(L)$ vs $1/T$) y de la ecuación de Gibbs ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$).

Las constantes de unión de las epotilonas, discodermolida y laulimalida también se midieron por centrifugación. Básicamente, 65 ml de 10 nM de sitios en microtúbulos estabilizados se incubaron durante 30 minutos a 25°C con concentraciones crecientes de ligando. Las muestras se centrifugaron durante 55 minutos a 90000 g. Se separaron los precipitados de los sobrenadantes, éstos se extrajeron dos veces con 50 ml de diclorometano y los precipitados con 20 ml del mismo disolvente. Este procedimiento separa cuantitativamente los ligandos, que entran en la fase orgánica, mientras que la tubulina precipita en la interfase acuoso-orgánica. Tras la evaporación del diclorometano al vacío, se disolvieron los residuos en 30 μ l de metanol 70/30 metanol/agua (v/v). Se procesaron disoluciones control estándar de cada ligando de forma análoga para cada experimento. El posterior análisis por HPLC de las muestras se realizó en una columna C-18 (Supercosil, LC18-DB, 250x4.6 mm) en 70/30 metanol/agua (v/v) con un flujo isocrático de 1 ml/min. La concentración de ligando en los precipitados y sobrenadantes se determinó por integración de los picos eluidos (absorbancia a 220 nm) en comparación con los áreas de los picos producidos por cantidades conocidas de ligando. Normalmente, se usaron concentraciones conocidas de docetaxel como estándar interno.

6.3. Inhibición de la unión de ligandos por ciclostreptina

6.3.1. Inhibición por ciclostreptina de la unión del [³H]-taxol, [³H]-discodermolida y [¹⁴C]-epotilona B a los microtúbulos

El polímero de microtúbulos se ensambló inicialmente durante 30 minutos a 37 °C en una muestra que contenía 2.5 μ M de tubulina, 25 μ M di-deoxi-GTP (ddGTP y 0.75 M glutamato de sodio a pH 6.6 (en estas condiciones alrededor del 90 % de la tubulina está polimerizada (Hamel y col., 1999)).

Para las muestras no pre-incubadas, los compuestos marcados radiactivamente se añadieron a los microtúbulos preformados a las concentraciones indicadas (concentración final de tubulina 2 μM y DMSO 4 %) y se incubaron durante otros 30 minutos a 37 °C.

Para las muestras preincubadas, el inhibidor se añadió a los microtúbulos preformados y esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Tras esta incubación, se añadieron los ligandos marcados radiactivamente y se incubaron de nuevo las muestras durante 30 minutos más a 37 °C.

Todas las muestras (volumen final 250 μL) fueron entonces centrifugadas a 22 °C durante 20 minutos a 18000 g en una centrífuga Eppendorf de sobremesa para precipitar los microtúbulos. Se usaron 100 μL de cada sobrenadante para contar la radiactividad de cada muestra. La cantidad de ligando radiactivo unido se calculó restando el ligando libre en el sobrenadante del ligando total y corrigiendo por la fracción de ligando que no puede ser desplazada por un gran exceso de competidor.

6.3.2. Inhibición por ciclostreptina de la unión del flutax-2 a los microtúbulos

La inhibición de la unión del flutax-2 a los microtúbulos se realizó empleando microtúbulos estabilizados (60 μM) que se incubaron en presencia de DMSO o ciclostreptina (66 μM) durante toda la noche a 25 °C, en tampón GAB-0.1 mM GTP. A la mañana siguiente las muestras se dializaron para eliminar el ligando no unido frente al mismo tampón. Para determinar la unión del flutax-2 a estos microtúbulos, 50 nM flutax-2 se tituló con concentraciones crecientes de microtúbulos pre-incubados con DMSO o ciclostreptina, como se ha descrito anteriormente.

6.3.3. Cinética de disociación de flutax-2 inducida por ciclostreptina

Los experimentos de cinética de disociación de flutax-2 inducida por ciclostreptina se realizaron mezclando, a tiempo cero, disoluciones 250 nM de microtúbulos estabilizados y 200 nM de flutax-2, con diferentes concentraciones

de ciclostreptina o docetaxel (como control). El desplazamiento del flutax-2 se midió por anisotropía de fluorescencia a lo largo del tiempo, en un espectrofluorímetro con formato T Fluorolog-3-221 (Jobin Yvon-Spex, Longjumeau, Francia). El tiempo muerto de las medidas fue aproximadamente de 5 segundos. Los datos cinéticos se analizaron utilizando KINSIM40 y FITSIM40 (Dang y Frieden, 1997).

6.3.4. Actividad biológica de la ciclostreptina epoxidada

También se comprobó la capacidad de un derivado epoxidado de ciclostreptina para inhibir la unión del flutax-2 a los microtúbulos y para desplazar al flutax-2 de su sitio en los microtúbulos. Este derivado se preparó disolviendo ciclostreptina a concentraciones elevadas en DMSO no degasificado, ya que se ha descrito que la ciclostreptina se epoxida fácilmente en estas condiciones (Yoshimura y col., 2000). La pureza e identidad de este derivado se determinó por espectrometría de masas de la misma manera que la ciclostreptina.

Resultados

1. Mecanismos moleculares de estabilización de microtúbulos inducida por ligando

Con objeto de clasificar y comparar la actividad de la mayoría de los ligandos descritos en la bibliografía como estabilizadores de microtúbulos (ver apartado 1.1 de Materiales y Métodos y figura 20), se estudiaron comparativamente las siguientes actividades:

1. Efectos en las células
 - Capacidad para inducir haces de microtúbulos
 - Acumulación de células en fase G₂+M del ciclo celular
 - Determinación de la citotoxicidad
2. Efectos sobre el ensamblaje de tubulina
 - Inducción del ensamblaje de tubulina pura
 - Modulación del ensamblaje de:
 - a. tubulina pura
 - b. proteína microtubular
 - Estabilización de microtúbulos frente al frío
3. Unión de los ligandos a los microtúbulos
 - Unión de los ligandos al sitio de taxol
 - Unión de los ligandos al sitio de laulimalida

De forma esquemática, se puede resumir el proceso que se ha seguido en este trabajo, para obtener una clasificación de los ligandos, en el esquema que se representa en la figura 19.



Figura 19. Esquema del proceso empleado en este trabajo para la clasificación de los ligandos descritos como estabilizadores de microtúbulos.

1.1. Efectos de los ligandos en células

Los experimentos destinados a estudiar comparativamente el efecto en células de los diferentes ligandos, se realizaron en el laboratorio de la Dra. Isabel Barasoain, en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid.

1.1.1. Efectos de los ligandos sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear

En primer lugar, se estudió comparativamente el efecto de los ligandos (figura 20) sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos, la morfología nuclear y el ciclo de células tumorales. Para ello, se usaron células humanas de carcinoma de pulmón A549 incubadas durante 24 horas con varias concentraciones de cada ligando.

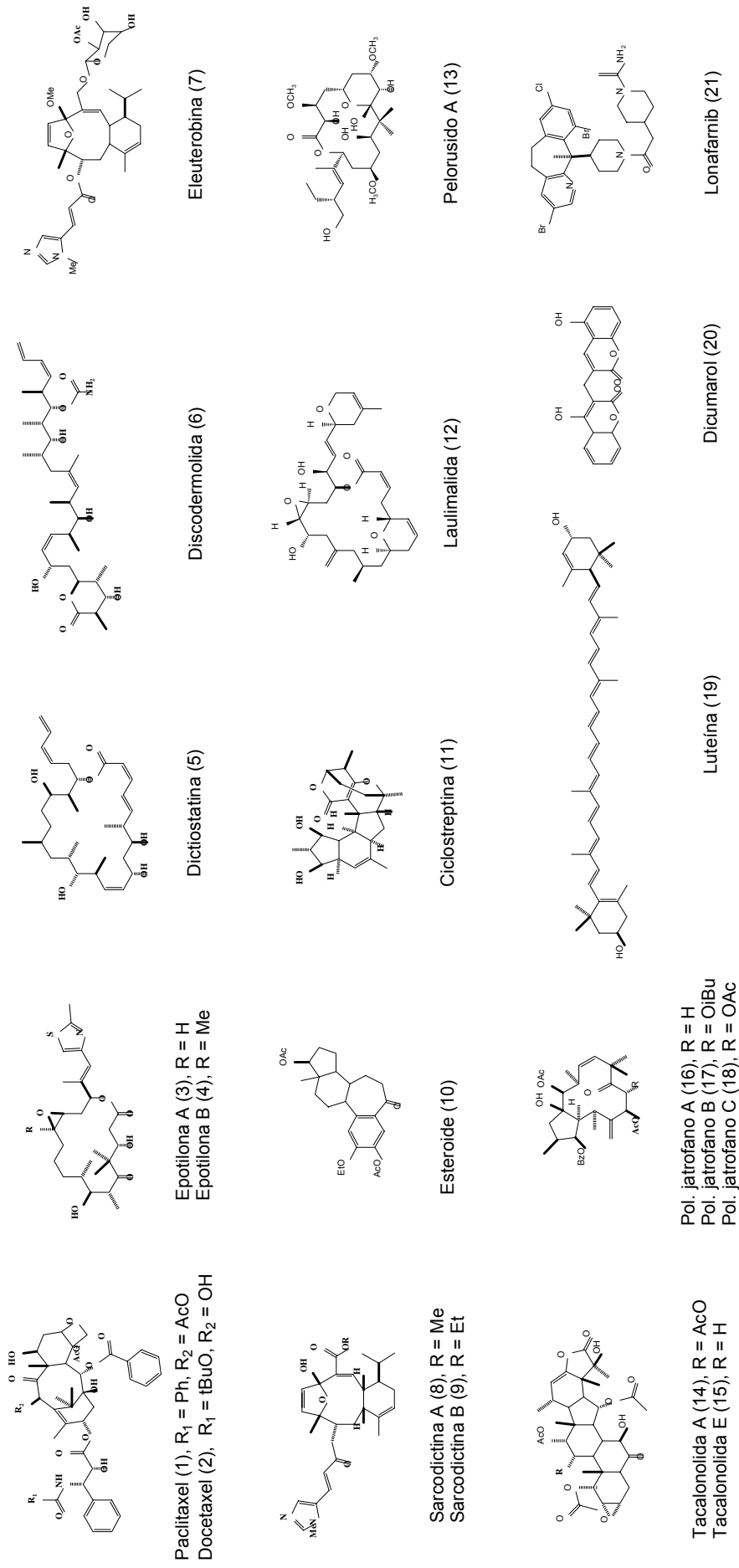


Figura 20. Fórmulas químicas de los compuestos descritos en la bibliografía como estabilizadores de microtúbulos, que se han utilizado en este trabajo.

Las inmunofluorescencias indirectas de la figura 21 muestran los efectos de los ligandos en los microtúbulos de la interfase en células control (panel A) en comparación con células tratadas con 100 nM de taxol (panel B), epotilona B (panel C), dictiostatina (panel D) y discodermolida (panel E) ó 500 nM de eleuterobina (panel F), ciclostreptina (panel H) y laulimalida (panel I). A esas concentraciones, estos ligandos (al igual que docetaxel, epotilona A y pelorusido A, no mostrados) indujeron la aparición de haces anormales de microtúbulos. La discodermolida y la dictiostatina fueron especialmente potentes en la inducción de estos haces. A su vez, también se observaron un gran número de células micronucleadas y husos mitóticos multipolares.

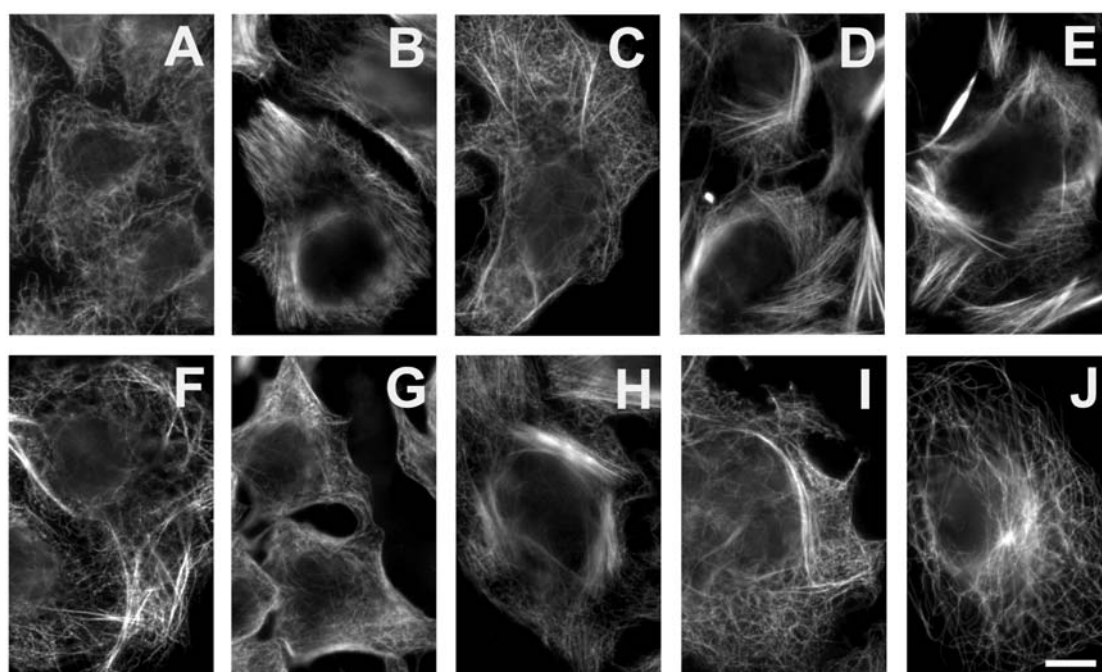


Figura 21. Efectos de los ligandos sobre los microtúbulos de la interfase en células A549. Las células A549 se incubaron durante 24 horas en presencia de DMSO (A) o 100 nM taxol (B), 100 nM epotilona B (C), 100 nM dictiostatina (D), 100 nM discodermolida (E), 500 nM eleuterobina (F), 1 μ M sarcodictina A (G), 500 nM ciclostreptina (H), 500 nM laulimalida (I) y 20 μ M lonafarnib (J). La barra blanca del panel J representa 10 μ m.

Por el contrario, en las preparaciones con sarcodictinas, se observaron pocos haces de microtúbulos, pocos micronúcleos y no se detectaron husos mitóticos multipolares. De forma similar, el esteroide no provocó efectos destacables en los microtúbulos de la interfase y no se observaron células micronucleadas ni husos multipolares. Las tacalonolidas A y E mostraron efectos

característicos del taxol, aunque en un rango de concentraciones 2-3 órdenes de magnitud mayores que las del taxol. El lonafarnib también mostró un efecto muy débil a elevadas concentraciones (panel J).

Por el contrario, en las células incubadas con luteína, dicumarol y los tres poliésteres de jatrofano estudiados, no se observaron haces de microtúbulos, ni células micronucleadas, ni tampoco husos mitóticos multipolares, siendo las preparaciones muy similares a las de las células control, incluso a concentraciones de ligando en el rango de μM .

1.1.2. Efectos de los ligandos sobre el ciclo celular

Los experimentos destinados al estudio comparativo de los efectos de los ligandos sobre el ciclo celular, se realizó determinando el contenido de ADN, por citometría de flujo, de células de leucemia monocítica (U937), incubadas durante 20 horas en presencia de los ligandos. Al igual que el taxol y el docetaxel, las epotilonas, la dictiostatina, la discodermolida, la eleuterobina, las sarcodictinas, la ciclostreptina, el pelorusido A y la laulimalida, bloquearon a las células en la fase $G2+M$ del ciclo celular, como indica el elevado número de células con contenido tetraploide de ADN, que se detectaron por citometría de flujo (figura 22). La concentración más pequeña de ligando que generó la máxima acumulación de células en la fase $G2+M$ del ciclo celular se muestra en la tabla 1. Por el contrario, se detectaron pocas células acumuladas en $G2+M$ en las preparaciones del esteroide, lonafarnib, luteína, dicumarol y en las de los poliésteres de jatrofano, en las condiciones ensayadas (concentraciones de ligandos en el rango de micromolar). No obstante, en todos los casos se observó un aumento del número de células hipodiploides. Presumiblemente, éstas células están sufriendo procesos apoptóticos (figura 22).

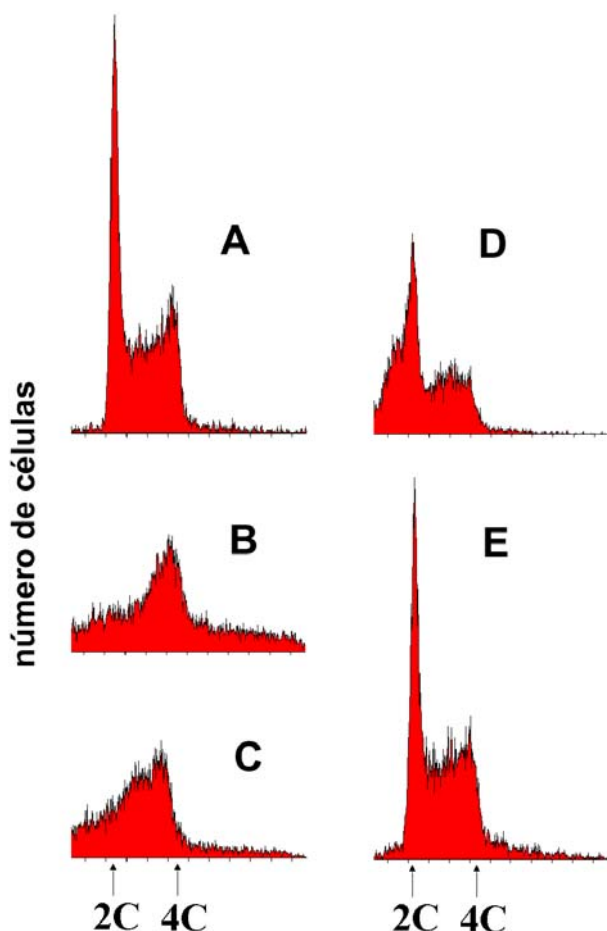


Figura 22. Efectos de los ligandos sobre el ciclo en células U937. Se muestra el contenido de ADN de las células, determinado por citometría de flujo de células U937 incubadas con los ligandos. Las flechas indican las posiciones modales de las células que tienen un contenido de ADN diploide (2C) y tetraploide (4C). Tras la incubación con los ligandos, las células se fijaron y su ADN se tiñó con yoduro de propidio. A: control (DMSO), B: docetaxel 2.5 nM, C: dictiostatina 7.5 nM, D: esteroide 40 μ M, E: poliéster de jatrofano B 40 μ M.

1.1.3. Citotoxicidad de los ligandos

Las citotoxicidades de los ligandos se midieron en dos tipos celulares diferentes (tabla 2), 1A9 (células humanas de carcinoma de ovario) y A549 (células humanas de carcinoma de pulmón). El ligando más citotóxico, en células 1A9, es el docetaxel (IC_{50} 0.4 ± 0.2 nM), que tiene una citotoxicidad similar a la del taxol (IC_{50} 1.0 ± 0.4 nM) y a la de la epotilona B (IC_{50} 1.2 ± 0.3 nM). La dictiostatina (IC_{50} 3.6 ± 1 nM), la epotilona A (IC_{50} 4.1 ± 1 nM) y la laulimalida (IC_{50} 3.4 ± 1 nM) tienen citotoxicidades muy similares entre sí y algo más altas que los compuestos anteriores, mientras que la sarcodictina B (IC_{50} 103 ± 18 nM), el análogo esteroide (IC_{50} 43000 ± 3000 nM), la ciclostreptina (112 ± 22 nM) y las tacalonolidas A y E (IC_{50} 370 ± 30 y $3000 \pm$

400 nM, respectivamente) tienen citotoxicidades ente dos y tres órdenes de magnitud mayores que el taxol (tabla 2).

Ligando	IC ₅₀ células 1A9 (nM)	IC ₅₀ células A549 (nM)	Acumulación G2+M células U937 (nM)
Taxol (1)	1 ± 0.4	1.4 ± 0.2	5
Docetaxel (2)	0.4 ± 0.2	3 ± 0.3	2.5
Epotilona A (3)	4.1 ± 1	7.5 ± 1.4	25
Epotilona B (4)	1.2 ± 0.3	0.8 ± 0.1	5
Dictiostatina (5)	3.6 ± 1	5.6 ± 1	5
Discodermolida (6)	17.6 ± 2.7	6.35 ± 0.8	25
Eleuterobina (7)	13.2 ± 7	3.3 ± 0.2	25
Sarcodictina A (8)	32 ± 21	36 ± 12	500
Sarcodictina B (9)	103 ± 18	50 ± 15	500
Esteroides (10)	43000 ± 3000	> 20000	ND
Ciclostreptina (11)	112 ± 22	140 ± 20	250
Laulimalida (12)	3.4 ± 1	ND	25
Pelorusido A (13)	8 ± 1	n. d.	n. d.
Tacalonolida A (14)	370 ± 30	ND	500
Tacalonolida E (15)	3000 ± 400	ND	5000

Tabla 2. Citotoxicidad de los ligandos y efectos sobre el ciclo celular. Citotoxicidad de los ligandos en células humanas de carcinoma de ovario 1A9 y células humanas de carcinoma de pulmón A549. Los datos (± errores estándar) representan la media de al menos cuatro medidas diferentes. La columna de la derecha muestra la concentración más pequeña de ligando que generó la máxima acumulación de células U937 en la fase G2+M del ciclo celular. Las citotoxicidades y el efecto sobre el ciclo celular de los compuestos 16-21 son tan débiles que no se pudieron determinar con precisión.

1.2. Efectos de los ligandos en el ensamblaje de tubulina

1.2.1. Ensamblaje de tubulina inducido por ligando

Dado que la principal característica de estos ligandos es que son capaces de estabilizar microtúbulos, una prueba necesaria de su actividad es comprobar si son capaces de inducir el ensamblaje de microtúbulos en sistemas de tubulina GTP, o tubulina GDP, pura. El ensamblaje de tubulina se puede considerar como una polimerización no covalente por condensación nucleada y está caracterizado por un comportamiento cooperativo y por la presencia de una concentración crítica, por debajo de la cual no existe formación significativa de polímeros (Oosawa y

Asakura, 1975). Por tanto, la medida de la concentración crítica del ensamblaje de tubulina inducido por un determinado ligando permite cuantificar la potencia de inducción del ensamblaje, en unas determinadas condiciones, permitiendo la comparación entre múltiples ligandos. En las condiciones usadas para realizar estos experimentos (tampón PEDTA4-1mM GTP o PEDTA4-1mM GDP), la tubulina es incapaz de ensamblar, en ausencia de ligandos inductores, a concentraciones menores de 200 μM de tubulina GTP (Díaz y Andreu, 1993).

El ligando que induce el ensamblaje de tubulina de forma más potente es la dictiostatina, con un concentración crítica de tubulina (C_r) de $0.66 \pm 0.06 \mu\text{M}$, para tubulina GTP y de $2.40 \pm 0.20 \mu\text{M}$ para tubulina GDP (tabla 3), que es aproximadamente cinco veces más potente que el taxol (C_r $4.23 \pm 0.22 \mu\text{M}$ para tubulina GTP y $10.29 \pm 0.69 \mu\text{M}$ para tubulina GDP). La laulimalida y el pelorusido A indujeron el ensamblaje de tubulina de forma más débil que el taxol (C_r laulimalida $10.33 \pm 0.22 \mu\text{M}$ para tubulina GTP y C_r pelorusido A $12.00 \pm 1.3 \mu\text{M}$ para tubulina GTP).

Las sarcodictinas A y B, la ciclostreptina y el esteroide indujeron muy débilmente el ensamblaje a altas concentraciones de tubulina GTP (se comprobó por microscopía electrónica que los polímeros formados eran microtúbulos), pero sus concentraciones críticas no pudieron ser determinadas con precisión ya que se requerirían concentraciones mucho más altas de proteína y de ligando. Además, estos ligandos no fueron capaces de inducir el ensamblaje de tubulina GDP (tabla 3).

Las tacalonolidas A y E, los poliésteres de jatrofano A, B y C, la luteína, el lonafarnib y el dicumarol no fueron capaces de inducir el ensamblaje de tubulina GTP (máxima concentración ensayada: 60 μM de tubulina GTP, con un 10% de exceso de ligando con respecto a la concentración de proteína), como se comprobó por experimentos de centrifugación y de microscopía electrónica.

Ligando	Cr (tub GTP) μM	Cr (tub GDP) μM
Taxol (1)	4.23 \pm 0.2	10.29 \pm 0.7
Docetaxel (2)	1.52 \pm 0.51	5.92 \pm 1.0
Epotilona A (3)	5.11 \pm 0.5	8.98 \pm 0.4
Epotilona B (4)	1.17 \pm 0.16	5.60 \pm 0.1
Dictiostatina (5)	0.66 \pm 0.1	2.40 \pm 0.2
Discodermolida (6)	0.92 \pm 0.04	3.81 \pm 0.9
Eleuterobina (7)	6.50 \pm 0.1	12.8 \pm 1.0
Sarcodictina A (8)	> 60 ^a	Inactivo
Sarcodictina B (9)	> 60 ^a	Inactivo
Esteroides (10)	> 60 ^a	Inactivo
Ciclostreptina (11)	> 60 ^a	Inactivo
Laulimalida (12)	10.33 \pm 1.75	n. d.
Pelorusido A (13)	12.0 \pm 1.3	n. d.

Tabla 3. Concentraciones críticas de las reacciones de ensamblaje de tubulina GTP o tubulina GDP. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 minutos en tampón PEDTA4-1mM GTP o PEDTA4-1mM GDP en presencia de un 10% exceso de ligando con respecto a la concentración de proteína. ^aAunque se observaron microtúbulos en estas muestras por microscopía electrónica (figura 23), se requieren concentraciones mucho mayores de proteína y de ligando, para la determinación precisa de la concentración crítica. Se muestran los datos \pm errores estándar. N. d: medida no determinada.

Para comprobar, el efecto de los iones Mg^{2+} en la polimerización inducida por los ligandos 1-13, se incubaron muestras de tubulina GTP, en tampón PEDTA-1mM GTP, en presencia de estos ligandos. Los microtúbulos formados se sedimentaron por centrifugación y se determinó la concentración de proteína polimerizada y sin polimerizar. No se observó polimerización en ausencia de Mg^{2+} , indicando que el ensamblaje inducido por estos ligandos es dependiente de Mg^{2+} , como lo es para el taxol y el docetaxel, que requieren concentraciones de Mg^{2+} en el rango de milimolar para inducir el ensamblaje (Díaz y Andreu, 1993). No obstante, se observó un débil ensamblaje con discodermolida a concentraciones mucho menores de Mg^{2+} (en el rango de nM) y a concentraciones de tubulina altas (no mostrado).

1.2.2. Estructura de los microtúbulos inducidos por ligando

Los polímeros inducidos por los diferentes ligandos se examinaron mediante microscopía electrónica y se observó que su morfología correspondía a la de microtúbulos normales, incluso para los ligandos más débiles (figura 23).

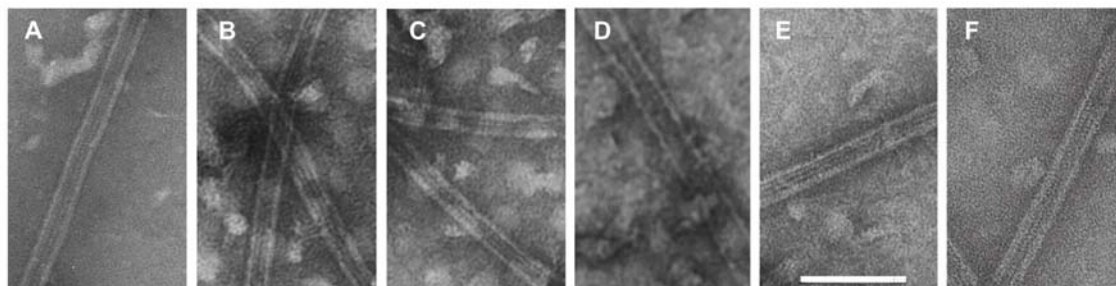


Figura 23. Micrografías electrónicas de microtúbulos inducidos por ligando. A: taxol, B: sarcodictina C: sarcodictina B, D: esteroide, E: ciclostreptina y F: pelorusido A. La morfología de los microtúbulos inducidos por el resto de los ligandos tenía un aspecto similar. Las muestras (tubulina 30 μM) se incubaron con un 10% de exceso de ligando durante 30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. 20 μL de éstas se adsorbieron sobre rejillas de cobre cubiertas de *formvar* y posteriormente se tiñeron con acetato de uranilo 1%. La barra blanca del panel E representa 100 nm.

El radio y el número de protofilamentos de los microtúbulos inducidos por ligando, se determinaron mediante dispersión de rayos-X a bajo ángulo (figura 24; ver Materiales y Métodos).

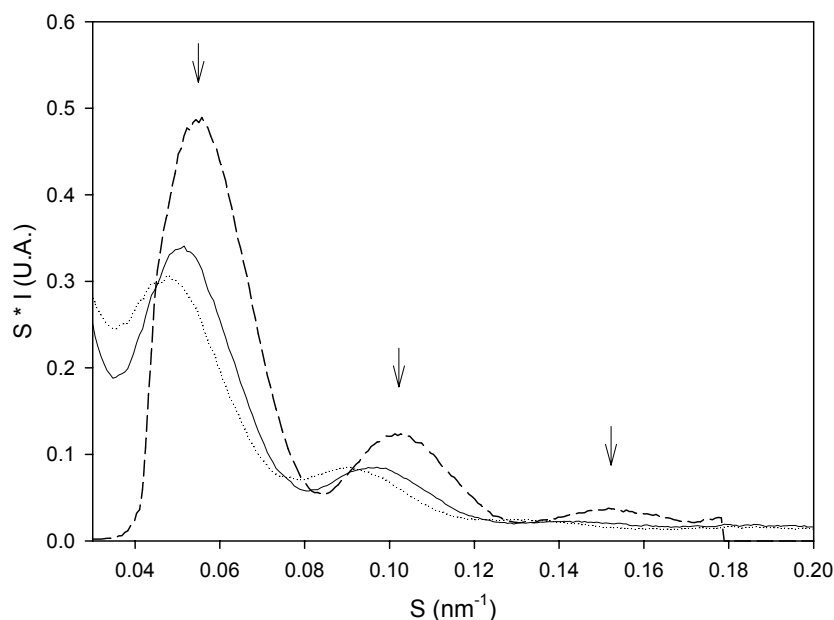


Figura 24. Perfiles de dispersión de rayos-X a bajo ángulo de los microtúbulos inducidos por ligando. Línea continua: taxol; línea discontinua: docetaxel y línea punteada: pelorusido A. Estos perfiles se generaron multiplicando las intensidades de la función de dispersión por su correspondiente eje S , para facilitar la determinación de las posiciones de los máximos. Las flechas indican los tres primeros máximos de la función de Bessel, J_{01} , J_{02} y J_{03} .

Dado que se necesitan cantidades relativamente grandes de ligando para poder usar esta técnica, sólo se pudieron estudiar los microtúbulos inducidos por taxol, docetaxel, epotilona B, dictiostatina, discodermolida, pelorusido A y flutax-2. En la figura 24 se muestran los perfiles de dispersión de rayos-X (multiplicados por el eje S, para facilitar la determinación de las posiciones de los máximos de la función de dispersión) de los microtúbulos inducidos por algunos de los ligandos.

En la tabla 4 se presentan las posiciones de estos máximos, el radio medio y el número de protofilamentos de los microtúbulos inducidos por estos ligandos.

Ligando	J_{01}	J_{02}	J_{03}	Radio (nm)	Nº Protof.
Taxol	0.0521	0.0983	0.142	11.51	12.72
Docetaxel	0.0490	0.0897	0.129	12.45	13.65
Epotilona B	0.0485	0.0903	0.133	12.36	13.59
Dictiostatina	0.0515	0.0946	0.141	11.73	13.12
Discodermolida	0.0515	0.0923	0.135	11.98	13.37
Pelorusido A	0.0540	0.101	0.150	11.04	12.42
Flutax-2	0.0441	0.0837	0.0122	13.28	14.31

Tabla 4. Posiciones de los máximos de la función de dispersión de rayos-X en disolución de los microtúbulos inducidos por ligando. Los radios helicoidales de los microtúbulos (expresados en nm) y el número de protofilamentos se calcularon por interpolación, usando los resultados previamente descritos (Andreu y col., 1992; Andreu y col., 1994; Díaz y col., 1994). Debido a las limitaciones de ligando disponible, no se pudieron medir el resto de compuestos.

El radio medio de los microtúbulos inducidos por taxol y docetaxel es de 11.51 y 12.41 nm, respectivamente. La dictiostatina y la discodermolida indujeron mayoritariamente microtúbulos de 13 protofilamentos, mientras que la epotilona B y el flutax-2 indujeron microtúbulos de mayor diámetro con 14 protofilamentos. El pelorusido A indujo microtúbulos de 12 protofilamentos, en concordancia con lo que se ha estimado a partir de experimentos de microscopía electrónica (Gaitanos y col., 2004).

1.2.3. Efecto sinérgico del taxol/laulimalida y taxol/pelorusido A en la inducción del ensamblaje de tubulina

Dado que laulimalida y pelorusido A se unen a un mismo sitio en los microtúbulos (apartado 1.3.5 de Resultados), se comprobó también si, al igual que se ha descrito previamente para la laulimalida y el taxol (Gapud y col., 2004), existe sinergia entre el taxol y el pelorusido A en la inducción del ensamblaje de tubulina. Para ello, se escogieron condiciones en las que el ensamblaje de tubulina está muy débilmente inducido en presencia de ligando (tubulina GDP en tampón PEDTA4-1mM GDP). Como se observa en la figura 25, existe un claro comportamiento sinérgico en la inducción del ensamblaje entre laulimalida y taxol, y pelorusido A y taxol, (muestras 4 y 5, respectivamente), pero no entre pelorusido A y laulimalida (muestra 6).

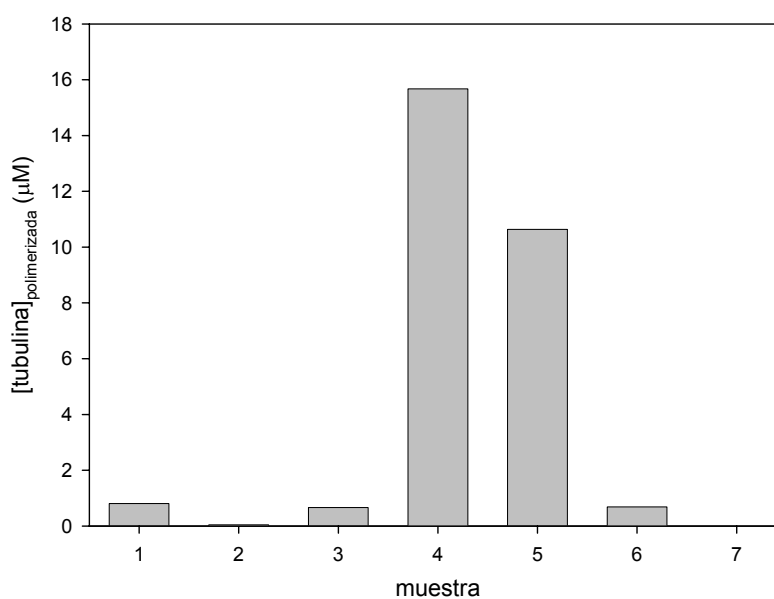


Figura 25. Sinergia en el ensamblaje de tubulina inducido por taxol y pelorusido A. Las muestras (15 μM tubulina GDP y 10% de exceso de cada ligando, respecto de la concentración de tubulina) se incubaron a 37° C durante 15 minutos, en tampón PEDTA4-1mM GDP y se midió la cantidad de tubulina polimerizada en estas condiciones. 1. Laulimalida. 2. Pelorusido A. 3. Taxol. 4. Taxol + laulimalida. 5. Taxol + pelorusido A. 6. Pelorusido A + laulimalida. 7. DMSO (control).

1.2.4. Modulación del ensamblaje de tubulina pura por los ligandos

Si un compuesto es capaz de estabilizar microtúbulos, significa que debe estar de alguna forma modulando el ensamblaje de tubulina. No obstante, si un ligando es muy débil, puede que no sea capaz de inducir el ensamblaje de tubulina, pero sí de

modular éste en unas condiciones en las que la tubulina por sí sola, en ausencia de ligandos, sea capaz de polimerizar. Para comprobar esto, se determinaron las concentraciones críticas del ensamblaje en tampón GAB-1mM GTP. En este tampón, la tubulina es capaz de ensamblar en ausencia de ligandos exógenos, con una concentración crítica de $3.3 \pm 0.02 \mu\text{M}$ (a 37°C). En la figura 26 se representa la concentración crítica de proteína necesaria para producir polímeros en presencia de los diferentes compuestos. Como se puede observar, los compuestos 1-13 son capaces de favorecer el ensamblaje de tubulina pura, mientras que los compuestos 14-21 no son capaces de provocar una disminución de la concentración crítica del ensamblaje en estas condiciones. Luteína y lonafarnib (compuestos 16 y 21, respectivamente) actuaron como despolimerizadores débiles.

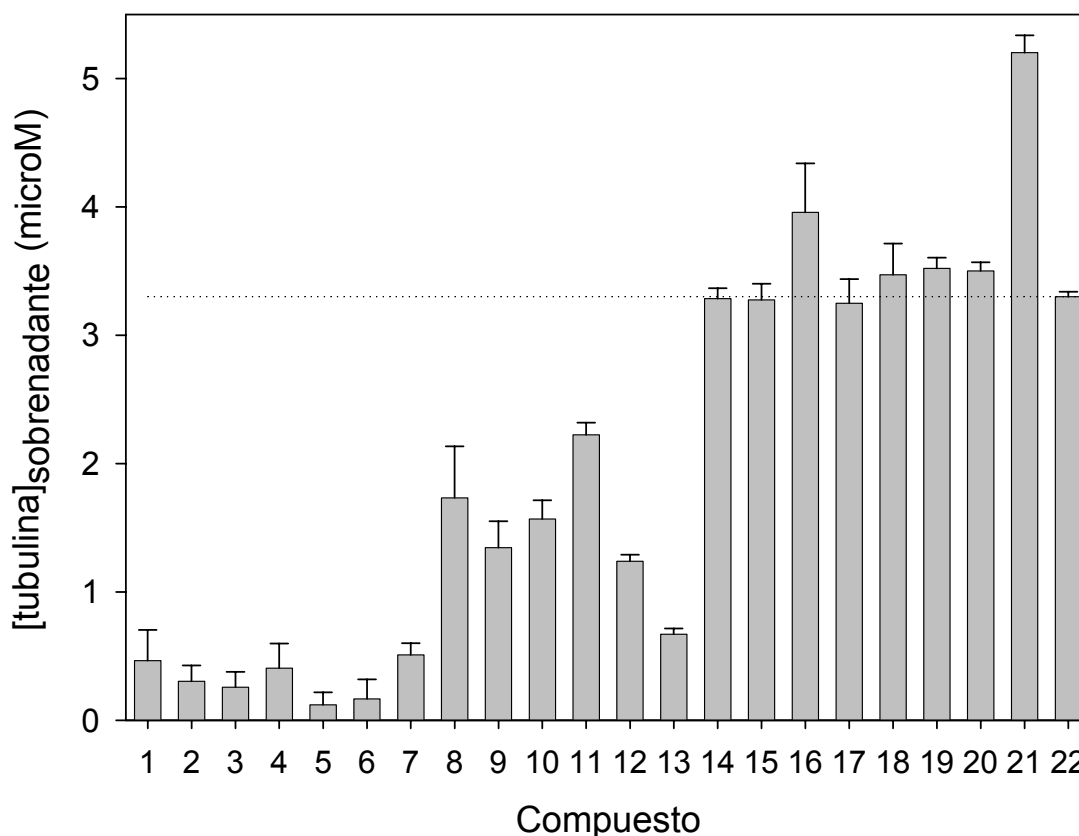


Figura 26. Efectos de los ligandos sobre el ensamblaje de tubulina inducido por glicerol. Concentraciones críticas (con errores estándar) del ensamblaje de tubulina GTP ($20 \mu\text{M}$) en tampón GAB-1mM GTP, en presencia de un 10% de exceso de ligando con respecto a la concentración de proteína. El control (DMSO) se muestra como el compuesto número 22. Ligandos: taxol (1), docetaxel (2), epotilona A (3), epotilona B (4), dictiostatina (5), discodermolida (6), eleuterobina (7), sarcodictina A (8), sarcodictina B (9), esteroide (10), ciclostreptina (11), laulimalida (12), pelorusido A (13), tacalonolida A (14), tacalonolida E (15), luteína (16), dicumarol (17), poliéster de jatrofano A (18), poliéster de jatrofano B (19), poliéster de jatrofano C (20), lonafarnib (21).

1.2.5. Modulación del ensamblaje de proteína microtubular por ligando

Adicionalmente, se comprobó si los ligandos que no eran capaces de inducir el ensamblaje de microtúbulos en tampón PEDTA4-1mM GTP, ni de favorecer la polimerización de tubulina pura en tampón GAB-1mM GTP, eran capaces de modular la polimerización de proteína microtubular (tubulina en presencia de MAPs). Para ello, se polimerizó proteína microtubular (1 mg/mL) en presencia de los ligandos, en tampón AB-1mM GTP. En estas condiciones, la proteína microtubular es capaz de ensamblar en ausencia de ligandos exógenos, con una concentración crítica de 0.34 ± 0.03 mg/mL (37 °C). De nuevo, no se observó una disminución de la concentración crítica del ensamblaje en presencia de los ligandos 14-21 y el lonafarnib se comportó como un despolimerizador débil (tabla 5).

Ligando	Cr (mg/mL)
Taxol	0.11 ± 0.003
Tacalonolida A	0.35 ± 0.008
Tacalonolida E	0.36 ± 0.01
Luteína	0.36 ± 0.03
Dicumarol	0.36 ± 0.008
Poliéster de jatrofano A	0.36 ± 0.03
Poliéster de jatrofano B	0.37 ± 0.04
Poliéster de jatrofano C	0.35 ± 0.06
Lonafarnib	0.45 ± 0.03
DMSO	0.34 ± 0.03

Tabla 5. Concentraciones críticas de las reacciones de ensamblaje de proteína microtubular en presencia de ligando. Las muestras de proteína microtubular (1mg/mL) se incubaron a 37 °C durante 30 minutos en tampón AB-1mM GTP, en presencia de un 10% exceso de ligando con respecto a la concentración de proteína. La concentración de proteína no polimerizada (concentración crítica) se determinó tal y como se describe en Materiales y Métodos. Se muestran los datos \pm errores estándar.

1.2.6. Estabilización de los microtúbulos frente al frío por ligando

Dado que el proceso de formación de microtúbulos es endotérmico, la inducción del ensamblaje *in vitro* se realiza normalmente elevando la temperatura de la muestra a 37°C (Lee y Timasheff, 1975). Cuando la temperatura desciende a temperaturas

bajas (4°C), los microtúbulos despolimerizan. Tal y como indica su nombre, un ligando estabilizador de microtúbulos debería tener tal efecto sobre la despolimerización de éstos inducida por frío. Para comprobar si los ligandos descritos como estabilizadores de microtúbulos, son capaces de producir este efecto, se polimerizaron muestras de tubulina GTP en presencia de los ligandos en tampón GAB-1mM GTP durante 30 minutos, y, una vez polimerizadas, las muestras se incubaron a 4 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugaron para sedimentar los polímeros formados y la concentración de tubulina polimerizada se determinó fluorimétricamente (figura 27).

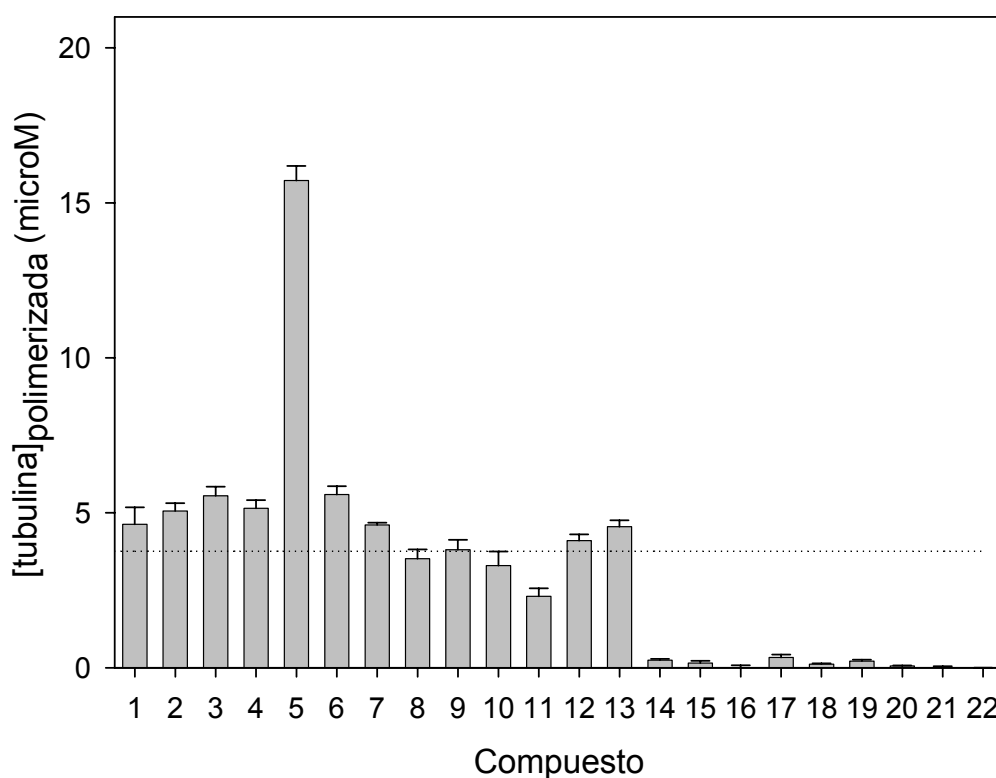


Figura 27. Estabilización de los microtúbulos frente al frío. Concentración de proteína polimerizada tras incubar las muestras, previamente polimerizadas en presencia de los ligandos, a 4 °C durante 10 minutos. La concentración inicial de tubulina GTP fue de 20 μ M y se incubó con un 10% de exceso de ligando, en tampón GAB-1mM GTP. Ligandos: taxol (1), docetaxel (2), epotilona A (3), epotilona B (4), dictiostatina (5), discodermolida (6), eleuterobina (7), sarcodictina A (8), sarcodictina B (9), esteroide (10), ciclostreptina (11), laulimalida (12), pelorusido A (13), tacalonolida A (14), tacalonolida E (15), luteína (16), dicumarol (17), poliéster de jatrofano A (18), poliéster de jatrofano B (19), poliéster de jatrofano C (20), lonafarnib (21) y DMSO (22). Se muestran los datos \pm errores estándar.

En la figura 27, se representa la concentración de proteína polimerizada en cada muestra. Se observa cómo prácticamente todos los microtúbulos han

desaparecido en la muestra control (DMSO, compuesto número 22), indicando que el frío ha inducido la despolimerización de éstos. No obstante, se observa una cantidad apreciable de tubulina polimerizada en las muestras incubadas con los ligandos 1-13, ya que estos compuestos están estabilizando los microtúbulos frente al frío. Por el contrario, la cantidad de proteína polimerizada en las muestras incubadas con los compuestos 14-21 es muy similar a la del control, indicando que estos compuestos no son estabilizadores de microtúbulos *in vitro* (figura 27).

1.3. Unión de los ligandos a los microtúbulos

1.3.1. Unión de los ligandos del sitio de taxol a los microtúbulos

Como prueba directa de la interacción de los ligandos del sitio de taxol con los microtúbulos, se comprobó la unión directa de los ligandos a éstos. Para ello, se incubaron microtúbulos estabilizados con los ligandos y, tras centrifugar para sedimentar los microtúbulos, se extrajeron los precipitados de microtúbulo-ligando y los sobrenadantes de ligando no unido, con diclorometano. Este procedimiento separa los ligandos (que pasan a la fase orgánica debido a su elevada hidrofobicidad) de la proteína, que se queda en la interfase. Esta fase orgánica, conteniendo el ligando, se analizó por HPLC (detección por absorbancia UV a 220 nm). Para cada experimento, se realizaron los controles necesarios para comprobar la unión de éstos a microtúbulos nativos, no estabilizados. En la figura 28 se muestran los cromatogramas de las fases orgánicas extraídas, para algunos de los ligandos. En todos los cromatogramas, se puede observar un pico correspondiente al ligando unido a los microtúbulos, sedimentados tras la centrifugación, y ningún pico en el sobrenadante, indicando que prácticamente todo el ligando se encuentra unido a los microtúbulos en esas condiciones, con la excepción del esteroide, que a estas concentraciones (30 μM) no es capaz de saturar todos los sitios de taxol.

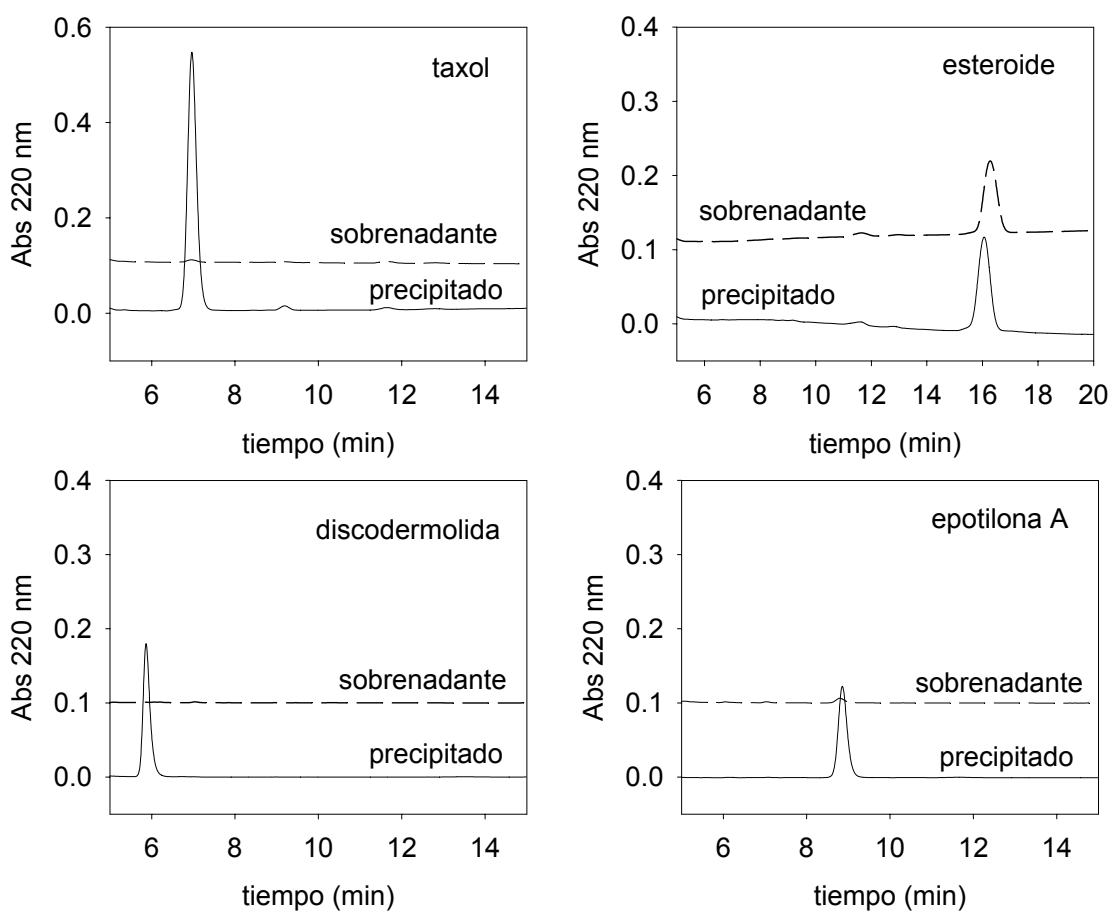


Figura 28. Unión de los ligandos del sitio de taxol a los microtúbulos. Cromatogramas de precipitados de microtúbulos y sobrenadantes, mostrando la unión de los ligandos a microtúbulos estabilizados. 30 μM de sitios de taxol se incubaron con cantidades equimoleculares de ligando. Los polímeros se sedimentaron mediante centrifugación y el ligando libre (en el sobrenadante) y unido (en el precipitado) se extrajo con diclorometano y se analizó por HPLC. Cada cromatograma contiene cantidades equivalentes de extracto. Los cromatogramas de los sobrenadantes han sido desplazados 0.1 unidades de absorbancia para mayor claridad.

1.3.2. Unión irreversible de la ciclostreptina a los microtúbulos

Sorprendentemente, no fue posible detectar ciclostreptina en los cromatogramas de los precipitados de microtúbulos (figura 29A), aunque sí se observó la desaparición del ligando de los sobrenadantes (figura 29B). Esto sugiere una unión irreversible del ligando a los microtúbulos (el ligando es eliminado junto con la proteína durante la extracción con diclorometano y no se detecta en los extractos de microtúbulos). También existe la posibilidad de que la ciclostreptina sufra alguna modificación que la haga indetectable, tras la interacción con los microtúbulos.

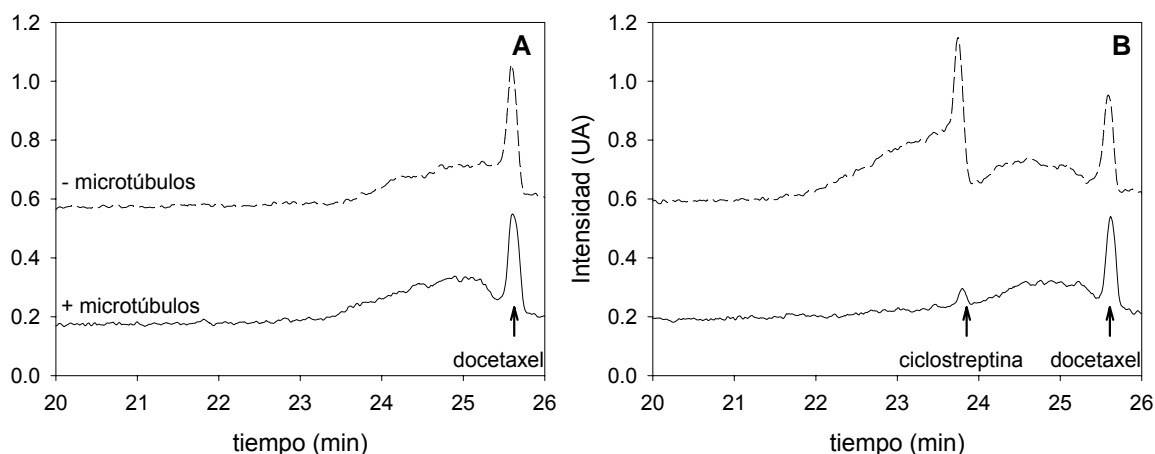


Figura 29. Unión irreversible de la ciclosporina a los microtúbulos. Análisis por LC-MS del contenido en ciclosporina de los precipitados de microtúbulos y los sobrenadantes, tras centrifugar las muestras. Muestras que contenían 30 μM de ciclosporina se incubaron en tampón GAB-1mM GTP a 37 $^{\circ}\text{C}$ con (líneas continuas) y sin (líneas discontinuas) 30 μM de sitios de taxol en microtúbulos estabilizados. Las muestras se centrifugaron para sedimentar los microtúbulos, y los precipitados y sobrenadantes se extrajeron con diclorometano. El contenido en ciclosporina de los precipitados (panel A) y de los sobrenadantes (panel B) se analizó por LC-MS, tal y como se describe en Materiales y Métodos. El docetaxel se usó como estándar interno. Para mayor claridad, los cromatogramas de las muestras sin microtúbulos han sido desplazados 0.4 unidades de intensidad.

En esta ocasión, el ligando se analizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), debido a la baja absorbancia que presenta este ligando en el UV. Se realizaron todos los controles necesarios para comprobar la solubilidad del ligando en las condiciones ensayadas (20 y 30 μM ligando), así como la unión a microtúbulos nativos, no estabilizados.

1.3.3. Unión de los ligandos al sitio de taxol

Una vez demostrada la unión de los ligandos a los microtúbulos, se comprobó si los ligandos interaccionan con éstos a través del sitio de taxol. Para ello, se realizaron experimentos de desplazamiento de un análogo fluorescente de taxol, flutax-2, de su sitio en microtúbulos estabilizados (Andreu y Barasoain, 2001). Los compuestos 1-11 fueron capaces de desplazar al flutax-2 de su sitio (figura 30), indicando que todos ellos se unen al mismo sitio que el taxol o a un sitio solapante en el microtúbulo. Por el contrario, los compuestos 16-21 no fueron capaces de desplazar flutax-2, al igual que la laulimalida y el pelorusido A (compuestos 12 y 13; rojo y verde oscuro, respectivamente, en la figura 30).

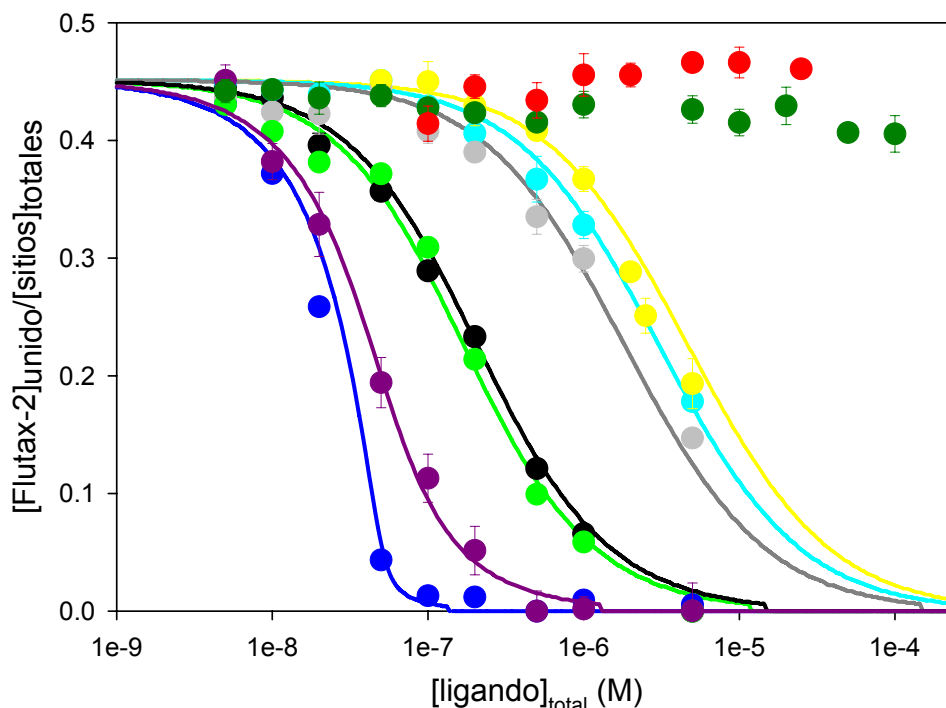


Figura 30. Competición entre los ligandos y el flutax-2 por el sitio de unión de taxol en microtúbulos estabilizados. Isothermas de desplazamiento a 35°C de un análogo fluorescente de taxol (50 nM flutax-2) de su sitio de unión en los microtúbulos (50nM sitios de taxol) por los diferentes ligandos. Los puntos representan los datos (con sus errores estándar) y las líneas representan el mejor ajuste de las constantes de equilibrio de unión de los ligandos a los datos experimentales, asumiendo una unión con estequiometría 1:1 a un mismo sitio. Ligandos: discodermolida (azul oscuro); dictiostatina (violeta); taxol (verde claro); ciclostreptina (negro); sarcodictina B (gris); sarcodictin A (azul claro), esteroide (amarillo), laulimalida (rojo) y pelorusido A (verde oscuro). El resto de ligandos capaces de desplazar al flutax-2, se han excluido del gráfico para facilitar la presentación. Se observa que ni laulimalida ni pelorusido A son capaces de desplazar flutax-2, indicando que se unen a un sitio diferente al de taxol, tal y como se ha descrito anteriormente para el caso de la laulimalida (Pryor y col., 2002).

Las muestras de tacalonolida A y E (compuestos 14 y 15, respectivamente), desplazaron débil y lentamente al flutax-2 del sitio de taxol. El desplazamiento completo de 50 nM de flutax-2 por 50 μ M de tacalonolida A, a 35 °C, requiere unos 50 minutos, que está muy lejos de los rangos de tiempo (menos de 4 minutos) que se esperan a partir de las constantes cinéticas de disociación de flutax-2, $1.92 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Díaz y col., 2000). Para corroborar si las tacalonolidas desplazaban realmente al flutax-2, se realizaron experimentos de competición por centrifugación y no se observó un desplazamiento significativo de flutax-2 (como máximo, se observó un 2% de flutax-2 desplazado, que cae dentro del error experimental de la medida, usando una concentración de tacalonolida 400 veces mayor que la de flutax-2). Tampoco se observó una inhibición significativa de la

unión de flutax-2 tras la pre-incubación de los microtúbulos con tacalonolidas, indicando que el sitio no se destruye en presencia de tacalonolida. Estos resultados indican que el desplazamiento de flutax-2 por tacalonolidas, observado por anisotropía de fluorescencia es, de alguna manera, un artefacto.

1.3.4. Parámetros termodinámicos de la unión de los ligandos al sitio de taxol

Las constantes de afinidad y los parámetros termodinámicos de la unión de los ligandos al sitio del taxol, se calcularon a partir de las isotermas de desplazamiento de flutax-2 de su sitio en microtúbulos estabilizados (figura 30), a diferentes temperaturas (tabla 6).

Tal y como se puede observar en la tabla 6, el ligando con mayor afinidad es la discodermolida ($K_b^{ap} 526 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$), que es casi 500 veces más afín que el taxol ($K_b^{ap} 1.07 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) y unas 150 veces más afín que el docetaxel ($K_b^{ap} 3.09 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) a 37 °C. La discodermolida tiene 30 veces más afinidad por el sitio que la dictiostina ($K_b^{ap} 18.0 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) y 8 veces más que la epotilona B ($K_b^{ap} 60.8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$). Los ligandos más débiles son el esteroide ($K_b^{ap} 0.047 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) y las sarcodictinas A y B ($K_b^{ap} 0.16 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ y $K_b^{ap} 0.20 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, respectivamente). La afinidad de unión de la eleuterobina ($K_b^{ap} 1.36 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) se sitúa entre aquellas del taxol y docetaxel. Se obtuvieron valores compatibles para la discodermolida ($K_b^{ap} 500 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) y para las epotilonas A y B ($K_b^{ap} 5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ y $K_b^{ap} 50 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$), cuando las medidas de las constantes de afinidad se realizaron por centrifugación, lo que valida el método de desplazamiento de flutax-2 para la determinación de constantes de afinidad, mediante medidas de anisotropía de fluorescencia.

Ligando	K_b^{op} 26 °C ($10^7 M^{-1}$)	K_b^{op} 27 °C ($10^7 M^{-1}$)	K_b^{op} 30 °C ($10^7 M^{-1}$)	K_b^{op} 32 °C ($10^7 M^{-1}$)	K_b^{op} 35 °C ($10^7 M^{-1}$)	K_b^{op} 37 °C ($10^7 M^{-1}$)	K_b^{op} 40 °C ($10^7 M^{-1}$)	K_b^{op} 42 °C ($10^7 M^{-1}$)	ΔG_{op}^{0} 37 °C (kJ mol ⁻¹)	ΔH_{op}^0 (kJ mol ⁻¹)	ΔS_{op}^0 (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
Taxol (1)	2.64±0.17	2.19±0.05	1.83±0.09	1.81±0.21	1.43±0.17	1.07±0.11	0.96±0.14	0.94±0.23	-41.7 ± 0.2	-51.4 ± 4.2	-29.3 ± 13.1
Docetaxel (2)	6.95±0.42	6.57±0.52	5.42±0.42	4.89±0.38	3.93±0.27	3.09±0.22	2.89±0.17	2.38±0.11	-44.4 ± 0.2	-52.5 ± 2.3	-25.5 ± 7.5
Epotilona A (3)	7.48±1.00	6.94±1.08	5.81±1.08	5.00±0.49	3.63±0.51	2.93±0.44	2.32±0.25	2.08±0.21	-44.3 ± 0.4	-65.6 ± 2.4	-68.3 ± 7.9
Epotilona B (4)	150±15	144±32	120±13	129±30	75.0±7.4	60.8±10.1	49.4±8.8	35.6±2.6	-52.1 ± 0.4	-70.7 ± 7.0	-59.7 ± 22.8
Dictioistatina (5)	35.5 ± 7.4	32.0 ± 5.5	24.8 ± 2.9	23.1 ± 2.8	19.2 ± 2.5	16.8 ± 2.0	14.1 ± 1.8	14.2 ± 1.7	-48.8 ± 0.3	-45.9 ± 2.6	9.5 ± 8.5
Discodermolida (6)	872±82	837±77	958±134	704±95	555±111	526±72	547±60	321±73	-57.7 ± 0.3	-33.2 ± 7.6	79.5 ± 2.5
Eleuterobina (7)	3.43 ± 0.21	3.26 ± 0.25	2.57 ± 0.08	2.47 ± 0.02	2.01 ± 0.11	1.36 ± 0.62	1.92 ± 0.02	1.7 ± 0.17	-43.6 ± 0.03	-33.2 ± 3.2	32.9 ± 10.3
Sarcodictina A (8)	0.23 ± 0.09	0.23 ± 0.09	0.22 ± 0.09	0.21 ± 0.09	0.18 ± 0.07	0.16 ± 0.06	0.44 ± 0.25	0.15 ± 0.05	-36.8 ± 0.8	-23.6 ± 2.6	43.12 ± 8.6
Sarcodictina B (9)	0.34 ± 0.14	0.33 ± 0.15	0.28 ± 0.12	0.29 ± 0.11	0.24 ± 0.08	0.20 ± 0.07	0.21 ± 0.06	0.19 ± 0.05	-37.9 ± 0.7	-29.3 ± 3.1	27.1 ± 9.9
Esteoride (10)	0.077 ± 0.021	0.077 ± 0.023	0.078 ± 0.026	0.07 ± 0.021	0.057 ± 0.016	0.047 ± 0.013	0.056 ± 0.0204	0.063 ± 0.022	-33.4 ± 0.8	-18.2 ± 6.8	51.6 ± 22.1

Tabla 6. Parámetros termodinámicos aparentes de la reacción de unión de los ligandos al sitio de taxol, determinados a partir de las curvas de desplazamiento del análogo fluorescente de taxol, flutax-2. Los datos (± errores estándar) representan la media de, al menos, cuatro medidas.

1.3.5. Unión de los ligandos del sitio de laulimalida a los microtúbulos

La detección de la unión de la laulimalida y pelorusido A a los microtúbulos se realizó mediante espectrometría de masas, (ver apartado 5.1.2 de Materiales y Métodos), ya que la absorbancia del pelorusido A en el UV es prácticamente nula. Las muestras, que contenían microtúbulos estabilizados y ligando, se incubaron a 37°C en tampón GAB-0.1 mM GTP. Tras la centrifugación, los precipitados de microtúbulos y los sobrenadantes se extrajeron con diclorometano, se secaron al vacío y se resuspendieron en metanol/agua para su posterior análisis por espectrometría de masas (figura 31).

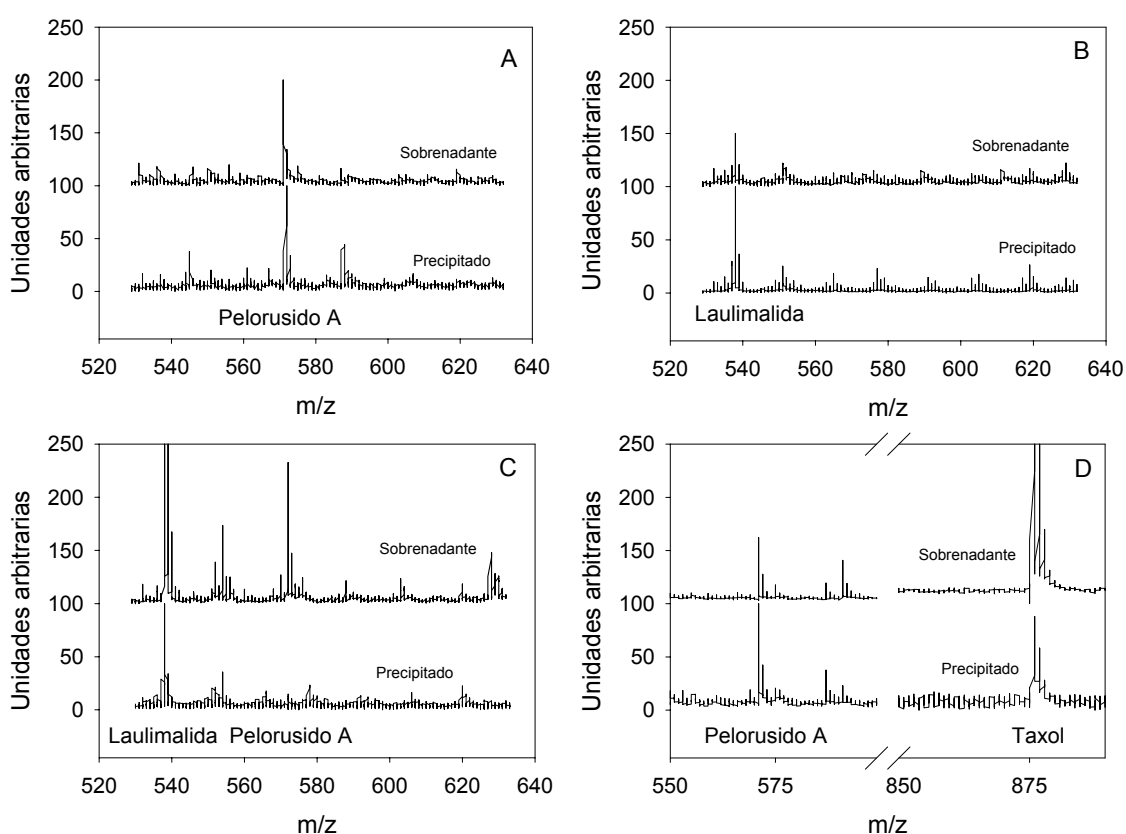


Figura 31. Unión de pelorusido A y laulimalida a los microtúbulos y desplazamiento de pelorusido A por laulimalida, pero no por taxol. Espectros de masas de los precipitados de microtúbulos y los sobrenadantes tras la extracción con diclorometano. Panel A. Pelorusido A (5 μM) y microtúbulos estabilizados (5 μM sitios de taxol). Panel B. Laulimalida (5 μM) y microtúbulos estabilizados (5 μM). Panel C. Pelorusido A (5 μM), laulimalida (50 μM) y microtúbulos estabilizados (5 μM). Panel D. Pelorusido A (5 μM), taxol (50 μM) y microtúbulos estabilizados (5 μM). El sobrenadante del panel C y el precipitado de taxol del panel D se escalaron por un factor de 2 para facilitar la presentación. Los espectros de los sobrenadantes se desplazaron 100 unidades de intensidad, para facilitar la presentación. Los picos de los espectros corresponden a laulimalida- Na^+ (m/z) = 537.8; laulimalida- K^+ (m/z) = 554.9, pelorusido A- Na^+ (m/z) = 571.3 y taxol- K^+ (m/z) = 876.8.

Se pueden observar los picos correspondientes a laulimalida y a pelorusido A en los espectros de los extractos de microtúbulos, confirmando su unión a microtúbulos estabilizados (figura 31A y 31B, respectivamente). También se realizaron experimentos control con microtúbulos no estabilizados, con idénticos resultados. Dado que ninguno de estos ligandos es capaz de desplazar flutax-2 de su sitio (figura 30), es decir que no se unen al sitio de taxol, se comprobó si estos dos ligandos compiten entre sí por un mismo sitio en los microtúbulos. Cuando se incubaron muestras de microtúbulos estabilizados, con 10 veces de exceso de laulimalida con respecto a pelorusido A, no se observó a este último ligando en los precipitados de microtúbulos, pero sí en el sobrenadante (figura 31C). Dado que un exceso de laulimalida es capaz de desplazar al pelorusido A de su sitio, se puede concluir que ambos ligandos se unen al mismo sitio en el microtúbulo. El pelorusido A es, por tanto, el segundo ligando conocido del sitio de laulimalida. Además, al igual que para el caso de la laulimalida (Pryor y col., 2002), se puede observar que un exceso de taxol no es capaz de desplazar al pelorusido A de su sitio (figura 31D).

2. Interacción de análogos de epotilona con el sitio de unión de taxol

2.1. Mecanismos de estabilización de microtúbulos por epotilonas

Para confirmar que las epotilonas estabilizan a los microtúbulos de forma similar a como lo hace el taxol, se estudiaron los mecanismos bioquímicos del ensamblaje de tubulina GTP y tubulina GDP, inducido por las epotilonas naturales A y B. La forma inactiva de la proteína, unida a GDP (10 μ M de tubulina GDP en tampón PEDTA4-1mM GDP), es capaz de ensamblar en presencia de epotilona, al igual que lo hace en presencia de taxol (Díaz y Andreu, 1993). Se realizaron controles mediante microscopía electrónica de todos los experimentos, que confirmaron que los polímeros formados eran microtúbulos.

También se midió la estequiometría de la reacción de unión. Para ello se emplearon concentraciones conocidas de tubulina GTP o tubulina GDP, equilibrada en tampón PEDTA4-1mM GTP ó PEDTA4-1mM GDP, respectivamente, que fueron incubadas con cantidades crecientes de epotilona A y B. La cantidad de ligando en los microtúbulos es de 1 mol de ligando por cada mol de proteína ensamblada, independientemente del nucleótido que tenga unido la proteína (para epotilona A, tubulina GDP: 1.01 ± 0.05 , tubulina GTP: 0.99 ± 0.08 ; para epotilona B, tubulina GDP: 1.05 ± 0.07 , tubulina GTP: 1.02 ± 0.04).

Al igual que para taxol y docetaxel, en estas condiciones, el ensamblaje y la unión están ligados (Díaz y Andreu, 1993); es decir, todo heterodímero de tubulina ensamblado en los microtúbulos tiene una molécula de epotilona unida (figura 32). Esto significa que, a menos que un exceso de ligando esté presente en la disolución, todo el ligando estará unido a la tubulina ensamblada, siendo la cantidad de ligando en el sobrenadante indetectable.

Dado que la concentración crítica del ensamblaje inducido por epotilonas satura con la concentración de ligando, el proceso de ensamblaje debe seguir un mecanismo mediado por ligando (ver apartado 4 de la Discusión). No obstante, a diferencia de lo que ocurre con el taxol, es posible detectar un ligero decrecimiento de la concentración de tubulina no polimerizada (concentración crítica) a concentraciones supra-estequiométricas de epotilona. Dado que todos los

sitios de unión deben estar llenos a esas concentraciones ($> 1 \mu\text{M}$), estos resultados sugieren la unión del ligando a tubulina no ensamblada, que activaría un segundo mecanismo de ensamblaje facilitado por ligando (ver apartado 4 de la Discusión).

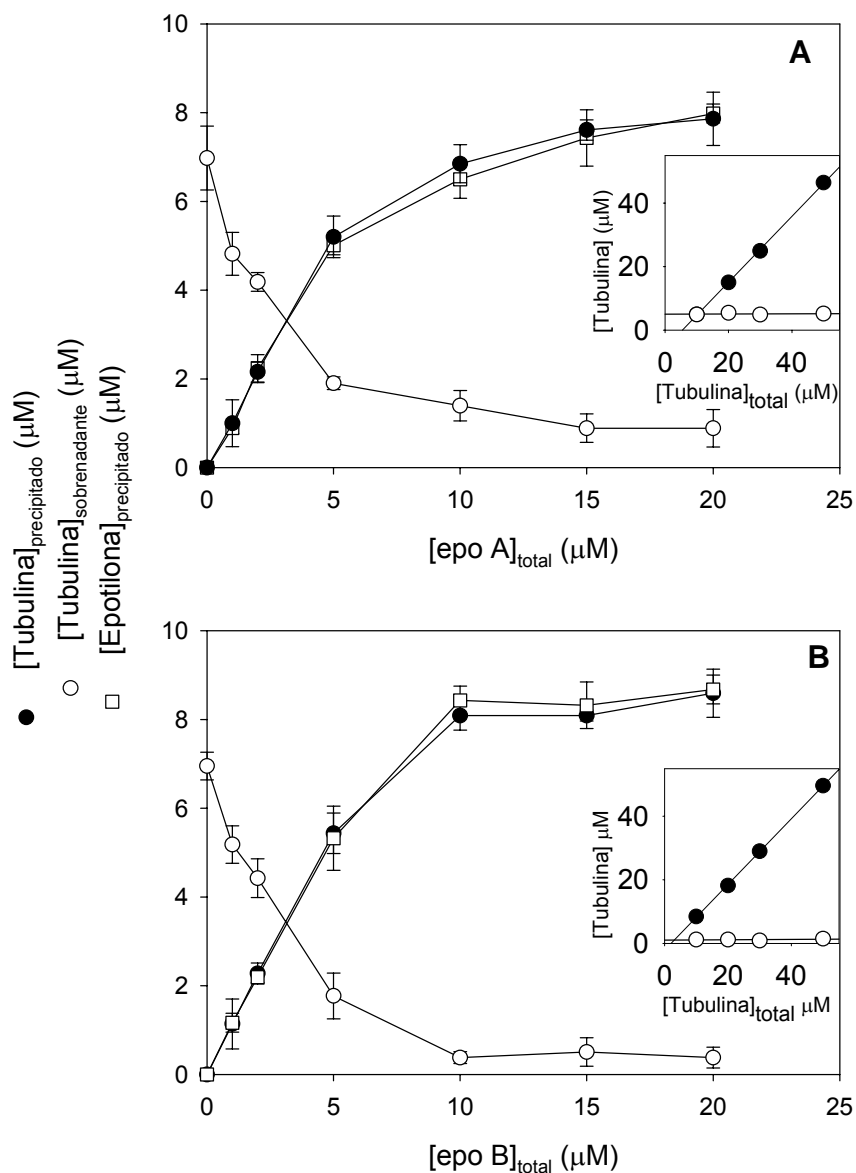


Figura 32. Caracterización bioquímica del ensamblaje de tubulina inducido por epotilona. Acoplamiento entre la unión de epotilona y el ensamblaje de tubulina. 10 μM tubulina GTP en tampón PEDTA7-1mM GTP se incubó con concentraciones crecientes de epotilona A (panel A) o epotilona B (panel B). Tras la centrifugación, las concentraciones de proteína en el precipitado (círculos negros) y en el sobrenadante (círculos blancos) y las concentraciones de epotilona en el precipitado (cuadrados blancos) se midieron tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las gráficas interiores representan la determinación de las concentraciones críticas del ensamblaje de tubulina inducido por epotilona en tampón PEDTA4-1mM GTP a 37 °C. Los círculos negros representan las concentraciones de tubulina polimerizada, en los precipitados y los círculos blancos representan las concentraciones de tubulina soluble, en el sobrenadante.

También se midió el efecto de los iones Mg^{2+} en el ensamblaje inducido por epotilona. Esto se realizó añadiendo concentraciones crecientes de magnesio a disoluciones de tubulina-GTP en tampón PEDTA-1mM GTP. El ensamblaje de tubulina GTP inducido por epotilona es dependiente de iones Mg^{2+} (figura 33), al igual que lo es el ensamblaje inducido por taxol (Díaz y col., 1993) y el resto de ligandos que se unen a este sitio (apartado 1.2.1 de Resultados), que requieren concentraciones libres de magnesio en el rango de mM para inducir el ensamblaje. De la misma forma, el ensamblaje de tubulina GDP presenta este mismo requerimiento.

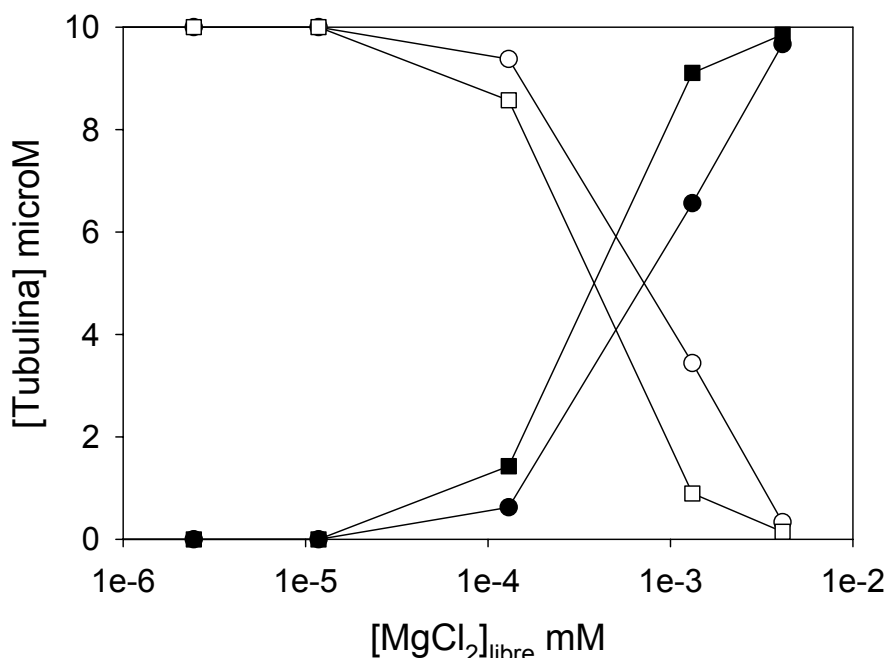


Figura 33. Requerimiento de iones magnesio para el ensamblaje de tubulina GTP inducido por epotilona. 10 μ M tubulina GTP en tampón PEDTA4-1mM GTP, con un 10% exceso de epotilona A (círculos) o epotilona B (cuadrados) se incubó con concentraciones crecientes de $MgCl_2$. Las concentraciones de tubulina polimerizada, en los precipitados (figuras negras) y de tubulina soluble, en los sobrenadantes (figuras blancas), se determinaron por centrifugación como se describe en Materiales y Métodos.

2.2. Unión de análogos de epotilona a microtúbulos estabilizados

El grupo del Dr. Nicolaou, en el Instituto Skaggs de Química Biológica (Instituto de Investigación Scripps, La Jolla, California), inició hace algunos años un programa dirigido al diseño y síntesis de análogos de epotilonas, que produjo un elevado número de derivados de epotilona en los que las posiciones esenciales C12, C13 y la

cadena lateral en C15 se modificaron de diferentes formas (Nicolaou y col., 1998; Nicolaou y col., 2000a; Nicolaou y col., 2000c; Nicolaou y col., 2001a; Nicolaou y col., 2001b; Nicolaou y col., 2002; Nicolaou y col., 2003). Para determinar la afinidad de unión al sitio de taxol de estos compuestos, se empleó el método de desplazamiento de flutax-2 de su sitio en microtúbulos estabilizados, descrito en Materiales y Métodos (figura 34).

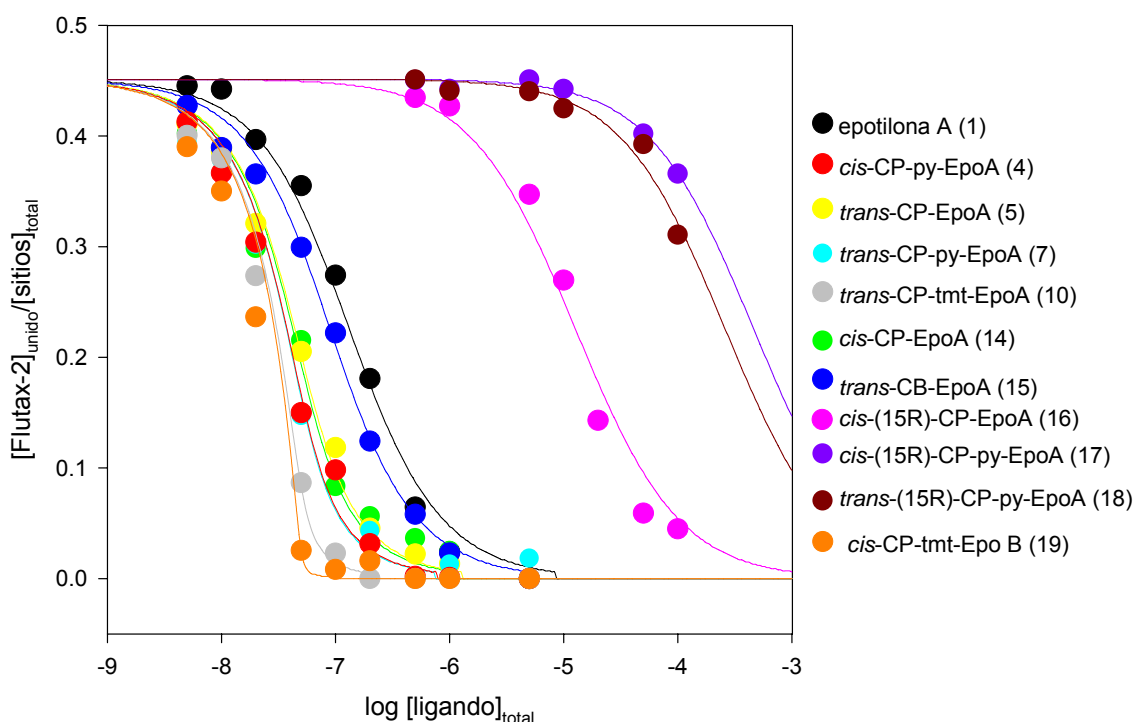


Figura 34. Competición entre flutax-2 y los derivados de epotilona por el sitio de unión de taxol en microtúbulos estabilizados. Desplazamiento de flutax-2 (50 nM) de su sitio de unión en microtúbulos estabilizados (50 nM) por los diferentes análogos de epotilona a 35 °C. Los puntos representan los datos determinados experimentalmente y las líneas se generaron mediante el ajuste de la constante de equilibrio de cada competidor a los datos experimentales, asumiendo una estequiometría de unión 1:1 al mismo sitio. Las líneas de los compuestos 17 y 18 corresponden a la simulación de constantes de equilibrio de 6000 y 12000 M^{-1} , respectivamente, ya que la determinación precisa de estas constantes requeriría disoluciones de estos ligandos mucho más concentradas.

La epotilona B se une más fuertemente que la epotilona A (tabla 7) a su sitio en los microtúbulos estabilizados ($K_b^{op}_{(37^\circ C)}$ en tampón GAB-0.1 mM GTP; epotilona A, $2.93 \pm 0.44 \times 10^7 M^{-1}$; epotilona B, $60.8 \pm 10.1 \times 10^7 M^{-1}$; $\Delta\Delta G = 8.1 \text{ KJ mol}^{-1}$). Cuando se compara con taxol ($K_b^{op} = 1.07 \pm 0.11 \times 10^7 M^{-1}$) y docetaxel ($K_b^{op} = 3.09 \pm 0.22 \times 10^7 M^{-1}$), la epotilona A se une con afinidad similar a estos últimos ligandos, mientras que la epotilona B es unas 20 veces más afín. La reacción de unión es

endotérmica ($\Delta H_{\text{epoA}} = -65 \pm 2 \text{ kJ mol}^{-1}$; $\Delta H_{\text{epoB}} = -70 \pm 7 \text{ kJ mol}^{-1}$) y dirigida por entalpía (tabla 7).

El efecto de los iones magnesio, el pH y la fuerza iónica en la unión de las epotilonas también se estudió y se observó un efecto muy débil en los rangos experimentales estudiados (1-9 mM Mg^{2+} , 0-1 M NaCl y pH 6.0-7.0). Estos resultados indican que los iones Mg^{2+} , aunque necesarios para el ensamblaje de tubulina inducido por epotilona, no intervienen en la unión de ésta al microtúbulo. Además, la unión de estos ligandos no debe estar mediada por interacciones electrostáticas.

2.3. Modificación de los parámetros termodinámicos debido a la modificación de grupos químicos de la molécula.

Las relaciones estructura-actividad de la molécula de epotilona se han estudiado usando un grupo de epotilonas químicamente modificadas en las posiciones 12, 15 y 21 (figura 35), ya que se ha descrito previamente un papel relevante de estas posiciones para la actividad del ligando (Nicolaou y col., 1998).

La determinación de las afinidades de una serie de ligandos por su sitio de unión en una proteína es una manera clásica de estudiar la especificidad de una interacción ligando-proteína y a partir de éstas se puede calcular, con muy buena aproximación, la contribución al incremento de energía libre aparente de unión de cada grupo (Fersht, 1999). El cambio del incremento en energía libre asociado con la modificación del ligando A para dar el ligando B puede ser definido como

$$\Delta\Delta G_{\text{app}}^0(\text{A} \rightarrow \text{B}) = \Delta G_{\text{app}}^0(\text{B}) - \Delta G_{\text{app}}^0(\text{A}) \quad (15)$$

Y de forma similar se pueden calcular los cambios en el incremento de entalpía y entropía de la reacción de unión. Los cambios en los parámetros termodinámicos aparentes de la unión, debidos a modificaciones simples en la molécula de epotilona se resumen en la tabla 8.

Ligando	K_b^{op} 26°C ($10^7 M^{-1}$)	K_b^{op} 27°C ($10^7 M^{-1}$)	K_b^{op} 30°C ($10^7 M^{-1}$)	K_b^{op} 32°C ($10^7 M^{-1}$)	K_b^{op} 35°C ($10^7 M^{-1}$)	K_b^{op} 37°C ($10^7 M^{-1}$)	K_b^{op} 40°C ($10^7 M^{-1}$)	K_b^{op} 42°C ($10^7 M^{-1}$)	ΔG^{op} 37°C (kJ mol ⁻¹)	ΔH^{op} (kJ mol ⁻¹)	ΔS^{op} (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
Taxol	2.64±0.17	2.19±0.05	1.83±0.09	1.81±0.21	1.43±0.17	1.07±0.11	0.96±0.14	0.94±0.23	-42.2±0.2	-51±4	-28±13
Docetaxel	6.95±0.42	6.57±0.52	5.42±0.42	4.89±0.38	3.93±0.27	3.09±0.22	2.89±0.17	2.38±0.11	-44.8±0.2	-52±2	-25±8
Epoifilona A (1)	7.48±1.00	6.94±1.08	5.81±1.08	5.00±0.49	3.63±0.51	2.93±0.44	2.32±0.25	2.08±0.21	-44.5±0.3	-65±2	-68±9
Epoifilona B (2)	150±15	144±32	120±13	129±30	75.0±7.4	60.8±10.1	49.4±8.8	35.6±2.6	-52.6±0.5	-70±7	-60±23
tmt-EpoB (3)	414±113	498±202	258±38	207±26	250±71	194±33	234±100	201±112	-55.4±0.6	-37±11	62±37
cis-CP-py-EpoA (4)	41.3±8.3	40.7±12.1	29.1±7.8	31.1±5.8	24.2±4.8	19.4±3.1	16.1±3.2	13.5±2.6	-49.4±0.3	-54±4	-16±11
trans-CP-EpoA (5)	36.7±1.5	35.1±3.4	31.0±1.9	27.3±1.8	19.4±1.0	15.3±0.8	14.1±0.8	12.1±1.0	-48.6±0.1	-58±4	-28±12
trans-CP-EpoB (6)	19.1±3.5	20.7±3.3	20.1±2.5	18.8±2.0	15.3±1.5	11.4±0.5	11.3±0.7	10.7±1.0	-48.2±0.2	-35±5	41±18
trans-CP-py-EpoA (7)	96.6±23.5	86.3±12.2	90.6±20.0	70.2±6.2	48.3±4.7	48.3±8.8	40.5±4.8	35.0±3.5	-51.5±0.2	-51±5	7±15
trans-CP-py-EpoB (8)	32.4±6.8	33.7±5.3	34.0±3.00	38.5±4.8	34.5±1.4	28.6±2.5	23.5±2.8	22.0±2.2	-50.3±0.1	-20±7	95±22
trans-CP-pyOH-EpoB (9)	29.5±1.2	30.3±1.3	28.3±2.8	25.0±2.6	20.0±2.3	16.6±2.3	15.6±1.2	12.8±0.6	-48.9±0.3	-43±4	19±12
trans-CP-tmt-EpoA (10)	155±27	191±41	171±42	173±39	178±48	141±34	108±29	121±39	-54.5±0.6	-21±7	107±23
trans-CP-tmt-EpoB (11)	59.5±10.6	70.8±8.0	73.3±12.9	79.2±10.3	62.6±6.4	55.6±6.4	60.2±7.1	50.0±4.0	-51.8±0.3	-12±7	127±21
trans-CP-5tmpy-EpoB (12)	10.12±1.34	17.1±3.7	15.1±2.8	14.0±2.7	12.3±2.2	10.4±1.6	11.0±1.9	7.9±1.1	-47.7±0.4	-36±5	37±16
trans-CP-6tmpy-EpoB (13)	3.30±0.1	3.43±0.29	3.19±0.50	3.18±0.32	2.46±0.25	2.38±0.4	2.15±0.3	2.35±0.46	-43.6±0.3	-23±4	67±12
cis-CP-EpoA (14)	38.6±3.3	36.4±3.9	29.9±3.4	30.4±4.8	22.0±3.3	17.5±1.4	14.8±1.2	12.0±0.3	-49.2±0.4	-57±4	-26±12
trans-CB-EpoA (15)	6.81±0.19	6.67±0.53	5.40±0.48	5.08±0.77	3.64±0.41	3.12±0.32	2.88±0.37	2.70±0.45	-44.5±0.3	-49±3	-15±10
cis-(15R)-CP-EpoA(16)	0.0307±0.005	0.0321±0.005	0.0248±0.005	0.0250±0.005	0.0215±0.0014	0.0187±0.003	0.0172±0.0014	0.0178±0.002	-31.4±0.2	-31±3	1±10
cis-CP-tmt-EpoB (19)	3109±1590	2189±604	2053±358	2670±538	2055±428	1565±180	1049±299	593±113	-60.8±0.5	n.d.	n.d.
cis-CP-py-EpoB (20)	131±29	118±48	98±20	99±23	71±15	51±6	53±6	58±16	-52.2±0.4	-46±7	20±22

Tabla 7. Parámetros termodinámicos aparentes de la unión de los análogos de epotilona al sitio de taxol en los microtúbulos, determinados a partir del desplazamiento del flutax-2. Los datos que aparecen en la tabla son los valores medios y los errores estándar de al menos cuatro determinaciones diferentes. Los valores de ΔG^{op} de los compuestos *cis*-(15R)-CP-py-EpoA(17) y *trans*-(15R)-CP-py-EpoA(18) se estiman aproximadamente en -22 and -24 kJ mol⁻¹, respectivamente, a 35 °C.

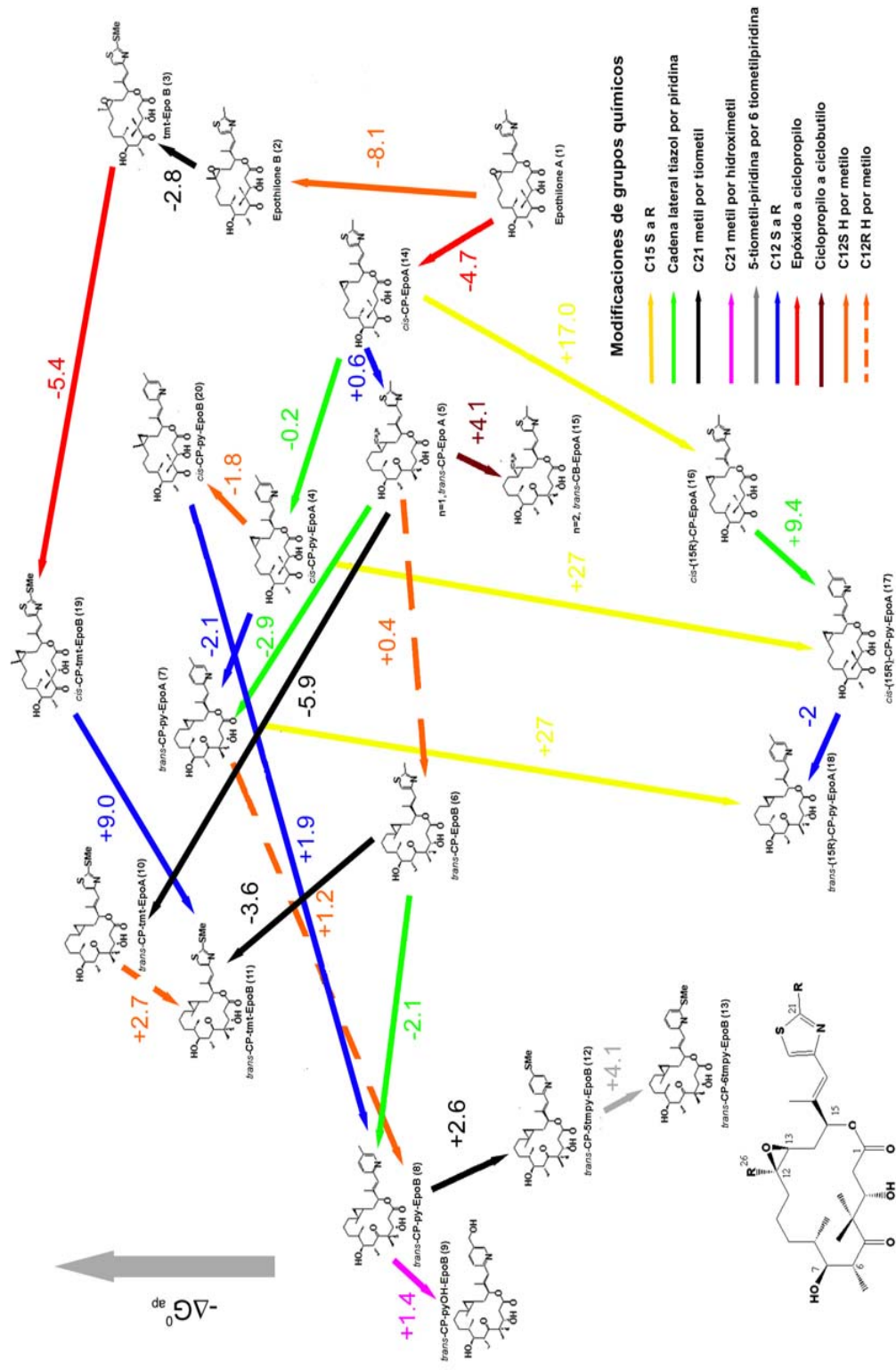


Figura 35. Esquema de las estructuras de los análogos de epotilona usados en este estudio, las diferencias químicas que existen entre ellos y el efecto de esas modificaciones en la energía libre aparente de unión a su sitio en microtúbulos estabilizados. Los datos que se muestran se determinaron a 35 °C.

Modificación de un solo grupo	Compuestos	$\Delta\Delta G_{ap}^0$ 35 °C (kJ mol ⁻¹)	$\Delta\Delta H_{ap}^0$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta\Delta S_{ap}^0$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
C15 S a R	4->17	~ 27	n.d.	n.d.
	7->18	~ 27	n.d.	n.d.
	14->16	17.8±0.3	26±4	25±11
Cadena lateral C15 Tiazol- > Piridina	5->7	-2.9±0.2	7±4	35±14
	6->8	-2.1±0.3	15±9	54±28
	14->4	-0.2±0.4	3±4	10±12
	16->17	~ 9.4	n.d.	n.d.
C21 Metil a Tiometil	2->3	-2.8±0.8	33±13	122±44
	5->10	-5.9±0.6	37±8	135±24
	6->11	-3.6±0.3	23±9	86±28
	8->12	2.6±0.3	-16±9	-58±27
C21 Metil a Hidroximetilo	8->9	1.4±0.3	-23±8	-76±25
5-Tiometil-piridina a 6-Tiometil-piridina	12->13	4.1±0.5	13±6	30±20
C12 S a R	4->7	-2.1±0.3	3±5	23±13
	14->5	0.6±0.3	1±4	-2±12
	17->18	~ -2	n.d.	n.d.
	19->11	9.0±0.6	n.d.	n.d.
	20->8	1.9±0.4	26±10	75±31
Epóxido- > Ciclopropilo	1->14	-4.7±0.4	8±3	38±11
	3->19	-5.4±0.8	n.d.	n.d.
Ciclopropilo- > Ciclobutilo	5->15	4.1±0.2	8±4	11±11
C12S H a Metilo	1->2	-8.1±0.6	-5±7	8±25
	4->20	-1.8±0.5	8±8	36±25
C12R H a Metilo	5->6	0.4±0.3	23±6	69±22
	7->8	1.2±0.2	31±9	88±27
	10->11	2.7±0.7	9±10	20±31

Tabla 8. Incremento en los parámetros termodinámicos de la unión de los análogos de epotilonas a microtúbulos estabilizados. N.d. significa no determinado.

2.4. Comparaciones entre la afinidad de unión, la actividad estabilizadora de microtúbulos y la citotoxicidad de los derivados de epotilona

Dado que la citotoxicidad de estos ligandos se produce mediante la estabilización de microtúbulos, resulta interesante comparar cuantitativamente estas actividades para los diferentes derivados. Para ello, se midieron las

concentraciones críticas del ensamblaje de microtúbulos inducido por paclitaxel, docetaxel y los diferentes análogos de epotilona a 37 °C (tabla 9).

Compuesto	Cr (μM)	1/ K_b^{op} (nM)	IC ₅₀ (nM)
Taxol	4.24±0.49	93±9	1.30±0.22
Docetaxel	1.52±0.25	32±3	0.45±0.25
Epotilona A (1)	5.11±0.15	34±4	3.10±0.72
Epotilona B (2)	1.17±0.12	1.6±0.1	0.30±0.05
tmt-EpoB (3)	0.72±0.089	0.51±0.07	0.17±0.08
cis-CP-py-EpoA (4)	1.53±0.10	5.2±0.8	1.40±0.45
trans-CP-EpoA (5)	1.27±0.21	6.5±0.1	2.70±0.10
trans-CP-EpoB (6)	2.19±0.30	8.8±0.4	15.00±0.00
trans-CP-py-EpoA(7)	1.53±0.10	2.1±0.4	0.62±0.17
trans-CP-py-EpoB(8)	1.19±0.21	3.5±0.3	1.70±0.76
trans-CP-pyOH-EpoB(9)	1.70±0.18	6.0±0.6	1.70±1.12
trans-CP-tmt-EpoA(10)	1.44±0.12	0.71±0.14	1.20±0.67
trans-CP-tmt-EpoB(11)	1.36±0.21	1.8±0.2	3.50±1.64
trans-CP-5tmpy-EpoB(12)	2.54±0.10	9.6±1.3	14.20±5.73
trans-CP-6tmpy-EpoB(13)	9.65±2.46	42±7	114.00±0.00
cis-CP-EpoA(14)	0.93±0.17	5.7±0.4	1.60±0.12
trans-CB-EpoA(15)	2.97±0.12	32±3	25.5±1.5
cis-(15R)-CP-EpoA(16)	>50	~5300	225
cis-(15R)-CP-py-EpoA(17)	>50	~170000	>300 (inactivo)
trans-(15R)-CP-py-EpoA (18)	>50	~83000	>300 (inactivo)
cis-CP-tmt-EpoB (19)	0.38±0.07	0.063±0.006	0.1±0.0
cis-CP-py-EpoB (20)	0.71±0.03	1.9±0.1	0.3±0.1

Tabla 9. Comparación de las afinidades de unión, las concentraciones críticas del ensamblaje de microtúbulos inducido por ligando y la citotoxicidad de los derivados de epotilona. Las afinidades de unión de los ligandos y las concentraciones críticas del ensamblaje de microtúbulos inducido por ligando, se midieron a 37 °C. Los datos de citotoxicidad en células humanas carcinoma de ovario (1A9) se tomaron de (Nicolaou y col., 2001b; Nicolaou y col., 2002; Nicolaou y col., 2003).

De todos los compuestos estudiados, el que tiene mayor poder de inducción del ensamblaje es el número 19 ($Cr = 0.31 \pm 0.07 \mu\text{M}$) que a su vez es el que posee mayor afinidad por el sitio de taxol en el microtúbulo ($K_{\text{bin1}} = 1.6 \pm 0.2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$). El ligando más débil es el número 13 ($Cr = 10.75 \pm 1.2 \mu\text{M}$) que es el que tiene menor

afinidad ($K_{\text{bin1}} = 2.38 \pm 0.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), exceptuando los compuestos inactivos 16, 17 y 18. La epotilona B es mucho más fuerte induciendo el ensamblaje que la epotilona A (epoA Cr = $5.11 \pm 0.2 \mu\text{M}$; epoB Cr = $1.17 \pm 0.1 \mu\text{M}$).

3. Caracterización funcional del sitio de taxol mediante marcaje covalente con ciclostreptina

Como ya se ha descrito en el apartado 1.3.2 de Resultados, la ciclostreptina es el primer compuesto conocido que estabiliza microtúbulos mediante unión irreversible al sitio de taxol. En el presente trabajo se ha utilizado la interacción covalente de este compuesto con el sitio de taxol, para proponer un mecanismo por el que los ligandos accederían a éste.

3.1. La ciclostreptina bloquea la unión de ligandos al sitio de taxol

Para confirmar la capacidad de la ciclostreptina para competir con diferentes ligandos del sitio de taxol, se realizaron experimentos de competición con tres ligandos marcados radiactivamente que se unen a este sitio (tabla 10). Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. Ernest Hamel, en el Instituto Nacional del Cáncer, Frederick, USA. Los ligandos competidores se eligieron en base a su afinidad por el sitio de taxol, relativa a la constante aparente de equilibrio de la ciclostreptina, tras 20 minutos de incubación ($2.06 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ a $35 \text{ }^\circ\text{C}$; Edler y col., 2005). El taxol tiene una constante de equilibrio de unión de $1.43 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, muy similar a la de la ciclostreptina. Por otro lado, la epotilona B y la discodermolida tienen constantes de afinidad mucho mayores (70.5 y $555 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ a $35 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente; tabla 6).

Inhibidor (20 μM)	^3H -Taxol		^3H -Discodermolida		^{14}C -Epotilona B	
	No Preincubación	Preincubación	No Preincubación	Preincubación	No Preincubación	Preincubación
Ciclostreptina	40 \pm 1.8	75 \pm 1.6	4.1 \pm 4.0	81 \pm 6.1	21 \pm 9.5	88 \pm 0.2
Epotilona A	54 \pm 3.3	51 \pm 0.1	4.7 \pm 1.1	4.1 \pm 5.1	51 \pm 1.3	51 \pm 0.9
Epotilona B	69 \pm 0.2	67 \pm 4.3	24 \pm 1.7	21 \pm 5.1	n.d.	n.d.
Taxol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	43 \pm 6.8	41 \pm 8.3

Tabla 10. Unión de ligandos a microtúbulos pre-incubados con ciclostreptina, epotilona A, epotilona B y taxol. Los valores \pm desviación estándar representan el porcentaje de inhibición de la unión de los compuestos marcados radiactivamente. N.D. significa no determinado.

Para realizar estos experimentos, se polimerizaron microtúbulos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, en un tampón que contenía 0.75 M de glutamato, como inductor del ensamblaje. A estos

microtúbulos preformados, se añadieron los ligandos radiactivos ($[^3\text{H}]$ -discodermolida, $[^{14}\text{C}]$ -epotilona B y $[^3\text{H}]$ -taxol), antes o después de incubar los microtúbulos con los ligandos no marcados, y se determinó la cantidad de ligando radiactivo unido a los microtúbulos. Como se puede observar en la tabla 10, el taxol y las epotilonas A y B se comportaron como se espera para compuestos que se unen reversiblemente a un sitio, es decir, el porcentaje de ligando desplazado es independiente de si el competidor se añade antes o después y sólo es dependiente de las afinidades relativas de los ligandos competidores.

Por el contrario, se observa una gran diferencia cuando los microtúbulos se incuban previamente con ciclostreptina. Ni la epotilona A ni la epotilona B, son capaces de desplazar a la discodermolida de su sitio, pero la pre-incubación de los microtúbulos con ciclostreptina bloqueó casi completamente la unión de la $[^3\text{H}]$ -discodermolida, $[^{14}\text{C}]$ -epotilona B y $[^3\text{H}]$ -taxol (81, 88 y 75 %, respectivamente; tabla 10). Estos resultados indican que la ciclostreptina bloquea de manera irreversible el acceso de ligandos al sitio de taxol en microtúbulos preformados.

Para confirmar estos resultados, se comprobó si la ciclostreptina bloquea también la unión de flutax-2 a microtúbulos estabilizados (figura 36).

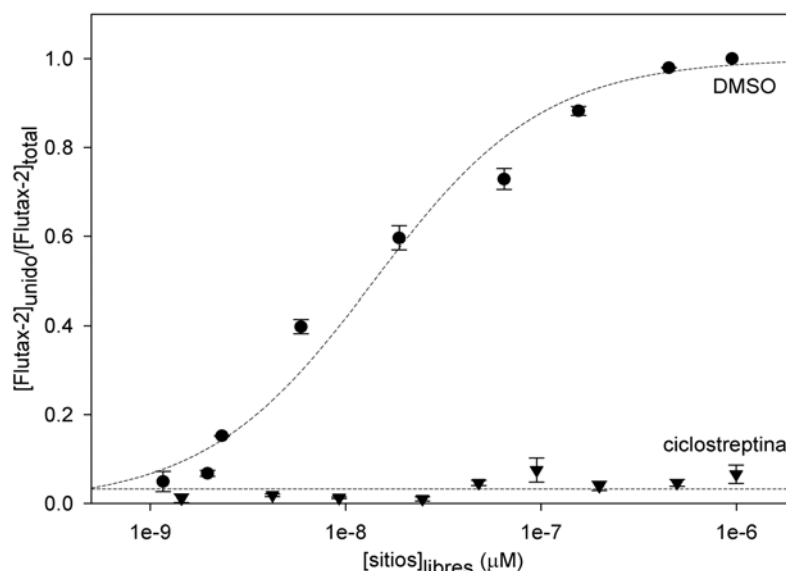


Figura 36. Isothermas de unión de flutax-2 a microtúbulos estabilizados preincubados con ciclostreptina. Las muestras se incubaron con ciclostreptina, o DMSO, en tampón GAB-1mM GTP a 25 °C y se dializaron frente a este mismo tampón, para eliminar el exceso de ligando. Posteriormente, 50 nM de flutax-2 se tituló con concentraciones crecientes de sitios de taxol iniciales de estas muestras. Los círculos representan la unión de flutax-2 al sitio de taxol en microtúbulos incubados con DMSO, y los triángulos invertidos representan la unión de flutax-2 a microtúbulos preincubados con ciclostreptina. Los datos se representan con sus errores estándar.

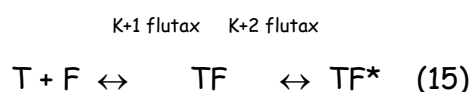
Como se puede observar en la figura 36, el flutax-2 es incapaz de unirse a microtúbulos preincubados con ciclostreptina. Por el contrario, el flutax-2 se unió a microtúbulos control, incubados con DMSO, con una constante aparente de afinidad de $7.09 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, que está en perfecta concordancia con el valor previamente determinado, $7.1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Díaz y col., 2000).

3.2. La ciclostreptina desplaza al flutax-2 por un mecanismo diferente al del docetaxel

Se ha descrito previamente que la ciclostreptina es capaz de desplazar al flutax-2 unido al sitio de taxol en microtúbulos estabilizados, con una constante aparente de unión similar a la del taxol (Edler y col., 2005). La cinética de este desplazamiento se estudió en comparación con la producida por docetaxel.

En la figura 37 se puede observar una clara diferencia en las cinéticas de desplazamiento de flutax-2 entre estos dos compuestos; mientras que el desplazamiento con docetaxel es independiente de la concentración de este ligando (2 y 20 μM), el desplazamiento de flutax-2 con ciclostreptina es fuertemente dependiente de la concentración de ésta. Estos resultados indican que la ciclostreptina desplaza al flutax-2 de forma diferente a como lo hace el docetaxel.

La unión de flutax-2 a los microtúbulos es una reacción de dos etapas (ecuación 15; (Díaz y col., 2000)),



donde T es tubulina y F es flutax-2. Como se ha descrito previamente, el producto de la constante de asociación de docetaxel multiplicado por la concentración de docetaxel es mucho mayor que la constante de disociación de flutax-2 de los microtúbulos ($k_{+1} \text{ docetaxel} \cdot [\text{docetaxel}] \gg k_{-2} \text{ flutax}$; (Díaz y col., 2000)).

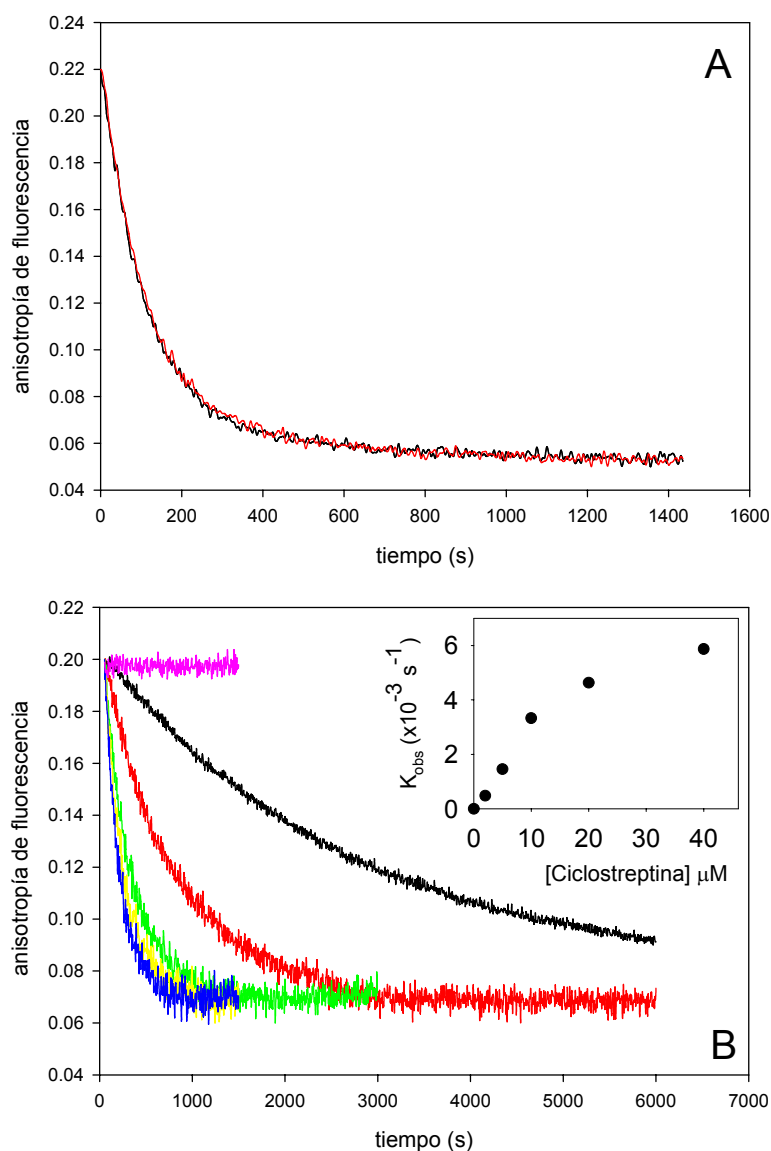


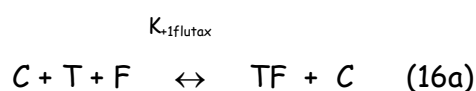
Figura 37. Cinética de desplazamiento de flutax-2 de su sitio en microtúbulos estabilizados por ciclostreptina. A tiempo 0, el ligando competidor se añadió a una disolución que contenía 250 nM de microtúbulos estabilizados y 200 nM de flutax-2. Panel A. Docetaxel como competidor a concentraciones de 2 (curva negra) y 20 μM (curva roja). Panel B. Ciclostreptina como competidor a concentraciones de 2 (curva negra), 5 (curva roja), 10 (curva verde), 20 (curva amarilla) y 40 μM (curva azul). La curva de color magenta e el panel B es una curva control, sin competidor. Todas las curvas se ajustaron a una exponencial simple. Figura interior. Dependencia de la constante cinética observada (k_{obs}) de la concentración de ciclostreptina. Todas las medidas se realizaron a 25 °C

Debido a esto, en condiciones de exceso de competidor, cada sitio que queda libre es ocupado rápidamente por docetaxel y de esta forma, el flutax-2 es disociado de los microtúbulos a la velocidad de disociación de la reacción más lenta, que es la de disociación del flutax-2 ($k_{-2 \text{ flutax}}$), independientemente de la concentración de docetaxel (figura 37A) y con una constante cinética de $k_{-2 \text{ flutax}}$ de

$8.9 \pm 0.3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, que concuerda con determinaciones previas ($7.1 \pm 0.04 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; (Díaz y col., 2000)).

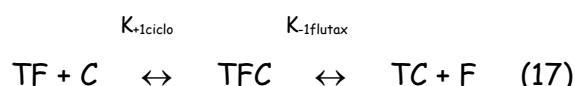
De cualquier forma, este no es el caso para la ciclostreptina. Aunque la ciclostreptina es capaz de desplazar totalmente al flutax-2 a las concentraciones ensayadas, la velocidad cinética observada (k_{obs}) es dependiente de la concentración de ciclostreptina (figura 37B). De esta forma, k_{obs} crece hasta alcanzar un máximo que es igual a la constante cinética de disociación de flutax-2 ($k_{-2 \text{ flutax}}$; figura 37B, gráfica interior).

Una fácil explicación para este hecho sería que el orden de magnitud del producto $k_{+1 \text{ ciclo}} \cdot [\text{ciclostreptina}]$ sea similar o menor que $k_{+1 \text{ flutax-2}} \cdot [\text{flutax-2}]$ y, de esta forma, el flutax-2 libre estará compitiendo con la ciclostreptina por los sitios que van quedando libres (ecuaciones 16a y 16b),



donde C es ciclostreptina. De cualquier forma, las curvas observadas son monoexponenciales, lo que implica que la constante de velocidad observada es constante durante el proceso. Éste no sería el caso si el flutax-2 compitiera con la ciclostreptina por los sitios libres, dado que la concentración de flutax-2 aumenta a medida que avanza la reacción y, por tanto, la velocidad aparente de disociación debería decaer con el tiempo.

Otra explicación alternativa sería que la ciclostreptina se uniera a un sitio diferente al de flutax-2 y que esta unión indujera un cambio conformacional que alterase el sitio de unión (ecuación 17):



En este caso, el paso observado sería el segundo, siendo la cinética observada monofásica en condiciones de estado estacionario ($[TFC]$ constante

durante el tiempo del experimento) y dependiente de $[C]$. El ajuste de los datos a este modelo cinético (FITSIM40) generó un valor despreciable para $k_{-1\text{ciclo}}$ y un valor de $k_{+1\text{ciclo}} 350 \pm 20 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, indicando que se está observando una reacción irreversible.

3.3. Actividad biológica de la ciclostreptina epoxidada

La estructura química de la ciclostreptina (figura 38) se caracteriza por poseer una olefina estructuralmente deformada (C2-C17), que se ha propuesto que podría reaccionar con grupos nucleófilos de las proteínas (Adam y col., 2003). La reactividad de esta olefina se ha estudiado con una variedad de nucleófilos, entre los que se incluyen grupos amina, tiol e imidazol (Vanderwal y col., 2003).

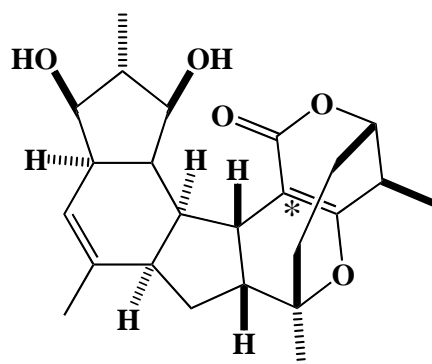


Figura 38. Estructura química de la ciclostreptina. La olefina deformada que se ha propuesto como el grupo electrófilo que podría reaccionar con residuos nucleófilos de las proteínas se marca con un asterisco.

Con el objetivo de determinar si esta olefina es en realidad el grupo reactivo que modifica irreversiblemente a la tubulina, se preparó el derivado epoxidado de ciclostreptina y se determinó su actividad, encontrándose inactivo. Es incapaz de desplazar al flutax-2 de su sitio y las células incubadas con este derivado son indistinguibles de las células control y presenta una citotoxicidad muy baja, tal y como se había descrito previamente (Yoshimura y col., 2000). Estos resultados sugieren que la olefina C2-C17 es el grupo reactivo que modifica covalentemente la tubulina.

3.4. Determinación de los residuos de tubulina modificados por ciclostreptina en los microtúbulos

Una vez caracterizada la molécula de ciclostreptina por espectrometría de masas (ver apartado 5.1.3.2 de Materiales y Métodos), se procedió al análisis mediante LC-MS/MS de los péptidos trípticos y quimotrípticos de tubulina. Para ello, las muestras, de tubulina GTP, se incubaron con y sin ciclostreptina a 37 °C durante 50 minutos en tampón GAB-1mM GTP, para inducir la polimerización de microtúbulos. Tras la incubación, los microtúbulos formados se sedimentaron mediante centrifugación y se resuspendieron en tampón 50 mM NH₄HCO₃, 12 mM EDTA, 0.01 % SDS, pH 7.6. Posteriormente, las muestras se digirieron usando tripsina o quimitripsina y los péptidos resultantes se analizaron por LC-MS/MS mediante selección de iones precursores, condicionada por la aparición del fragmento con m/z 249 Da, para detectar los péptidos covalentemente modificados por ciclostreptina.

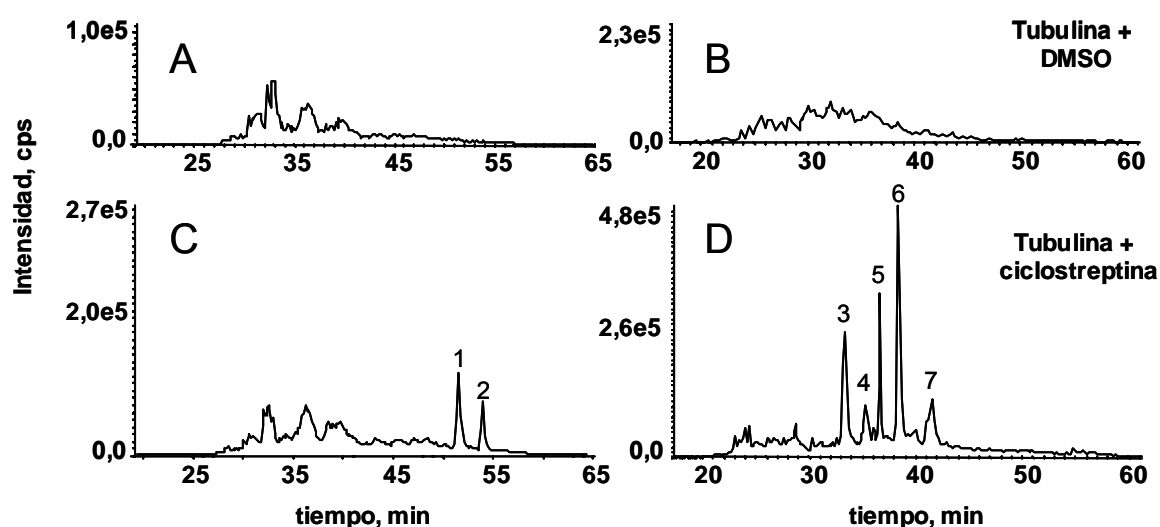


Figura 39. Análisis cromatográfico de los péptidos trípticos y quimotrípticos de las muestras de microtúbulos tratadas con ciclostreptina. Cromatogramas de los experimentos de selección del ion precursor para la señal m/z 249 Da, en las muestras de tubulina incubadas con y sin ciclostreptina y digeridas con tripsina o quimitripsina. Panel A. Muestras de tubulina incubadas con DMSO y digeridas con tripsina. Panel B. Muestras de tubulina incubadas con DMSO y digeridas con quimitripsina. Panel C. Muestras de tubulina incubadas con ciclostreptina y digeridas con tripsina. Panel D. Muestras de tubulina incubadas con ciclostreptina y digeridas con quimitripsina.

Los cromatogramas de estos experimentos muestran 2 picos diferenciales entre las muestras tratadas con ciclostreptina y las muestras control digeridas

con tripsina, y otros 5 picos diferenciales en las muestras digeridas con quimotripsina (figura 39).

Cada una de las señales de espectrometría de masas, correspondientes a estos picos, se fragmentó para obtener la secuencia del péptido y determinar los residuos modificados por ciclostreptina. Los picos de la figura 39 se corresponden con las secuencias de la subunidad beta de tubulina mostradas en la figura 40. Las señales de los péptidos trípticos 1 y 2 (figura 39C) corresponden a la misma secuencia, con un residuo de metionina oxidado y no oxidado, respectivamente. Estos péptidos aparecen triple y cuádruplemente cargados en el rango de masas analizado.

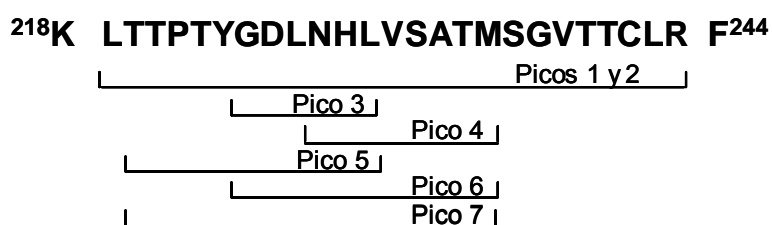


Figura 40. Péptidos trípticos y quimotrípticos modificados por ciclostreptina en las muestras de microtúbulos. Secuencia de la subunidad beta de tubulina a la que corresponde cada una de las señales de la figura 39. Los picos 1 y 2 dos proceden de la digestión tríptica y los picos 3-7 de la quimotríptica.

El análisis de las series de fragmentación (figura 41) de estos péptidos revela, inequívocamente, que existen dos residuos que están siendo modificados covalentemente por ciclostreptina, THR220 (péptidos 1, 2, 5 y 7) y ASN228 (péptidos 3, 4 y 6).

Se realizaron también experimentos control con microtúbulos previamente polimerizados y se comprobó que la ciclostreptina modificaba de igual manera los residuos THR220 y ASN228.

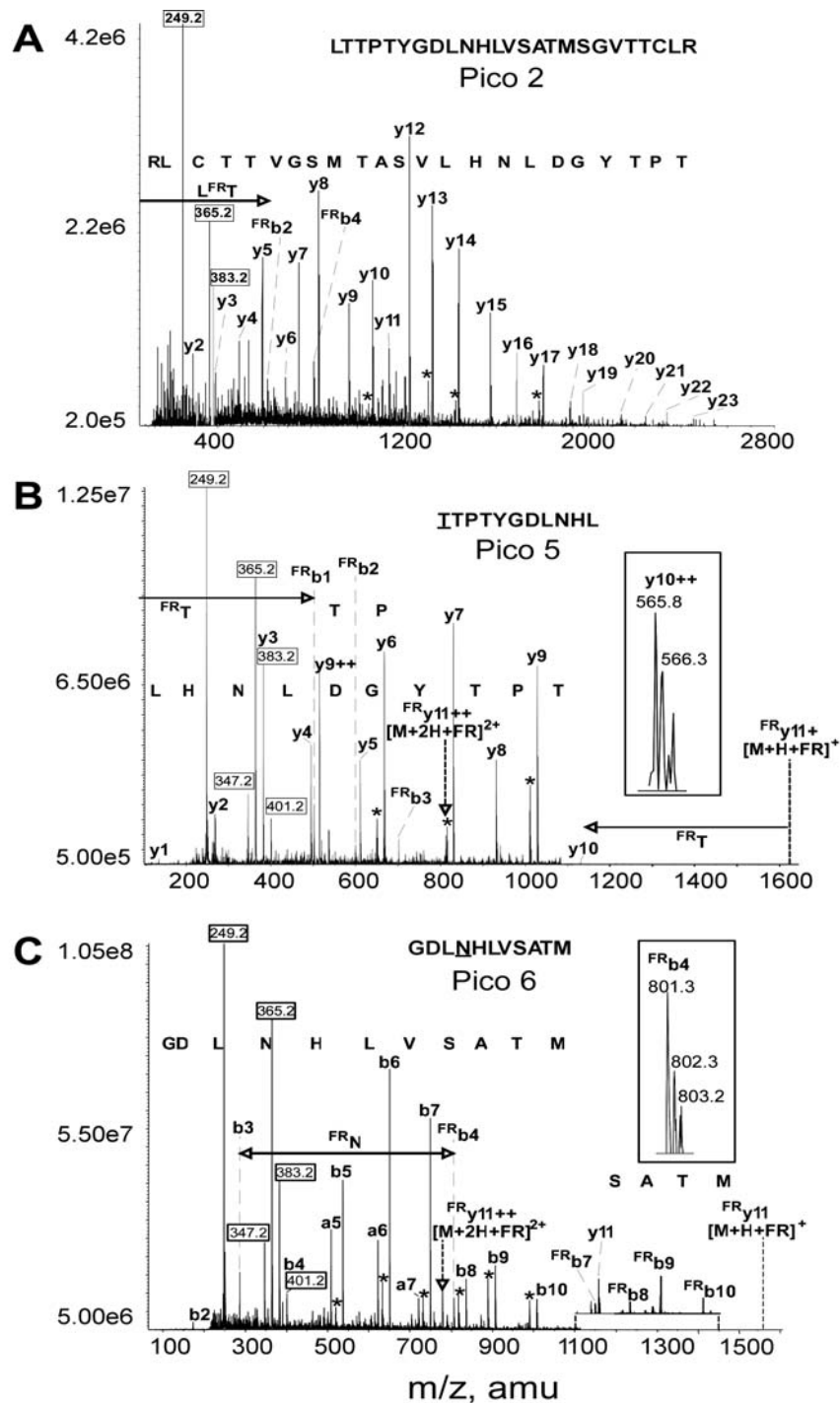


Figura 41. Determinación de los residuos de tubulina en los microtúbulos modificados por ciclostreptina mediante espectrometría de masas. A. La figura muestra las series principales de fragmentación (amino-b y carboxi-y) del ion parental triplemente cargado con m/z 1017.7 Da, correspondiente a la secuencia del péptido tríptico de tubulina (219-243) modificado por la ciclostreptina. B. Espectro de fragmentación del péptido quimotriptico que contiene los residuos de la subunidad beta de tubulina 220-230. C. Espectro de fragmentación del péptido quimotriptico que contiene los residuos de la subunidad beta de tubulina 225-235. Los números enmarcados (incluyendo el ion a m/z 249 Da usado para filtrar los iones) indican las masas correspondientes a la fragmentación de la molécula de ciclostreptina. La pérdida de agua está marcada con un asterisco y también se indican algunos péptidos de la "serie y", "serie b" y "serie a" de fragmentación. Las flechas horizontales indican la detección del residuo modificado con la ciclostreptina en la serie correspondiente. Los recuadros interiores son una ampliación de los picos correspondientes al ion y10 doblemente cargado (B) y al ion b4 (C) de las respectivas series de fragmentación.

3.5. Determinación de los residuos de tubulina no polimerizada modificados por ciclostreptina

Para determinar si la ciclostreptina se une también covalentemente a tubulina no ensamblada y en caso afirmativo, determinar a qué residuos se une, se incubaron muestras de tubulina GTP (20 μ M) durante 50 minutos a 37 °C en tampón PEDTA-0.1 mM GTP. Se ha comprobado previamente que en este tampón (sin magnesio) y a estas concentraciones, toda la proteína permanece en estado dimérico, sin polimerizar ni oligomerizar (Howard y Timasheff, 1987). Tras la incubación, las muestras se centrifugaron para sedimentar cualquier posible agregado y los sobrenadantes se digirieron con tripsina y quimotripsina, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para las muestras de microtúbulos. Los experimentos de selección del ion precursor (utilizando el fragmento m/z 249 Da) muestran, de nuevo, los picos 1 y 2 para las muestras digeridas con tripsina (residuo modificado THR220) y, solamente, una señal muy débil correspondiente a los picos 5 y 7, en las muestras digeridas con quimotripsina (no mostrado), pero no se encontró rastro del segundo residuo modificado, ASN228, es decir, no se encontraron los picos 3, 4 ó 6.

Con objeto de aumentar la sensibilidad de detección de las señales correspondientes a los péptidos modificados por ciclostreptina en el residuo ASN228 (picos 3, 4 y 6), se analizaron los péptidos trípticos y quimotrípticos mediante rastreo múltiple de iones con alta sensibilidad (MRM). Esta técnica permite filtrar los iones de una determinada m/z (en este caso los iones correspondientes a los picos 1-7), condicionada a la aparición de un determinado fragmento (en este caso el fragmento con m/z 249 Da).

Utilizando esta metodología, se escanearon los iones correspondientes al pico 2 (que es el pico donde se detecta la ciclostreptina unida a la THR220 en las muestras de microtúbulos), para las muestras digeridas con tripsina y a los picos 4 y 6 (que son picos donde se detecta la ciclostreptina unida a la ASN228 en las muestras de microtúbulos) más el pico 5, como control positivo, para las muestras digeridas con quimotripsina. Adicionalmente, todas estas señales se filtraron con la

señal marcadora del fragmento con m/z 249 Da. De nuevo, se detectó el pico 2 en los péptidos trípticos (figura 42A), es decir, se confirma la modificación del residuo THR220. Por el contrario, no se detectaron los péptidos quimotrípticos 4 ó 6, indicando que el residuo ASN228 no está modificado por ciclostreptina en estas muestras. Estos resultados confirman que la ciclostreptina se une a tubulina dimérica, no polimerizada, modificando únicamente el residuo THR220.

Como control positivo, se rastreó el pico 5 (figura 42B) y se encontró la ciclostreptina unida al residuo THR220. Como control negativo, se usaron muestras de tubulina incubadas con DMSO, donde no se encontró ningún pico (no mostrado).

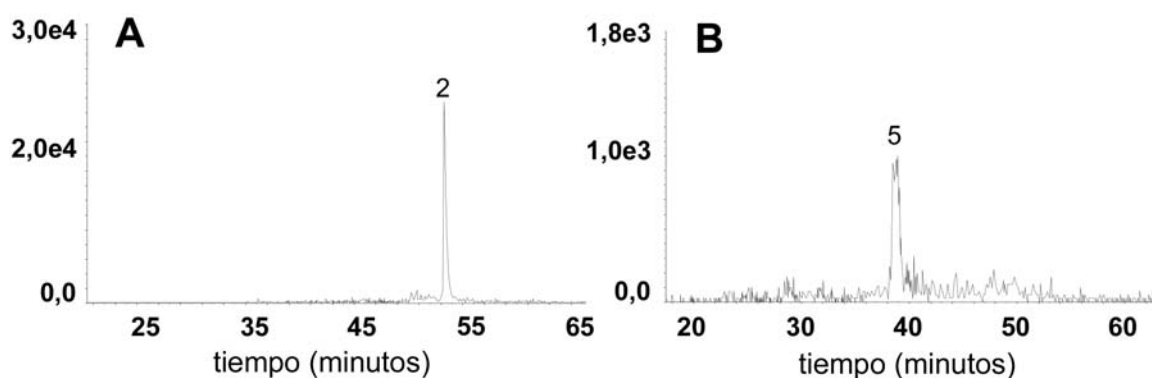


Figura 42. Análisis cromatográfico de los péptidos trípticos y quimotrípticos de las muestras de tubulina dimérica tratadas con ciclostreptina. Cromatogramas de los experimentos de rastreo múltiple de iones con alta sensibilidad (MRM). A. Muestras digeridas con tripsina. Se seleccionaron los péptidos con m/z 1017.3 Da (correspondiente al péptido tríptico número 2) que generasen el fragmento m/z 249 Da. B. Muestras digeridas con quimotripsina. Se seleccionaron los iones con m/z 637.4, 816.4 y 780.4 Da (correspondientes a los péptidos quimotrípticos 4, 5 y 6, respectivamente) que generasen el fragmento con m/z 249 Da. Sólo se detectó el ion correspondiente al pico 5, que está modificado en el residuo THR220, pero no se detectaron los iones correspondientes a los picos 4 ó 6, modificados en el residuo ASN228.

Discusión

1. Interacción de los ligandos estabilizadores de microtúbulos con la tubulina

1.1. Clasificación de los compuestos descritos como estabilizadores de microtúbulos

En el presente trabajo se ha estudiado comparativamente una buena parte de los compuestos descritos en la bibliografía como estabilizadores de microtúbulos. Basándonos en los resultados obtenidos (tabla 11), podemos establecer una primera clasificación de estos compuestos. Los compuestos 14-21 (tacalonolidas, poliésteres de jatrofano, luteína, dicumarol y lonafarnib) no son capaces de modular el ensamblaje de tubulina pura, ni de estabilizar microtúbulos en los sistemas *in vitro* ensayados en el presente trabajo. Esto sugiere que cualquier actividad estabilizadora de microtúbulos por parte de estos compuestos podría producirse por interacción con otros componentes de cualquiera de las rutas de señalización que regulan la estabilidad de los microtúbulos, pero no por una interacción directa con la tubulina.

El lonafarnib estabiliza débilmente los microtúbulos en células (figura 21). No obstante, *in vitro* tiene un efecto despolimerizador muy débil (figura 26 y tabla 5). Este efecto se podría atribuir a una unión débil a tubulina dimérica y a microtúbulos (resultados no mostrados). Recientemente, se ha descrito que el lonafarnib parece estabilizar a los microtúbulos mediante la inhibición de la histona deacetilasa 6 (HDAC6) (Marcus y col., 2005). Esta inhibición tiene como consecuencia microtúbulos hiper-acetilados y por tanto más estables (Maruta y col., 1986). Además, resultados preliminares realizados en nuestro laboratorio apuntan hacia una afinidad ligeramente mayor del taxol por microtúbulos acetilados con respecto a los deacetilados, lo que podría explicar el comportamiento sinérgico descrito previamente para el taxol y el lonafarnib (Shi y col., 2000).

Es posible también que la estabilización de microtúbulos que se ha descrito para algunos ligandos sea simplemente un artefacto experimental o que los efectos que estos ligandos producen sobre el ensamblaje de tubulina sean tan débiles que no seamos capaces de detectarlos en nuestras condiciones experimentales. Por ejemplo, es difícil entender por qué los poliésteres de jatrofano son capaces de

inducir el ensamblaje de tubulina pura en ausencia de GTP (Miglietta y col., 2003), pero no son capaces de modificar el ensamblaje de proteína microtubular (como ha sido descrito en (Miglietta y col., 2003) y en la tabla 5 de este trabajo), ni el ensamblaje de tubulina pura inducido por glicerol (figura 26), ni tampoco son capaces de estabilizar a los microtúbulos frente a la despolimerización inducida por Ca^{+2} (Miglietta y col., 2003) o por frío (figura 27). De igual manera, es difícil entender cómo el dicumarol está disminuyendo notablemente la dinámica de los microtúbulos *in vitro* (Madari y col., 2003), pero no es capaz de modular el ensamblaje de tubulina ni de aumentar la masa de polímero formado a altas concentraciones de ligando ((Madari y col., 2003) y figura 26 de este trabajo) ni de estabilizar microtúbulos frente al frío (figura 27).

Asimismo, el débil efecto de las tacalonolidas en el test de desplazamiento de flutax-2 (por centrifugación no se detecta este desplazamiento) y su débil actividad sobre los microtúbulos en células se podría explicar fácilmente por la presencia de un contaminante activo en una proporción tan baja, que dificultaría enormemente su detección con las técnicas que se han usado para caracterizarlo (HPLC, LC-MS y RMN). De hecho, si se incubaba un exceso de tacalonolida con microtúbulos, se sedimentan los microtúbulos y se recupera el exceso de tacalonolida del sobrenadante, se observa la pérdida de actividad de la tacalonolida (no mostrado). Variando la concentración de microtúbulos con respecto al exceso de tacalonolida hemos estimado la proporción de este posible contaminante activo entre 0.3-0.7%.

Dentro de los compuestos que interaccionan directamente con los microtúbulos y que son capaces de inducir o modular de alguna manera el ensamblaje de tubulina (por tanto, estabilizar microtúbulos), se pueden distinguir hasta ahora tres grupos principales:

1. Compuestos que se unen al sitio de taxol reversiblemente (taxol, docetaxel, epotilonas, dictiostatina, discodermolida, eleuterobina, sarcodictinas y el esteroide).

2. Compuestos que se unen reversiblemente al sitio de laulimalida (laurilalida y pelorusido A).
3. Compuestos que se unen al sitio de taxol irreversiblemente (ciclostreptina).

1.2. Diversidad química de los estabilizadores de microtúbulos que se unen al sitio de taxol

Es destacable la gran diversidad química de los compuestos que estabilizan microtúbulos (figura 20), incluso la de aquellos que se unen al sitio de taxol. Asimismo, el origen de estos productos es también muy variado, ya que éstos se han aislado de fuentes tan diversas como corales, esponjas marinas, bacterias o plantas. Esto sugiere que la producción de venenos que estabilizan microtúbulos es un sistema de defensa muy utilizado en la naturaleza y parece que el sitio de taxol es una diana muy extendida. Se puede aventurar que todos estos compuestos podrían estar mimetizando la acción de un regulador celular endógeno que se uniría al sitio de taxol. No obstante, en la actualidad no se conoce dicho regulador, aunque se ha sugerido que la proteína tau (una MAP) podría unirse a un sitio que solape con el de taxol, dada la homología de secuencia entre algunas de sus repeticiones y el lazo B9-B10 de la subunidad alfa de tubulina. Este lazo ocuparía un bolsillo similar al del taxol de beta tubulina (Nogales y col., 1999). De hecho, se ha descrito que la unión de la proteína tau a los microtúbulos está reducida en presencia de taxol o discodermolida (Kar y col., 2003a; Kar y col., 2003b). No obstante, estos resultados no se han podido reproducir en nuestro laboratorio (no mostrado), por lo que se deben tomar con precaución.

Es precisamente la gran variedad de compuestos con diferentes orígenes y la diversidad de estructuras químicas uniéndose a un mismo sitio en la molécula de tubulina, lo que ha dificultado enormemente la búsqueda de un farmacóforo común a todos estos compuestos, que sea de utilidad en el diseño racional de fármacos antitumorales.

Ligando	Efectos celulares		Ensamblaje de microtúbulos					Unión a MTB	
	Citotóxico	Forma haces de MTB	Inducción del ensamblaje (PEDTA)	Modulación del ensamblaje (GAB)	Estabilización de MTB frente al frío	Modulación del ensamblaje MTP	Sitio de taxol	Sitio de laulimalida	
Taxol (1)	SI	SI	SI	SI	SI	ND	SI	NO	
Docetaxel (2)	SI	SI	SI	SI	SI	ND	SI	NO	
Epotilona A (3)	SI	SI	SI	SI	SI	ND	SI	NO	
Epotilona B (4)	SI	SI	SI	SI	SI	ND	SI	NO	
Dictioestatina (5)	SI	SI	SI	SI	SI	ND	SI	NO	
Discodermolida (6)	SI	SI	SI	SI	SI	ND	SI	NO	
Eleuterobina (7)	SI	SI	SI	SI	SI	ND	SI	NO	
Sarcodictina A (8)	SI	SI (débil)	SI (muy débil)	SI	SI	ND	SI	NO	
Sarcodictina B (9)	SI	SI (débil)	SI (muy débil)	SI	SI	ND	SI	NO	
Esteroides (10)	SI	SI (débil)	SI (muy débil)	SI	SI	ND	SI	NO	
Ciclorestreptina (11)	SI	SI (débil)	SI (muy débil)	SI	SI	ND	SI (irreversible)	NO	
Laulimalida (12)	SI	SI	SI	SI	SI	ND	NO	SI	
Pelorusido A (13)	SI	SI	SI	SI	SI	ND	NO	SI	
Tacalonolida A (14)	SI (débil)	SI (débil)	NO	NO	NO	NO	NO	NO	
Tacalonolida E (15)	SI (débil)	SI (débil)	NO	NO	NO	NO	NO	NO	
P. Jatrofano A (16)	SI (débil)	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	
P. Jatrofano B (17)	SI (débil)	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	
P. Jatrofano C (18)	SI (débil)	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	
Luteína (19)	SI (débil)	NO	NO	SI (despolimerizador)	NO	NO	NO	NO	
Dicumarol (20)	SI (débil)	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	
Lonafarnib (21)	SI (débil)	NO	NO	SI (despolimerizador)	NO	SI (despolimerizador)	NO	NO	

Tabla 11. Resumen de los resultados del estudio comparativo de todos los ligandos utilizados en este trabajo.

No obstante, varios grupos han realizado esfuerzos considerables para proponer farmacóforos del sitio de taxol, principalmente comunes a taxol y epotilonas (Giannakakou y col., 2000; He y col., 2000; Ojima y col., 1999). Desafortunadamente, a pesar del esfuerzo realizado, la publicación reciente de un modelo de la estructura de la epotilona A unida al sitio de taxol ha echado por tierra estos modelos, ya que taxol y epotilona se unen a este sitio de forma única e independiente (figura 43), interaccionando con residuos diferentes de la proteína (Nettles y col., 2004).

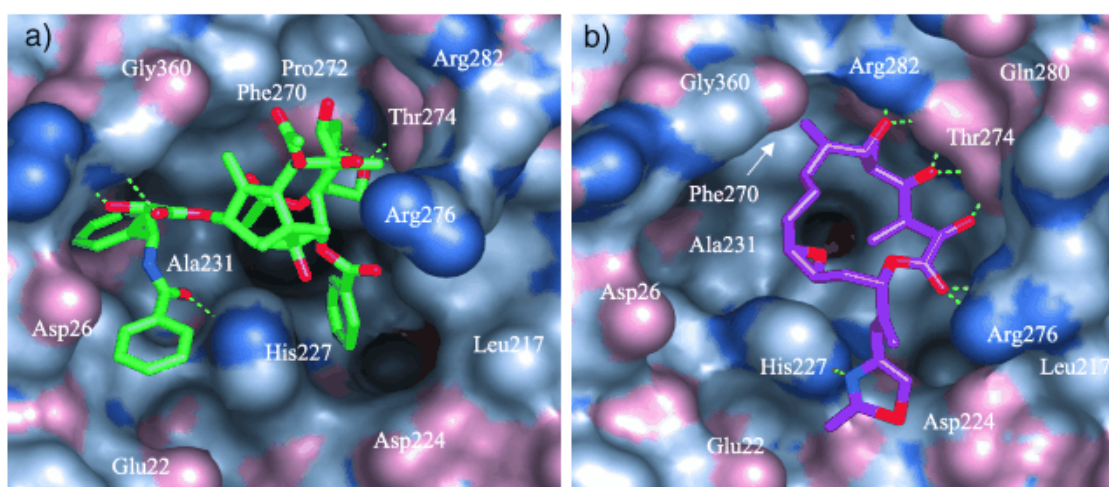


Figura 43. Representación del taxol y de la epotilona A unidos al sitio de taxol. Representación de la superficie del sitio de taxol con una molécula de taxol (a) y otra de epotilona A (b) unidas. Se aprecia cómo cada ligando aprovecha el sitio de unión de una forma diferente y los aminoácidos implicados en la unión son también diferentes. Los átomos de oxígeno de los ligandos se muestran en rojo y los puentes de hidrógeno, que los ligandos forman con la proteína, se representan con líneas verdes punteadas. Tomada de (Heinz y col., 2005).

No se puede hablar entonces de la existencia de un farmacóforo común a los ligandos del sitio de taxol, sino de un sitio promiscuo en la molécula de tubulina, donde cada ligando interacciona con un subconjunto diferente de residuos. De hecho, aunque no existen aún datos experimentales, se podría anticipar que esto ocurre también para el resto de compuestos que se unen al sitio de taxol, resultando en un desafío único para el diseño racional de ligandos (Nettles y col., 2004).

1.3. Parámetros termodinámicos de la unión de los ligandos al sitio de taxol

El estudio de la interacción entre los ligandos del sitio de taxol y los microtúbulos ha estado dificultado durante años por su mecanismo de acción; dado que estos ligandos se unen preferentemente a la forma ensamblada de tubulina induciendo el ensamblaje de microtúbulos, la unión y el ensamblaje son reacciones ligadas (Díaz y col., 1993). Debido a esto, aunque se puede ensamblar tubulina y obtener sitios de taxol vacíos en ausencia de ligandos inductores del ensamblaje a concentraciones altas de tubulina, la elevada afinidad de estos compuestos hace imposible encontrar condiciones en las que la reacción de unión (ligando-microtúbulo) no esté totalmente desplazada hacia el estado unido, haciendo muy difícil la determinación de la afinidad de estos compuestos. Es decir, como consecuencia del acoplamiento entre la unión de un ligando y el ensamblaje de microtúbulos inducido por éste, en las condiciones experimentales usuales, la unión intrínseca no puede ser aislada, impidiendo la determinación de las constantes de unión.

Por ello, para medir la afinidad de los ligandos fue necesario usar microtúbulos estabilizados (estables a bajas temperaturas y a bajas concentraciones) mediante entrecruzamiento con glutaraldehído (Andreu y Barasoain, 2001; Díaz y col., 2000). El uso de estos microtúbulos estabilizados nos permitió, por un lado, aislar la unión del ligando de la elongación del microtúbulo y, por otro, usar concentraciones lo suficientemente bajas como para que el equilibrio de unión no esté totalmente desplazado hacia el estado unido. Usando estos microtúbulos estabilizados, se consiguió medir directamente la afinidad de unión al sitio de taxol de un derivado fluorescente de éste, flutax-2 (Díaz y col., 2000) y desarrollar un método de competición para medir la afinidad de compuestos que se unen a este sitio y diferenciarlos de aquellos que no (figura 30). A partir de las constantes de afinidad a diferentes temperaturas, se pueden calcular los parámetros termodinámicos de la unión, usando las ecuaciones de van't Hoff y de Gibbs.

Al igual que el taxol, el resto de los ligandos que se unen al mismo sitio muestran una marcada dependencia de la afinidad con la temperatura (tabla 6 y

figura 44). La reacción de unión es exotérmica, y dirigida por entalpía, para todos los ligandos, es decir, la constante de afinidad disminuye a medida que aumenta la temperatura. La reacción de unión tiene una contribución entrópica negativa, desfavorable, a la energía libre de unión para el taxol, docetaxel y epotilonas A y B (tabla 6). El resto de compuestos tienen una contribución entrópica positiva (favorable) a la energía libre de unión. Esto es especialmente notable para la discodermolida, un ligando que debería tener una elevada flexibilidad conformacional en disolución dada su estructura química, pero que muestra una elevada contribución entrópica a la energía libre de unión (tabla 6).

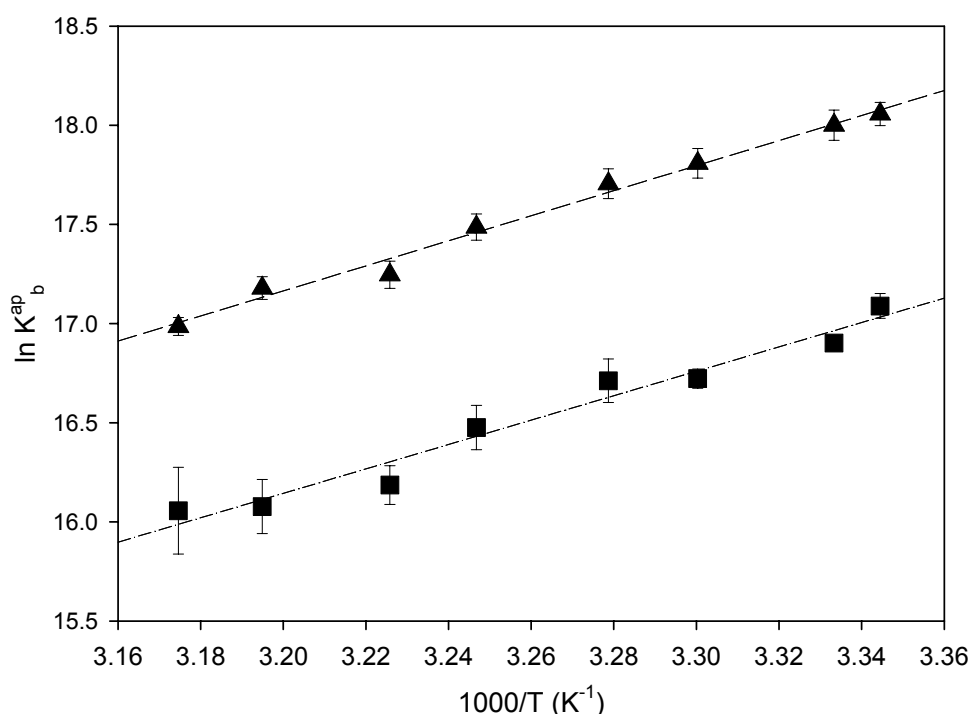


Figura 44. Representación de van't Hoff para la reacción de unión de dos ligandos del sitio de taxol. Se representan los datos (con errores estándar) para el taxol (cuadros) y el docetaxel (triángulos).

De forma interesante, si se representan la contribuciones entrópica y entálpica a la unión de los ligandos del sitio de taxol, se observa una fuerte correlación ($r^2 = 0.95$) entre estos dos parámetros (figura 45). Estos dos parámetros parecen estar fuertemente correlacionados de acuerdo con la ecuación de regresión $\Delta H = -42.48 + 398.10 \Delta S$. Esta ecuación tiene la forma $\Delta H = \beta \Delta S$ y es típica de fenómenos de compensación entálpico-entrópica (Gilli y col., 1994) con una temperatura de compensación, β , de 398 K. Algunos autores han demostrado que

una fuerte correlación entre ΔH y ΔS no es por sí misma una verdadera prueba de compensación entálpico-entrópica con causalidad química, sino que puede ser un la consecuencia artefactual de la transmisión de errores experimentales, especialmente cuando las entalpías y la entropías se estiman a partir de la variación de las constantes de equilibrio con la temperatura (Krug y col., 1976a).

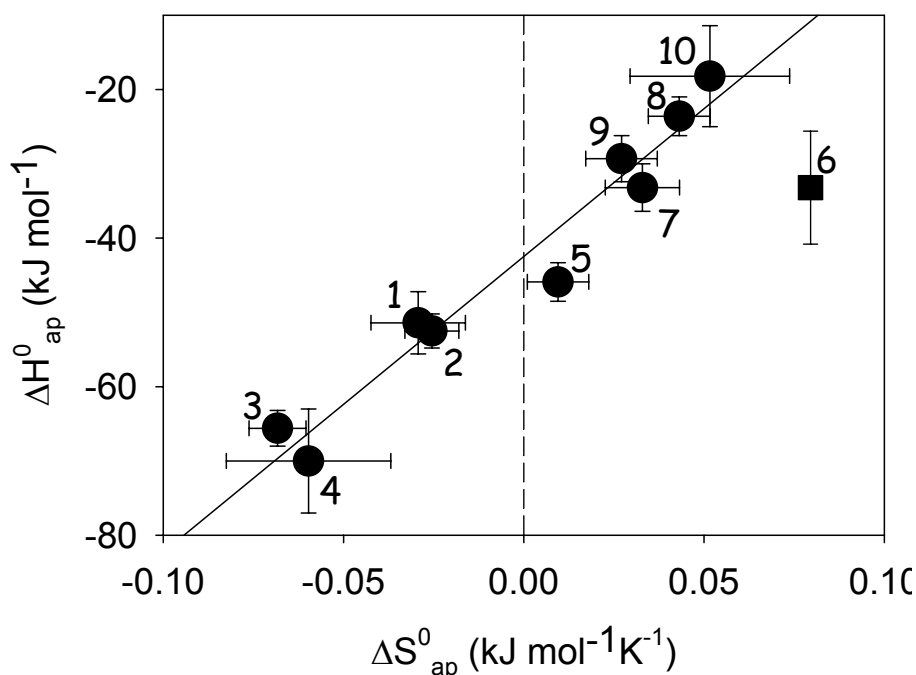


Figura 45. Correlación entre las contribuciones entálpica y entrópica aparentes, a la unión de los ligandos. Los puntos representan los datos \pm errores estándar y la línea representa la regresión lineal de los datos. El dato de la discodermolida (representada como un cuadrado) no se ha usado para la regresión.

No obstante, estos mismos autores han propuesto dos condiciones que cuando se satisfacen son suficientes (pero no necesarias) para probar la prevalencia de una causalidad química sobre la transmisión de errores; en primer lugar, la temperatura de compensación debe ser significativamente diferente al promedio de temperaturas experimentales usadas y en segundo lugar, los valores de ΔH deben correlacionarse con los valores correspondientes de ΔG (Krug y col., 1976b). En este caso, la primera condición se cumple, ya que el promedio de temperaturas experimentales es 307 K, mientras que la temperatura de compensación es 398 K; la segunda condición también se cumple ya que si representamos ΔH frente a ΔG observamos que existe correlación (r^2 0.69), si no

se consideran los datos de la discodermolida para hacer la regresión lineal (figura 46). Estos datos sugieren que la discodermolida se está uniendo de forma diferente al sitio de taxol que el resto de ligandos.

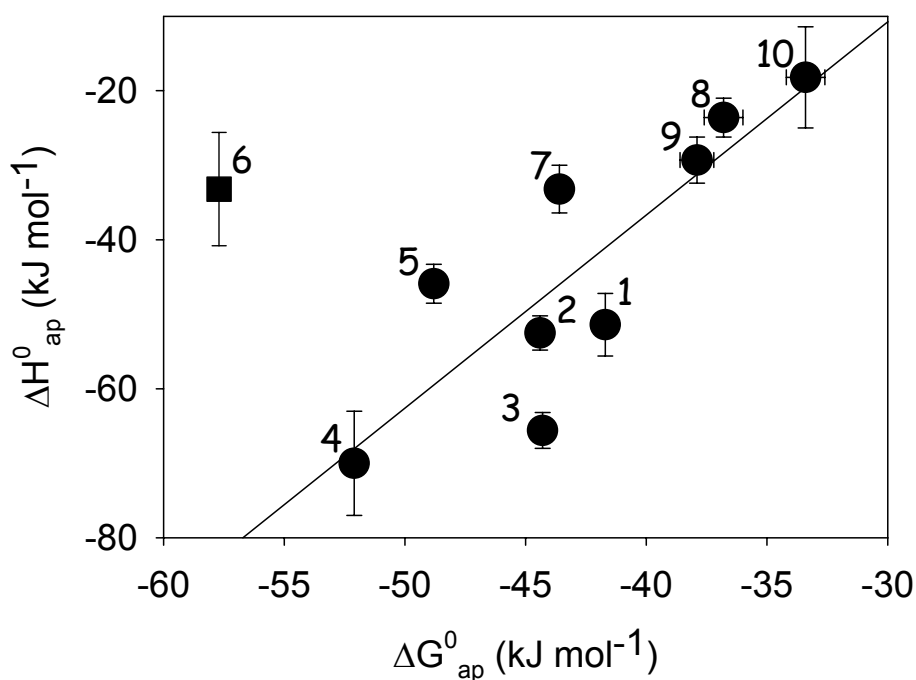


Figura 46. Correlación entre la entalpía y la energía libre de unión de los ligandos al sitio de taxol. Los puntos representan los datos \pm errores estándar y la línea representa la regresión lineal de los datos. El dato de la discodermolida (representada como un cuadrado) no se ha usado para la regresión. Los datos de energía libre se calcularon a 308 K.

Dada la diversidad de estructuras químicas de los ligandos que se unen al sitio de taxol y que cada uno de ellos se une de una forma diferente (Nettles y col., 2004), se puede sugerir que la correlación entre las contribuciones entálpica y entrópica a la energía libre de unión, se debe a una propiedad intrínseca de la unión de un ligando a una proteína en una disolución acuosa. Este tipo de relaciones se pueden observar incluso comparando los parámetros entrópico y entálpico de ligandos que se unen a diferentes proteínas (Gilli y col., 1994). Aunque la interpretación física de este fenómeno no se conoce con claridad aún, algunos autores sugieren que tanto ΔH^0 como ΔS^0 están controlados por los reordenamientos de los puentes de hidrógeno durante la unión, que es la principal

fuerza que determina la asociación de los participantes (agua, ligando y proteína) en el equilibrio de unión. Estos dos parámetros pueden estar interrelacionados siguiendo las mismas reglas extra-termodinámicas que se aplican a la formación de los puentes de hidrógeno en disolución (Gilli y col., 1994). Esta idea sencilla representa el hecho básico de que cualquier fortalecimiento de los enlaces intermoleculares (factor entálpico) está compensado por una pérdida de grados de libertad (factor entrópico) o viceversa.

1.4. Correlaciones entre la afinidad de unión y la estabilización de microtúbulos de los ligandos del sitio de taxol

Con objeto de comparar cuantitativamente el ensamblaje de tubulina inducido por estos ligandos, se exploraron las correlaciones entre esta actividad y la afinidad de unión. Resulta sencillo calcular la energía libre asociada a la adición de un dímero al extremo de un microtúbulo (elongación), ya que la constante de equilibrio de esta reacción viene dada por el inverso de la concentración crítica (Oosawa y Asakura, 1975; apartado 4 de Discusión). La comparación entre las energías libres aparentes de unión y de elongación muestra que estos dos parámetros están correlacionados (figura 47; r^2 0.58 para tubulina GTP y r^2 0.50 para tubulina GDP). No obstante, los cambios en la energía libre aparente de elongación son mucho más pequeños que los cambios en la energía libre aparente de unión (pendiente de la recta 0.30 para tubulina GTP y 0.16 para tubulina GDP). Aunque la inducción del ensamblaje y la afinidad de unión no tienen por qué estar correlacionadas, ya que corresponden a reacciones diferentes con constantes intrínsecas diferentes (ver apartado 4 de la Discusión), los resultados experimentales muestran que, de alguna manera, lo están (figura 47).

El docetaxel y la dictioestatina, que son los ligandos más potentes induciendo el ensamblaje (tabla 3), están por encima de la regresión lineal tanto para tubulina GTP como tubulina GDP. El resto de ligandos se encuentran dentro del intervalo de confianza del 95% de la regresión, mostrando una correlación significativa (figura 47), a pesar de que el número de datos disponibles es bajo.

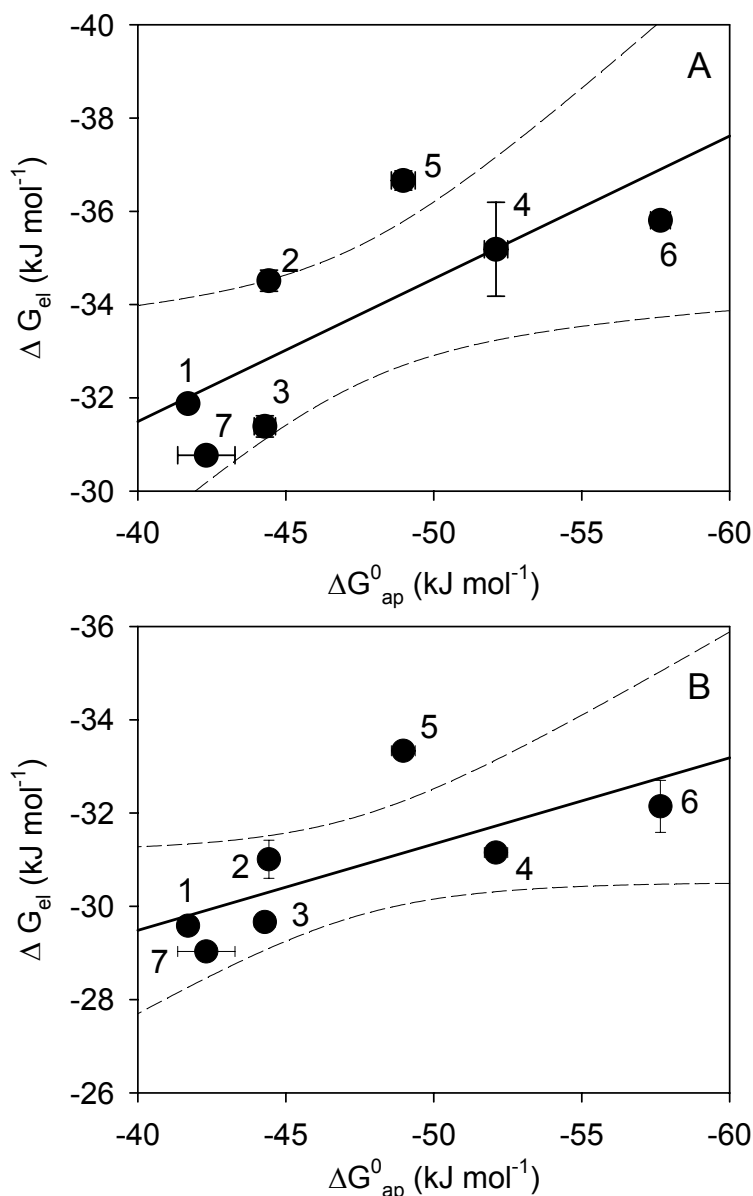


Figura 47. Comparación entre la energía libre de unión y de elongación de microtúbulos, de los ligandos del sitio de taxol. Dependencia de la energía libre de elongación del ensamblaje de tubulina GTP (panel A) o tubulina GDP (panel B), inducido por ligando, sobre la energía libre de unión de los ligandos al sitio de taxol. La línea continua representa la mejor regresión lineal y las líneas discontinuas representan los intervalos de confianza del 95% de la regresión.

1.5. Relaciones entre la termodinámica de unión de los ligandos al sitio de taxol y la citotoxicidad

Con el objetivo de encontrar parámetros útiles para la predicción de la citotoxicidad de los ligandos, se exploraron las correlaciones entre la citotoxicidad (en dos líneas celulares diferentes, 1A9 y A549), la afinidad de unión y la estabilización de microtúbulos. La figura 48A muestra una débil correlación de la citotoxicidad de los ligandos (IC_{50}) con la afinidad de unión (r^2 0.31 para células

1A9 y r^2 0.27 para células A549). Se puede observar que la discodermolida (compuesto 6) tiene mucha menor citotoxicidad de la que se espera, dada su elevada afinidad de unión (tabla 6). De hecho, si no se tiene en cuenta este ligando, la regresión lineal de los datos ΔG^0_{ap} versus IC_{50} mejora notablemente (r^2 0.44 para células 1A9 y 0.57 para células A549; figura 48A).

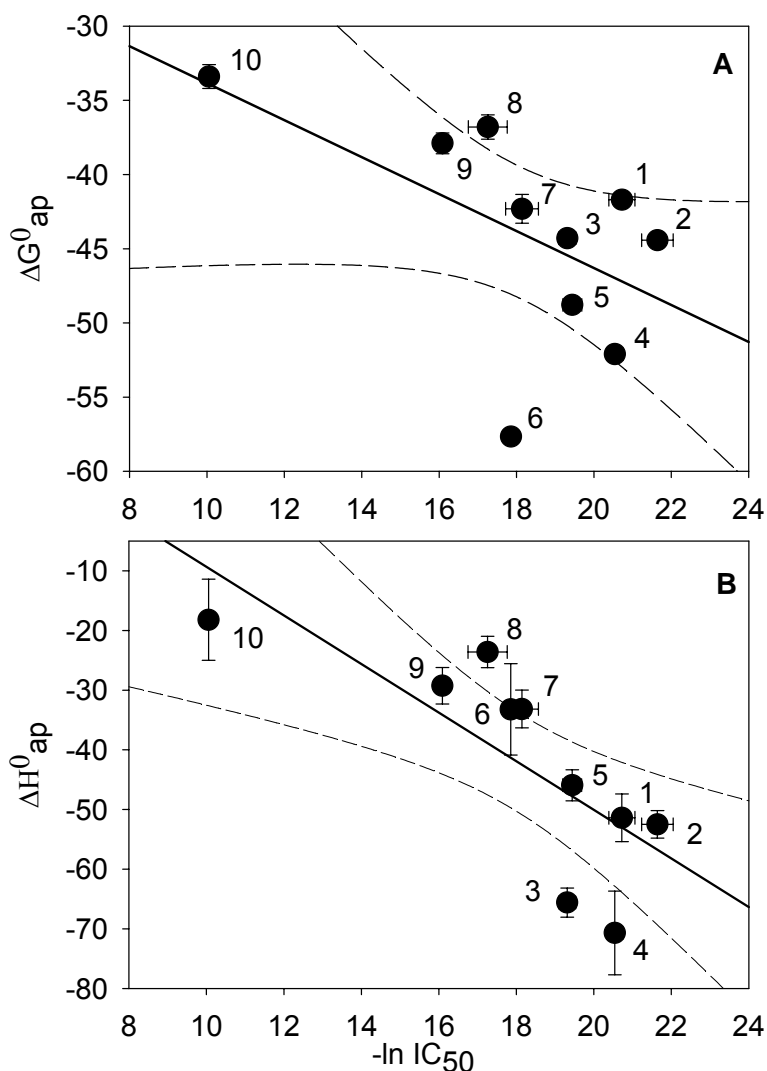


Figura 48. Comparación entre las afinidades de unión y la citotoxicidad de los ligandos del sitio de taxol, en células 1A9. A: Dependencia de las IC_{50} de los ligandos en células 1A9 de la energía libre de unión al sitio de taxol en los microtúbulos. B: Dependencia de las IC_{50} de los ligandos en células 1A9 del término entálpico de la energía libre de unión al sitio de taxol. La línea continua representa la mejor regresión lineal y las líneas discontinuas representan los intervalos de confianza del 95%.

Es interesante destacar que los ligandos más citotóxicos (1-4) son aquellos con mayor contribución entálpica aparente a la unión y con la contribución entrópica más desfavorable. De hecho, se observa que las IC_{50} de los ligandos se

correlacionan mejor con la ΔH_{ap}^0 que con la ΔG_{ap}^0 para los ligandos estudiados (figura 48B; r^2 0.58 para células 1A9 y 0.50 para células A549). Esto sugiere que el término entálpico de la energía libre de unión es un factor muy importante que se debe tener en consideración para el diseño racional de ligandos.

La afinidad de unión, expresada como el cambio de energía libre (ΔG) [$K_b = \exp(-\Delta G/RT)$] proviene de la suma de dos términos, el entálpico y el entrópico ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Obviamente, un incremento en la afinidad de unión se puede producir bien haciendo el término entálpico más negativo, o haciendo el término entrópico más positivo. De esta forma, compuestos diferentes pueden tener constantes de afinidad similares que provienen de contribuciones diferentes de los términos entálpicos o entrópicos a la energía libre de unión, pero esto se debería reflejar en la actividad de los compuestos. Ya que la entalpía de unión es el término que refleja predominantemente la fuerza de las interacciones del ligando con la proteína, relativa al disolvente (Luque y Freire, 2002), se puede sugerir que los ligandos con una elevada contribución entálpica a la unión producirán efectos más influyentes en la tubulina y esto se verá reflejado en los subsecuentes efectos estabilizadores en los microtúbulos, que van a ser la causa de la citotoxicidad de los ligandos.

Es especialmente notable que las IC_{50} de muchos de los compuestos son mucho más bajas que sus constantes de disociación (por ejemplo, en células 1A9, la IC_{50} del taxol es 1.3 nM, mientras que la K_d es 93.4 nM; tabla 9). Esto implicaría que, a menos que la concentración local en el interior de las células sea mayor que en el medio de cultivo, sólo una pequeña fracción de las moléculas de ligando estarían unidas a los microtúbulos. Se puede demostrar que a concentraciones próximas a la IC_{50} , la concentración crítica del ensamblaje de tubulina no se verá afectada por la presencia del ligando (apartado 4 de Discusión). Esto corrobora el hecho de que los ligandos del sitio de taxol, a muy bajas concentraciones, ejercen su efecto citotóxico mediante el bloqueo de la dinámica de los microtúbulos, sin aumentar la masa total de estos (Torres y Horwitz, 1998).

Otro factor que podría estar involucrado en la citotoxicidad de los ligandos es su hidrofiliidad. En principio, cuanto más hidrofílico sea un ligando, mayores

dificultades tendrá para cruzar la membrana celular por difusión pasiva, su concentración intracelular será menor y, por tanto, su citotoxicidad será menor.

Como conclusión, para el diseño racional de ligandos del sitio de taxol, se deben medir los parámetros termodinámicos de la unión del ligando y la contribución entálpica a la unión debe ser maximizada con objeto de conseguir compuestos con mejores propiedades citotóxicas.

1.6. Los ligandos del sitio de unión de laulimalida como potenciales fármacos antitumorales

Como se describió en Resultados (figura 30), ni laulimalida ni pelorusido A son capaces de desplazar al flutax-2 de su sitio en los microtúbulos, indicando que se unen a un sitio diferente al del taxol, tal y como se ha descrito previamente para laulimalida (Pryor y col., 2002). Además, se muestra que estos ligandos compiten entre sí por un mismo sitio de unión en el microtúbulo (figura 31). De forma interesante, existe sinergia entre pelorusido A/laulimalida y taxol en el ensamblaje de tubulina *in vitro*, indicando que cuando los dos sitios (taxol y laulimalida) están ocupados, la estabilización de los microtúbulos es máxima (figura 25). Este efecto sinérgico plantea la cuestión de si estos ligandos actúan también de manera sinérgica en células. Esto es especialmente interesante, ya que se han descrito varios ejemplos de sinergia en la citotoxicidad de diversos agentes que tienen como diana a la tubulina, como taxol/estramustina (Kreis y col., 1997; Speicher y col., 1992), taxol/alcaloides de la vinca (Aoe y col., 1999; Budman y Calabro, 2002; Budman y col., 2002; Budman y col., 2000; Culine y col., 1999; Giannakakou y col., 1998) o estramustina/alcaloides de la vinca (Batra y col., 1996; Kreis y col., 1997). Como ya se ha comentado anteriormente, también se ha descrito sinergia entre taxol y discodermolida (Martello y col., 2000), a pesar de que ambos ligandos compiten por el sitio de taxol (Kowalski y col., 1997a) y de que este efecto sinérgico no se ha observado *in vitro*.

Los resultados con células indican que además de ser citotóxicos a bajas concentraciones en células resistentes a taxol y a epotilonas, laulimalida y

pelorusido A son también peor sustrato para la glicoproteína P que el taxol (Gaitanos y col., 2004; Mooberry y col., 1999; Pryor y col., 2002). Estas propiedades son de gran importancia en el desarrollo de estos compuestos como antitumorales, ya que las células tumorales, durante periodos prolongados de tratamiento, desarrollan a menudo resistencias al taxol y en estos casos, estos compuestos podrían restablecer la regresión del tumor. Una ventaja potencial del pelorusido A con respecto a la laulimalida es la mayor estabilidad del primero, dado que la laulimalida se puede convertir con facilidad a isolaulimalida, con la consiguiente pérdida de actividad (Mooberry y col., 1999). Esto podría tener consecuencias en los efectos farmacocinéticos que controlen la duración de la acción de la laulimalida *in vivo*.

En resumen, el descubrimiento de estos ligandos establece una nueva perspectiva en quimioterapia, ya que laulimalida y pelorusido A pueden ser más efectivos que otros agentes estabilizadores de microtúbulos contra células que han desarrollado resistencia a taxol/docetaxel/epotilona a través de la sobreexpresión de la glicoproteína P o de mutaciones en el gen de la beta tubulina. Además, también se abre la posibilidad al uso de terapias combinadas, dado el efecto sinérgico, observado *in vitro*, de estos ligandos con taxol. No obstante, es necesario aún profundizar en el conocimiento bioquímico y estructural del sitio de unión de laulimalida, lo que ayudará a definir las características de esta nueva clase de agentes estabilizadores de microtúbulos y promover la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales que se unan a este sitio.

2. Interacción de las epotilonas con los microtúbulos

2.1. Parámetros termodinámicos de la unión de los derivados de epotilona al sitio de taxol

Para medir las afinidades de unión de los diferentes compuestos, se empleó el método de desplazamiento del flutax-2 de su sitio de unión en microtúbulos estabilizados (ver apartado 1.3 de Discusión). Los valores de las constantes de afinidad para los ligandos *cis*-(15R)-CP-py-epoA y *trans*-(15R)-CP-py-epoA no se pudieron determinar con exactitud ya que se necesitarían disoluciones de éstos mucho más concentradas, de las que no se dispone. No obstante, se puede dar una estimación de la variación de energía libre de unión de -22 y -24 kJ mol⁻¹ a 35 °C, a partir de los datos disponibles.

Al igual que para el resto de compuestos que se unen al sitio de taxol, los parámetros termodinámicos de la unión se estimaron a partir de sus constantes de afinidad medidas a diferentes temperaturas. De nuevo, se observa que las entalpías están fuertemente correlacionadas (r^2 0.90) con las entropías de unión (figura 49).

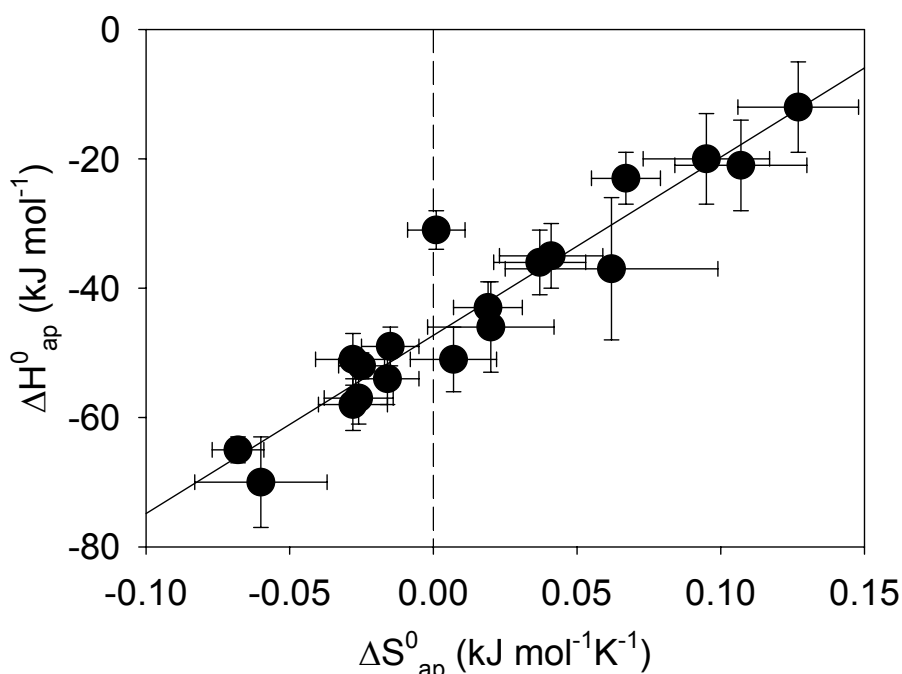


Figura 49. Representación de las contribuciones entálpica y entrópica, a la unión de los derivados de epotilona. Los puntos representan los datos \pm errores estándar y la línea representa la regresión lineal de los datos.

ΔH y ΔS están fuertemente correlacionadas siguiendo la ecuación: $\Delta H = -47.78 + 281.61 \Delta S$. No obstante, debemos tomar con precaución estos resultados, ya que la temperatura de compensación (282 K) se acerca a la temperatura promedio experimental (307 K). Además, no existe correlación entre ΔH y ΔG (figura 50). Por tanto, no se cumplen las dos condiciones, propuestas por Klug y colaboradores, para probar la prevalencia de la causalidad química sobre la causalidad matemática (Krug y col., 1976b). Aunque no necesariamente, cabe la posibilidad de que la correlación observada para las entalpías y las entropías de unión sea debida a la propagación de errores, en contraste con los datos mostrados para el resto de ligandos que se unen al sitio de taxol (apartado 1.3 de Discusión); se desconocen las causas de esta diferencia.

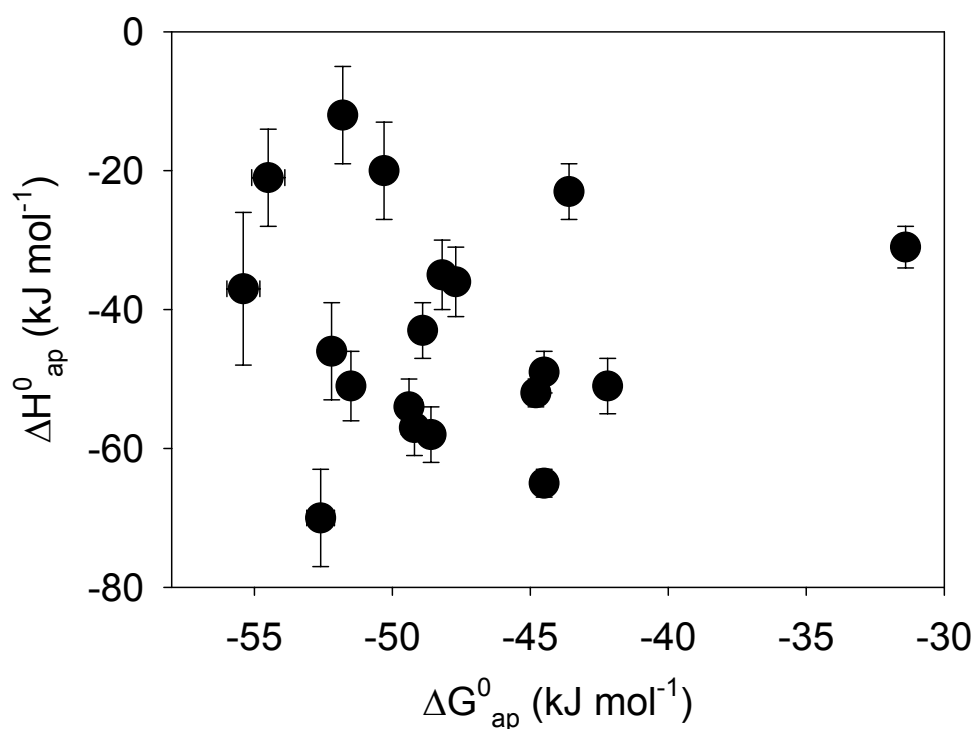


Figura 50. Representación de la entalpía frente a la energía libre de unión de los derivados de epotilona. Los puntos representan los datos \pm errores estándar y la línea representa la regresión lineal de los datos. Los datos de energía libre se calcularon a 308 K.

2.2. Relaciones estructura-afinidad y modificación de los parámetros termodinámicos debido a la modificación de los grupos químicos de la molécula

Para realizar este estudio se utilizaron un conjunto de derivados de epotilona, modificados en las posiciones 12, 15 y 21, ya que se ha descrito previamente un papel esencial de los sustituyentes y la estereoquímica de estas posiciones para la actividad (Nicolaou y col., 1998; Nicolaou y col., 2001a; Nicolaou y col., 2001b; Nicolaou y col., 2001c; Nicolaou y col., 2002; Nicolaou y col., 2003; Nicolaou y col., 2000c).

Dado que todos los derivados de epotilona se pueden relacionar entre sí por modificaciones simples en su estructura (figura 35), es posible cuantificar la contribución al incremento de energía libre de unión del grupo modificado. El cambio del incremento en energía libre asociado con la modificación del ligando A para dar el ligando B, puede ser definido como (ecuación 18):

$$\Delta\Delta G_{\text{ap}}^0(A \rightarrow B) = \Delta G_{\text{ap}}^0(B) - \Delta G_{\text{ap}}^0(A) \quad (18)$$

y de forma similar se puede cuantificar la contribución del grupo modificado al incremento de entalpía y entropía de la reacción de unión.

Recientemente, se ha publicado un modelo de la estructura tridimensional a alta resolución de la epotilona A unida a láminas de tubulina inducidas por Zn^{2+} , resuelta a través de una combinación de cristalografía de electrones y análisis conformacional basado en resonancia magnética nuclear (Nettles y col., 2004). Utilizaremos este modelo (figura 51) en esta discusión para comentar desde un punto de vista estructural los resultados bioquímicos obtenidos en el presente trabajo.

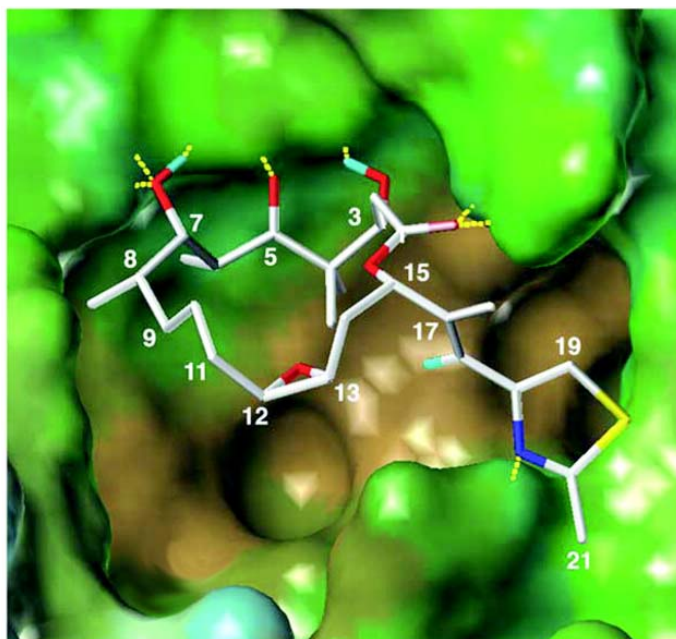


Figura 51. Representación del sitio de taxol con una molécula de epotilona A unida. El sitio de taxol está representada de tal forma que el color marrón corresponde a la superficie hidrofóbica, mientras que el verde corresponde a la superficie hidrofílica. Los puentes de hidrógeno entre la epotilona y los aminoácidos se representan con líneas punteadas amarillas. El esqueleto hidrocarbonado de la epotilona se representan en blanco, el átomo de nitrógeno en azul, el átomo de azufre en amarillo, los átomos de oxígeno en rojo y algunos átomos de hidrógeno en azul claro. Tomada de (Nettles y col., 2004).

2.2.1. Modificaciones en la estereoquímica del C15

La epimerización del centro quiral del carbono 15 desde el epímero S hasta el R, resulta en compuestos de baja afinidad, $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{4}\rightarrow\mathbf{17}) \approx +27 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{7}\rightarrow\mathbf{18}) \approx +27 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{14}\rightarrow\mathbf{16}) = +17.8 \text{ kJ mol}^{-1}$ (denominando cada transformación con los números del compuesto original y del resultante; figura 35 y tabla 8), sugiriendo que la cadena lateral, en la posición que adopta tras la epimerización, no es capaz de unirse al sitio, ya que no forma interacciones con el bolsillo hidrofóbico de la proteína, con la consecuente pérdida de entalpía de unión ($\Delta\Delta H_{\text{app}}^0(\mathbf{14}\rightarrow\mathbf{16}) = 26 \text{ kJ mol}^{-1}$).

Estos resultados demuestran que la estereoquímica de este carbono es crítica para la unión de las epotilonas al sitio de taxol; C15 ha de estar en configuración S para que el ligando sea activo. Modelos moleculares construidos a partir de la estructura de epotilona A determinada por difracción de rayos X (Höfle y col., 1996) demuestran que con el C15 en configuración S, la cadena lateral está aproximadamente en el plano del anillo de epotilona, mientras que si el C15

está en configuración R, la cadena lateral es perpendicular a este plano. No obstante, debemos tener presente que esta interpretación no tiene en cuenta la estructura unida a tubulina, sino aquella del ligando libre. Según el modelo de Nettles y colaboradores (Nettles y col., 2004), el fragmento de la molécula de epotilona C10-C15 estaría plegado por debajo del macrociclo. Con C15 en configuración S, la cadena lateral se situaría de forma que se pueden establecer contactos favorables entre la cadena lateral y los residuos del sitio de unión en la proteína; especialmente, el nitrógeno de la cadena lateral actuaría como aceptor de protones de la His227 (figura 52). Si el C15 cambiara a la posición R, la cadena lateral de la epotilona se desplazaría hacia fuera del bolsillo hidrofóbico, desfavoreciendo en gran medida la unión del macrociclo y por tanto disminuyendo fuertemente la afinidad por el sitio, tal y como se puede observar en los resultados mostrados.

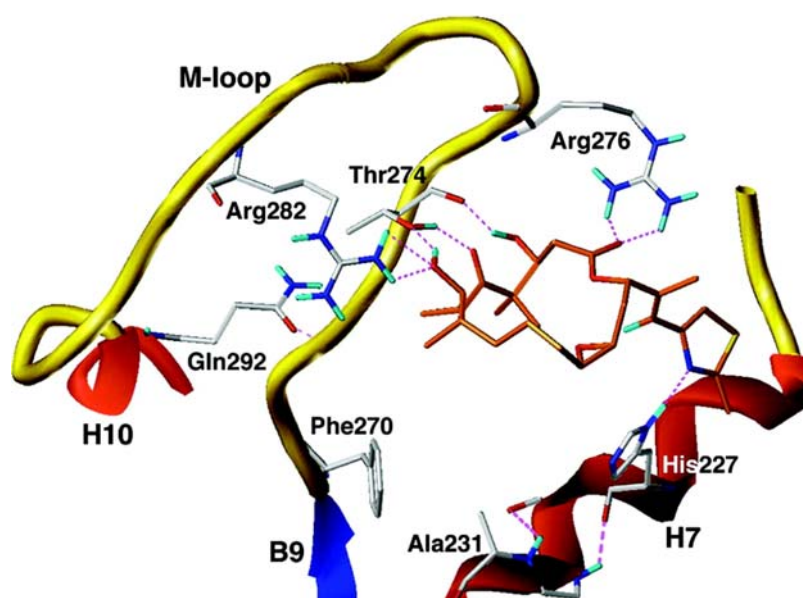


Figura 52. Representación simplificada del sitio de taxol con una molécula de epotilona A unida. Los puentes de hidrógeno de la epotilona A con los diferentes residuos de la subunidad de beta tubulina se representan en líneas discontinuas de color morado. En puente de hidrógeno que se forma entre la cadena lateral y la HIS227, no podría existir con una configuración C15R. Tomada de (Nettles y col., 2004).

Es interesante mencionar que también se observa una pérdida de afinidad cuando la estereoquímica del C13 se cambia desde la conformación S a la R, como ocurre en las epotilonas ciclopropil-C13R, que se obtuvieron como consecuencia de

un resultado no esperado en el proceso de síntesis de *cis*-CP-epotilona A (compuesto **14**) (Nicolaou y col., 1998; Nicolaou y col., 2001b). Estos ligandos son inactivos, probablemente porque esta modificación situará la cadena lateral en una posición similar a aquella ocupada por la cadena lateral de los compuestos C15R (**16**, **17** y **18**).

2.2.2. Modificaciones de la cadena lateral en C15

Se estudiaron dos grupos diferentes de cadena lateral, tiazol y piridina. De los cuatro ejemplos estudiados, la modificación fue favorable en dos casos, neutra en otro y desfavorable en un último caso, dependiendo de la estereoquímica de los carbonos C12 y C15. Con C12 y C15 en su configuración natural *S*, la sustitución de tiazol por piridina fue prácticamente neutra, $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{14}\rightarrow\mathbf{4}) = -0.2 \text{ kJ mol}^{-1}$. En el modelo estructural de unión propuesto por Nettles y colaboradores (Nettles y col., 2004) el nitrógeno del anillo de tiazol participa en un puente de hidrógeno con la HIS 227 de la proteína. Esta parece ser la razón por la que Nicolaou y colaboradores encontraron que los compuestos de piridina con el nitrógeno en posición *orto* (con respecto al conector de la cadena lateral) son mucho más efectivos que aquellos en los que el nitrógeno se encuentra en las posiciones *meta* o *para* (Giannakakou y col., 2000; Nicolaou y col., 2001b), indicando que sólo la posición *orto* es favorable para la formación de este puente de hidrógeno. De nuestros resultados se deduce además que la posición que adoptará la cadena lateral de piridina ha de ser idéntica a la que adopta el anillo de tiazol, ya que el intercambio de ambas cadenas laterales mantiene la afinidad de unión constante.

Esta misma modificación es favorable cuando C12 se encuentra la configuración *R*: $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{5}\rightarrow\mathbf{7}) = -2.9 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{6}\rightarrow\mathbf{8}) = -2.1 \text{ kJ mol}^{-1}$. El incremento en la afinidad de unión se debe al término entrópico, ya que la contribución entálpica es desfavorable. Esto sugiere que el incremento en la afinidad no se ve favorecido por la formación de nuevas interacciones sino porque la reorganización de las moléculas del disolvente es entrópicamente favorable.

No obstante, cuando el C15 está en su conformación R, la introducción de una cadena lateral más grande resulta en una pérdida de afinidad, $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{16}\rightarrow\mathbf{17}) = +9.4 \text{ kJ mol}^{-1}$. Como se ha discutido anteriormente, los compuestos C15R situarían la cadena lateral desplazada hacia fuera, mirando hacia el disolvente, lo que sugiere que la introducción de una cadena lateral más larga en estos análogos resultará en una pérdida de afinidad aún mayor.

2.2.3. Cambio del sustituyente del C21

Se estudiaron tres grupos diferentes de sustituyentes (metil, hidroximetil y tiometil) para el C21 de la cadena lateral. El efecto de estos sustituyentes en la unión del ligando al sitio de taxol depende de tipo de cadena lateral en la que se situen:

1. Para la cadena lateral de tiazol, se sustituyó el grupo metilo por tiometilo. Este cambio resultó favorable en los tres casos estudiados, independientemente de la configuración del C12: $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{2}\rightarrow\mathbf{3}) = -2.8 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{5}\rightarrow\mathbf{10}) = -5.9 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{6}\rightarrow\mathbf{11}) = -3.6 \text{ kJ mol}^{-1}$. En los tres casos, el análisis de los parámetros termodinámicos reveló un cambio desfavorable de la entalpía, compensado por un incremento favorable de entropía, pasando de una reacción de unión dirigida entálpicamente, a estar dirigida entrópicamente. Estos resultados están en concordancia con el modelo estructural propuesto (figura 51) (Nettles y col., 2004) en el que el grupo tiometilo se ajustaría en un pequeño bolsillo, poco profundo, donde sustituyentes más voluminosos tendrían problemas estéricos, tal y como demuestran resultados experimentales previos (Nicolaou y col., 2003). No obstante, el hecho de que la reacción esté favorecida entrópicamente nos sugiere que el incremento en la afinidad de unión no se ve favorecido por interacciones del grupo metilo, sino porque la reorganización de las moléculas del disolvente es entrópicamente favorable.

2. Cuando la cadena lateral es un anillo de piridina (estando el C12 en conformación R), la misma modificación (metil por tiometil) resulta en una pérdida en la afinidad de unión: $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{8}\rightarrow\mathbf{12}) = +2.6 \text{ kJ mol}^{-1}$. Siguiendo el modelo de

Nettles y colaboradores (Nettles y col., 2004), el grupo tiometilo ha de situarse en la pequeña oquedad poca profunda que antes ocupaba el metilo y esto, de alguna forma, obligaría al nitrógeno del anillo a adoptar una situación menos favorable para formar puente de hidrógeno con la HIS 227. Esto no ocurría en el caso de la cadena lateral de tiazol, ligeramente menos voluminosa.

3. El cambio del grupo metil por el grupo hidroximetil en la cadena lateral de piridina produjo un efecto ligeramente desfavorable, $\Delta\Delta G_{35^\circ C}(\mathbf{12}\rightarrow\mathbf{13}) = +4.1 \text{ kJ mol}^{-1}$; en este caso, el incremento desfavorable en la entalpía, $\Delta\Delta H_{ap}(\mathbf{12}\rightarrow\mathbf{13}) = 13 \text{ kJ mol}^{-1}$, no está compensado con el incremento favorable en la entropía, $\Delta\Delta S_{ap}(\mathbf{12}\rightarrow\mathbf{13}) = 30 \text{ kJ mol}^{-1}\text{K}^{-1}$.

Es interesante destacar que los compuestos que tienen una cadena lateral tiometil-tiazol son los análogos de epotilona con mayor afinidad de todos los estudiados: *cis*-CP-tmt-epotilonaB ($\Delta G_{35^\circ C}(\mathbf{19}) = -60.8 \text{ kJ mol}^{-1}$), tmt-epotilonaB ($\Delta G_{35^\circ C}(\mathbf{3}) = -55.4 \text{ kJ mol}^{-1}$) y *trans*-CP-tmt-epotilonaA ($\Delta G_{35^\circ C}(\mathbf{10}) = -54.5 \text{ kJ mol}^{-1}$).

2.2.4. Modificaciones en el C12

El efecto en la afinidad del cambio en la estereoquímica del C12 depende de la cadena lateral unida al C15 y de los sustituyentes del C12:

1. Análogos de epotilona A, es decir donde el sustituyente del C12 es H:

1a. si la cadena lateral es tiazol no se observa cambio en la afinidad, $\Delta\Delta G_{35^\circ C}(\mathbf{14}\rightarrow\mathbf{5}) = 0.6 \text{ kJ mol}^{-1}$.

1b. si la cadena lateral es piridina, el cambio tiene un efecto favorable, $\Delta\Delta G_{35^\circ C}(\mathbf{4}\rightarrow\mathbf{7}) = -2.1 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta\Delta G(\mathbf{17}\rightarrow\mathbf{18}) \approx -2 \text{ kJ mol}^{-1}$.

2. Análogos de epotilona B, es decir donde el sustituyente del C12 es un grupo metilo: la modificación es desfavorable tanto para la cadena lateral de tiazol, $\Delta\Delta G_{35^\circ C}(\mathbf{19}\rightarrow\mathbf{11}) = +9.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ como para la cadena lateral de piridina, $\Delta\Delta G_{35^\circ C}(\mathbf{20}\rightarrow\mathbf{8}) = +1.9 \text{ kJ mol}^{-1}$. En este caso, la contribución entálpica es tan desfavorable que la contribución favorable entrópica no basta para compensarla.

Dado que no disponemos de datos estructurales de la unión de los compuestos con C12R, no podemos especular acerca del efecto que estas modificaciones tendrían en la unión del ligando desde un punto de vista estructural.

2.2.5. Sustitución del grupo epóxido

Otra modificación química que se examinó es la sustitución del grupo epóxido de la molécula de epotilona A por un grupo cicloalquilo. La introducción de un grupo ciclopropilo incrementa la afinidad de unión: $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{1}\rightarrow\mathbf{14}) = -4.7 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{3}\rightarrow\mathbf{19}) = -5.4 \text{ kJ mol}^{-1}$. No obstante, el incremento del tamaño del anillo cicloalquilo, que sustituye al grupo epóxido, resulta en una pérdida de afinidad. Así, cuando se sustituyó el grupo ciclopropilo por el grupo ciclobutilo, el resultado fue desfavorable, $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{5}\rightarrow\mathbf{15}) = +4.1 \text{ kJ mol}^{-1}$. El descenso de la afinidad se debe a un desfavorecimiento en la entalpía que no puede ser compensado por el favorecimiento entrópico que causa la introducción de un grupo más hidrofóbico.

Dado que en el modelo propuesto (Nettles y col., 2004), el grupo epóxido está apuntando hacia el interior de la proteína, se sugiere que la sustitución del grupo epóxido por el grupo ciclopropilo colocaría a este último en una posición favorable para establecer interacciones hidrofóbicas con la superficie del bolsillo, que también es hidrofóbico en esa región, justo debajo del epóxido (figura 51). La introducción de un grupo más voluminoso impediría cualquier interacción por razones estéricas, desfavoreciendo entálpicamente la unión.

2.2.6. Introducción de un grupo metilo en C12

Esta modificación ocurre en la epotilona B, con respecto a la epotilona A, e incrementa de forma muy notable la afinidad cuando el carbono 12 se encuentra en configuración S ($\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{1}\rightarrow\mathbf{2}) = -8.1 \text{ kJ mol}^{-1}$) con beneficios moderados en los términos entálpico y entrópico de la energía libre de unión. La modificación también es favorable en el otro ejemplo estudiado ($\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{4}\rightarrow\mathbf{20}) = -1.8 \text{ kJ mol}^{-1}$). En esta configuración del C12, la orientación plegada del anillo de epóxido dirige el sustituyente de C12 hacia la superficie hidrofóbica del bolsillo, que acepta

fácilmente grupos hidrofóbicos (Nettles y col., 2004), favoreciendo de esta forma posibles interacciones hidrofóbicas.

El resto de ejemplos estudiados tienen el C12 en posición R y en todos estos casos la modificación es desfavorable, resultando en una ligera pérdida de la afinidad de unión ($\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{5}\rightarrow\mathbf{6}) = +0.4 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{7}\rightarrow\mathbf{8}) = +1.2 \text{ kJ mol}^{-1}$, $\Delta\Delta G_{35^\circ\text{C}}(\mathbf{10}\rightarrow\mathbf{11}) = +2.7 \text{ kJ mol}^{-1}$). El efecto de estas modificaciones en los parámetros termodinámicos es un incremento en la entalpía de unión que no está compensado por un incremento en la entropía, siendo el resultado neto desfavorable. No obstante, dado que no disponemos de datos estructurales de la unión de los compuestos con C12R, no podemos especular acerca del efecto que estas modificaciones tendrían en la unión del ligando desde un punto de vista estructural.

2.2.7. Resumen del estudio de estructura-actividad de epotilonas

Aparte de la modificación natural de la epotilona A para formar la epotilona B, consistente en la introducción de un grupo metilo en C12S en la molécula de epotilona A, las modificaciones más satisfactorias en cuanto a afinidad de unión son la introducción del grupo tiometilo en C21, como sustituyente del anillo tiazol y el intercambio del anillo de epóxido por un grupo ciclopropilo (figura 53). Sorprendentemente, el resultado de la introducción del grupo tiometilo en C21 conlleva un cambio completo en los parámetros termodinámicos de la unión, convirtiendo una reacción dirigida por entalpía (la unión de los compuestos **1**, **2**, **5**, **14**, **15** y **16**, es decir todos los compuestos con cadena lateral metil-tiazol, excepto el compuesto **6**, tienen una contribución entrópica desfavorable a la energía libre de unión) en otra conducida por entropía (la unión de los compuestos **3**, **10** y **11**, es decir aquellos con cadena lateral tiometil-tiazol, tienen una contribución entrópica favorable). Esto sugiere que el incremento en la afinidad de unión no se debe a la formación de nuevas interacciones, sino a la reorganización de las moléculas del disolvente, que debe ser un proceso entrópicamente favorable. También puede ocurrir, que ciertos cambios en la superficie hidrofóbica del ligando, en

determinados puntos, mejoren la unión mediante el favorecimiento de determinadas interacciones hidrofóbicas. Un ejemplo de esto es la sustitución de la cadena lateral de tiazol por piridina (que es favorable, compuestos **7** y **8**, o neutra si el C12 se encuentra en configuración S; compuesto **4**). El incremento en la afinidad de unión resulta de un efecto similar a aquel producido por la introducción de un grupo tiometilo como sustituyente en el anillo de tiazol; esto es, el incremento de la contribución entrópica compensa el ligero decrecimiento de la contribución entálpica a la energía libre de unión.

El cambio en la estereoquímica del C12 desde S a R tiene también un efecto entrópico favorable, lo que sugiere que dicho cambio puede involucrar la reorganización de moléculas de agua.

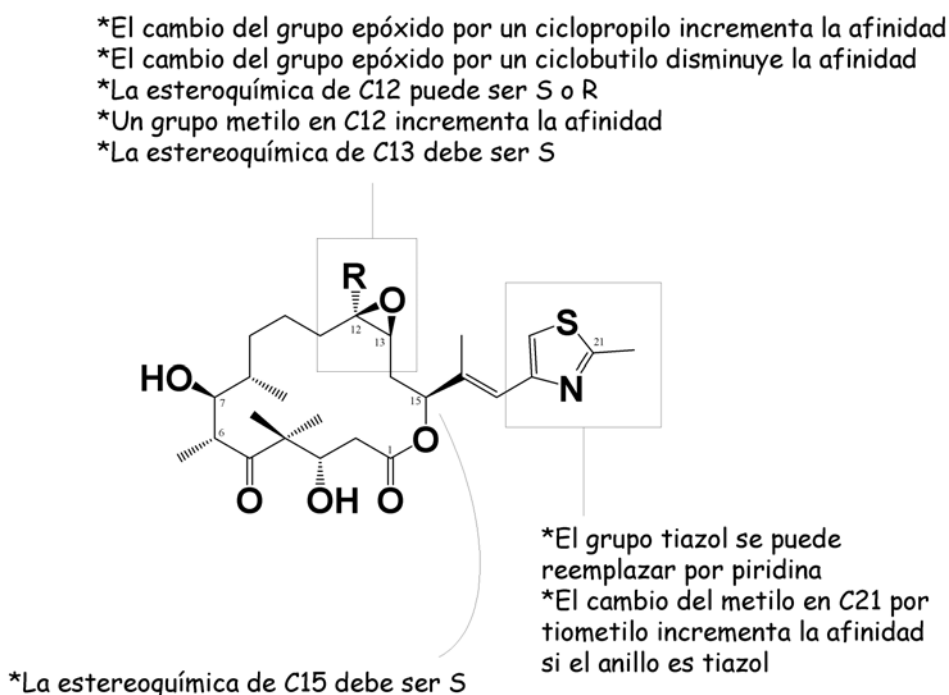


Figura 53. Esquema-resumen de las relaciones estructura-actividad para la unión a microtúbulos de análogos de epotilonas modificados en C12, en C15 y en la cadena lateral. Tomado de (Kingston, 2004).

Además, el efecto de estas modificaciones es aditivo, dentro del error experimental. Por ejemplo, el ligando con mayor afinidad por el sitio de taxol (cis-CP-tmt-EpoB, compuesto n° **19**) tiene las tres modificaciones químicas (un grupo ciclopropilo en lugar del epóxido, un grupo tio-metilo en C21 y un sustituyente metilo en C12), y la estereoquímica más favorables (C12S, C13S y C15S). Realizando

estas tres modificaciones a la molécula de epotilona A (compuesto **1**), nos resulta el compuesto **19**, con una diferencia de energía libre de unión, $\Delta\Delta G_{ap}^0$ (**1** \rightarrow **19**) de -16.3 kJ mol⁻¹. Este valor es muy similar al que se obtiene si sumamos los valores medios obtenidos para las tres contribuciones por separado (tabla 8), -14.1 kJ mol⁻¹, teniendo en cuenta el amplio margen de error experimental de estas medidas.

2.3. Correlaciones entre afinidades de unión y estabilización de microtúbulos de los derivados de epotilona

Al igual que se hizo para comparar cuantitativamente el ensamblaje de tubulina inducido por los diferentes ligandos de sitio de taxol (apartado 1.4 de Discusión), se exploraron las correlaciones entre esta actividad y la afinidad de unión. La comparación entre las energías libres de unión y de elongación indica que existe correlación (figura 54; r^2 0.76) entre estos dos parámetros, aunque los cambios en la energía libre aparente de elongación son mucho más pequeños aquellos en la energía libre aparente de unión (pendiente 0.40). Los análogos que estabilizan los microtúbulos de forma más potente a lo que cabría esperar, dada su afinidad (es decir, los que están por debajo de la mejor regresión lineal) son los compuestos **5** y **14** (los dos enantiómeros *cis-trans* de CP-epoA) y **8** y **20** (los dos enantiómeros *cis-trans* de CP-py-epoB), además del docetaxel. Por otro lado, los análogos **10** y **13** se encuentran significativamente por encima de la mejor regresión lineal (figura 15).

Es interesante destacar que los compuestos que contienen el grupo tiometilo como sustituyente de la cadena lateral tienden a estar por encima de la mejor regresión lineal, como es el caso de los compuestos **10**, **11**, **12**, **13** y **19**.

Al igual que se ha descrito previamente para el resto de ligandos del sitio de taxol, existe una buena correlación entre la afinidad de unión y la estabilización de microtúbulos, a pesar de que la inducción del ensamblaje y la afinidad de unión no han de estar necesariamente relacionadas, ya que son reacciones diferentes con constantes intrínsecas de equilibrio diferentes, k_{el2} y K_{bin1} , respectivamente (ver apartado 4 de la Discusión). De cualquier forma debemos destacar que las propiedades químicas que son más efectivas incrementando la afinidad de unión no

son necesariamente las mismas que mejoran la capacidad para inducir el ensamblaje.

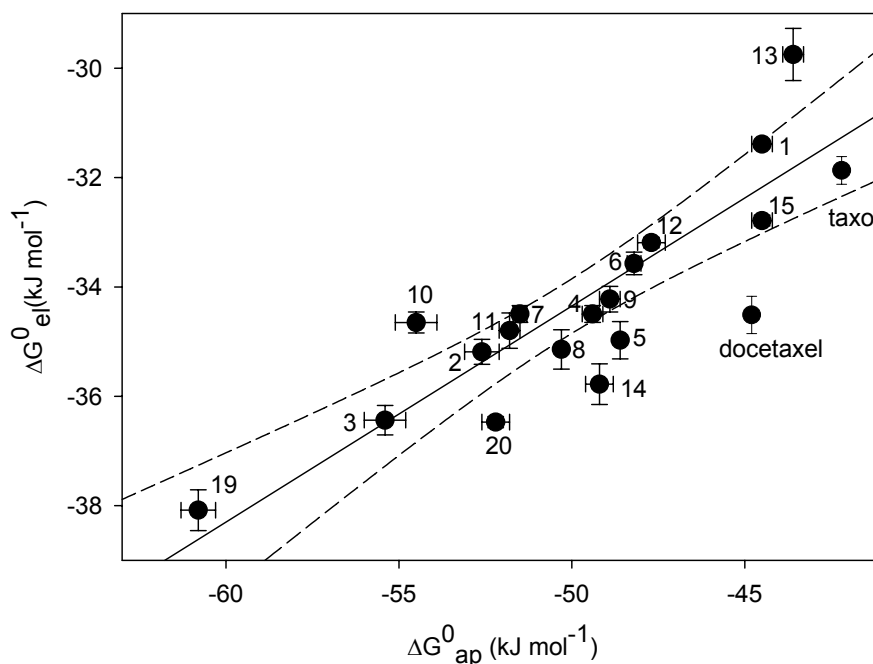


Figura 54. Dependencia de la constante de elongación del ensamblaje inducido por ligando, de la constante de unión de los análogos de epotilona al sitio de taxol en microtúbulos estabilizados. Los datos de taxol y docetaxel no se han usado para la regresión lineal. Las líneas continuas representan la mejor regresión lineal para los datos experimentales y las líneas discontinuas representan los intervalos de confianza del 95% de la regresión.

2.4. Correlación entra afinidades de unión y citotoxicidad de los derivados de epotilona

Al igual que hizo para el resto de ligandos del sitio de taxol, con el objetivo de encontrar parámetros capaces de predecir la citotoxicidad de los derivados de epotilona, se exploraron las correlaciones entre la afinidad de unión, la estabilización de microtúbulos y la citotoxicidad. La figura 55 muestra la correlación entre las IC_{50} de los ligandos en células 1A9 (una línea celular humana de carcinoma de ovario) y las respectivas constantes de unión (r^2 0.76; figura 55A). Los datos de citotoxicidad y afinidad para los derivados de epotilona se enumeran en la tabla 9. Este comportamiento es similar al observado para el resto de ligandos que se unen al sitio de taxol (si no se considera la discodermolida), por lo que estos resultados sugieren que la afinidad de unión es un parámetro importante involucrado en la citotoxicidad.

En base a estas actividades, se pueden distinguir dos grupos de compuestos; los compuestos **1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 14, 15, 16** y **20** (además de taxol y docetaxel) tienen un cociente citotoxicidad/afinidad mayor que los compuestos **6, 10, 11, 12, 13** y **19**.

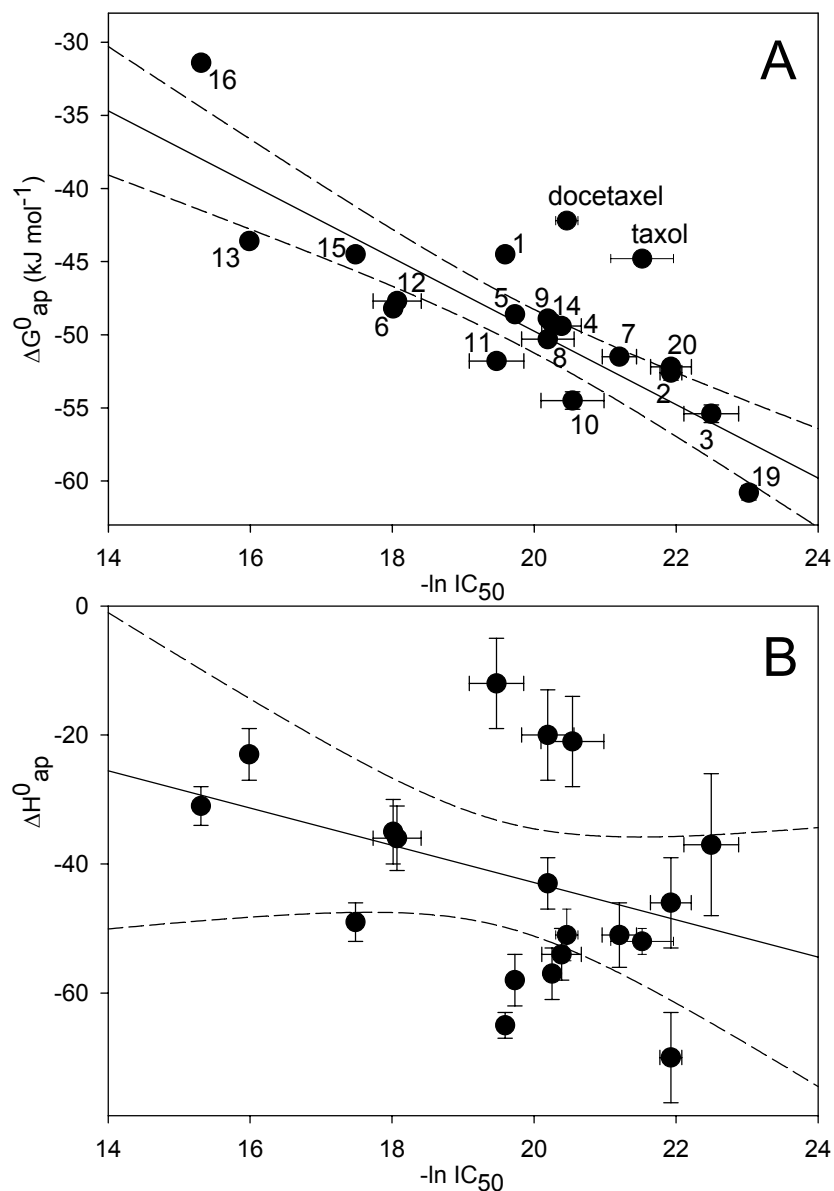


Figura 55. Comparación entre la afinidad de unión y la citotoxicidad de los derivados de epotilona en células 1A9. A. Comparación entre las afinidades de unión y la citotoxicidad de los análogos de epotilona en células humanas de carcinoma de ovario 1A9. Los datos del taxol y docetaxel no se han usado para la regresión lineal. B. Comparación entre el componente entálpico de la energía libre de unión de los derivados de epotilona y su citotoxicidad en células 1A9. La línea continua representa la mejor regresión lineal. Los datos de taxol y docetaxel no se han usado para la regresión lineal.

Entre estos últimos compuestos se incluyen cinco de los seis compuestos que contienen el grupo tiometilo como sustituyente en la cadena lateral. El primer

grupo de compuestos tiene una IC_{50} 2-3 veces más baja que sus constantes de disociación (que es el inverso de la constante de afinidad o asociación, $K_{dis} = 1/K_{bin1}$), mientras que el segundo grupo de compuestos tiene valores de IC_{50} que son aproximadamente el doble de sus constantes de disociación (tabla 9). Así, este último grupo de compuestos es aproximadamente cinco veces menos efectivo matando células tumorales que el primero.

Es interesante destacar que todos los compuestos de este último grupo tienen una elevada contribución entrópica a la energía libre de unión. Por otro lado, los dos compuestos naturales, epotilona A y B, que son los dos ligandos con menor entalpía de unión aparente ($\Delta H_{ap} = -65 \pm 2$ y -70 ± 7 kJ mol⁻¹ respectivamente), son los ligandos con el cociente citotoxicidad/ afinidad más elevado ($IC_{50}/K_{dis} = 11$ y 5.3 respectivamente). Esto sugiere que las modificaciones que incrementan el componente entálpico de la energía libre de unión generarán compuestos con una citotoxicidad incrementada con respecto a modificaciones que incrementen el componente entrópico. Esta misma conclusión se ha descrito para el resto de ligandos del sitio de taxol estudiados en este trabajo, aunque en el caso de los derivados de epotilona la correlación entre el componente entálpico de la energía libre de unión y la citotoxicidad es mucho más baja (r^2 0.12; figura 55B).

3. Predicción de la citotoxicidad de ligandos a través de la determinación de los parámetros termodinámicos de unión al sitio de taxol

La capacidad de predicción de los parámetros termodinámicos de la unión de los ligandos al sitio de taxol se ha estudiado en dos grupos de compuestos: un primer grupo de compuestos comprende a los elementos más representativos de la mayoría de los grupos de ligandos, químicamente no relacionados, que se unen al sitio de taxol y otro segundo grupo de ligandos, químicamente relacionados, comprende un conjunto de derivados de epotilona.

La correlación entre las energías libres de unión de los ligandos del sitio de taxol, químicamente no relacionados, y sus citotoxicidades es débil, aunque mejora notablemente si no se considera la discodermolida. De cualquier forma, el término entálpico de la energía libre de unión se correlaciona mejor con la citotoxicidad de los ligandos (incluyendo la discodermolida), sugiriendo un papel fundamental de este parámetro en la citotoxicidad de los ligandos del sitio de taxol. Estos resultados son sorprendentes, ya que se desconoce la concentración de los ligandos en el equilibrio, su metabolismo o si existe otra diana u otro sitio de unión en el interior de las células.

De forma similar, para los derivados de epotilona, químicamente relacionados, se encuentra una buena correlación entre las citotoxicidades y las energías libres de unión. Además, los ligandos con términos entálpicos de unión elevados son notablemente más citotóxicos que los ligandos con términos entrópicos elevados, a pesar de que no se observa una buena correlación entre las ΔH_{ap}^0 y las IC_{50} de estos derivados.

Como conclusión, si se quieren conseguir ligandos del sitio de taxol con elevada citotoxicidad, se debería aumentar su energía libre de unión maximizando la contribución entálpica.

Aunque existe correlación entre ΔG_{el}^0 y las IC_{50} para todos los ligandos del sitio de taxol estudiados, esto puede ser la consecuencia trivial de la correlación entre las energías libres de unión y de elongación, discutida previamente. De cualquier forma, existen varias razones para escoger la determinación de las

afinidades de unión (y/o sus parámetros termodinámicos) frente a la determinación de las concentraciones críticas, como herramienta más útil para predecir citotoxicidades en el diseño racional de ligandos. En primer lugar, a las concentraciones próximas a la IC_{50} , la concentración libre de ligando dentro de las células debe ser del orden de nM (no debe confundirse con la concentración total de ligando en la célula, que debe ser mayor, ya que los ligandos se acumulan en las células debido a su unión a los microtúbulos celulares (Yvon y col., 1999)). Estas concentraciones son demasiado bajas para inducir la estabilización de microtúbulos y/o aumentar la masa total de polímero *in vitro*. Se puede demostrar que la concentración crítica aparente del ensamblaje inducido por ligando no debería verse afectada a concentraciones tan bajas de ligando. Esto implica que el efecto del ligando a esas concentraciones no debería notarse en la estabilización de los microtúbulos, sino en la dinámica de éstos.

En segundo lugar, las constantes de disociación son del mismo orden de magnitud que las IC_{50} de los ligandos y los cambios en la afinidad de unión se reflejarán en cambios muy similares en la IC_{50} , mientras que las concentraciones críticas son tres órdenes de magnitud mayores que las IC_{50} . Por lo tanto, grandes diferencias en citotoxicidad se verán reflejadas en cambios muy pequeños de la concentraciones críticas.

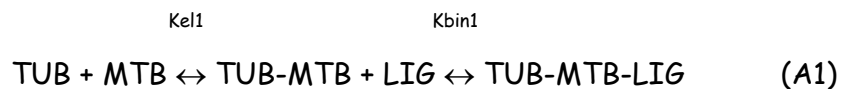
Por último, desde el punto de vista práctico, la determinación de las concentraciones críticas requiere manipulaciones bioquímicas de una proteína lábil, mientras que la determinación de las constantes de afinidad de unión de varios ligandos se pueden medir en una placa de 96 pocillos usando microtúbulos estabilizados, mucho más estables que la proteína por sí misma.

4. Mecanismos de ensamblaje inducido por ligando

El ensamblaje de tubulina en ausencia de ligandos es una polimerización por condensación nucleada no covalente caracterizada por un comportamiento cooperativo y la existencia de una concentración crítica (C_r), por debajo de la cual no existe formación de grandes polímeros (Díaz y col., 1993). Se puede demostrar que la constante aparente de equilibrio de la reacción de crecimiento del polímero, es decir, la adición de un protómero al polímero es, en buena aproximación, igual al recíproco de la concentración crítica, $K_p = C_r^{-1}$ (Oosawa y Asakura, 1975), lo que permite calcular el cambio de energía libre aparente del ensamblaje realizando un único experimento.

No obstante, el ensamblaje inducido por ligando es una situación más compleja en la que existe una concentración crítica aparente que depende de la concentración de ligando (Díaz y Andreu, 1993). De esta manera, el ensamblaje de tubulina puede proceder por dos mecanismos diferentes:

A. mecanismo facilitado por ligando (la elongación precede a la unión; ecuación A1), es decir, que la unión de un dímero de tubulina al polímero crea un nuevo sitio de unión de alta afinidad para el ligando

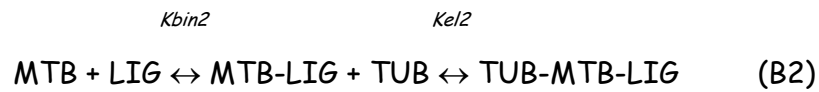


B. mecanismo mediado por ligando (la unión precede a la elongación), que a su vez puede ocurrir de dos formas diferentes.

B1. El ligando se une a tubulina no ensamblada y el dímero con el ligando unido tiene una afinidad mayor por el microtúbulo (ecuación B1), con lo que la concentración crítica del ensamblaje decrece.



B2. La unión del ligando a los extremos del microtúbulo incrementa la afinidad del siguiente dímero por el microtúbulo (ecuación B2).



Ambos mecanismos de ensamblaje mediado por ligando son termodinámicamente equivalentes y por tanto, las ecuaciones B1 y B2 son también termodinámicamente equivalentes.

Resolviendo las ecuaciones de la ley de acción de masas para las reacciones previamente descritas, se puede calcular cómo depende la constante aparente de elongación-unión de cada una de las constantes individuales de unión y de elongación para ambos mecanismos (facilitado o mediado por ligando).

Si la reacción procede mediante el *mecanismo facilitado por ligando*, la constante de elongación aparente (que es igual al inverso de la concentración crítica) debe depender linealmente de la concentración libre de ligando (ecuación A2).

$$K^{ap}_{el} = K_{el1} (1 + K_{bin1} [\text{LIGANDO}]) \quad (\text{A2})$$

De esta forma, el poder inductor de ensamblaje de un ligando debería ser directamente proporcional a la constante de unión, independientemente del efecto específico que el ligando cause en la tubulina.

Si la reacción procede mediante el *mecanismo mediado por ligando*, la concentración crítica aparente debe saturar con la concentración de ligando (ecuación B3).

$$K^{ap}_{el} = K_{el2} K_{bin2} \frac{[\text{LIGANDO}]}{(1 + K_{bin2} [\text{LIGANDO}])} \quad (\text{B3})$$

De esta manera, la concentración crítica medida dependerá de la constante de elongación del dímero-ligando, que será dependiente del efecto específico que el ligando empleado cause tras su unión a la molécula de tubulina.

Otra posibilidad de mecanismo de ensamblaje sería que los dos mecanismos descritos previamente funcionaran a la vez; en este caso, la concentración crítica aparente saturará de acuerdo con la siguiente ecuación (AB):

$$K^{ap\ el} = K_{el2} K_{bin2} \frac{[LIGANDO] + \frac{1}{K_{bin1}}}{(1 + K_{bin2} [LIGANDO])} \quad (AB)$$

En la práctica, dado que las concentraciones de ligando necesarias para inducir el ensamblaje son $\approx 10^{-6}$ M y $1/K_{bin}$ es del orden de 10^{-7} - 10^{-9} M, el término $1/K_{bin}$ puede ser despreciado y de esta forma, la ecuación AB es equivalente a B3.

La concentración crítica del ensamblaje inducido por epotilona (figura 32) y por taxol, satura con la concentración libre de ligando (figura 5 de (Díaz y col., 1993)), siguiendo el comportamiento descrito en la ecuación B3, es decir, siguiendo un *mecanismo mediado por ligando*.

Debido a que la unión del ligando y el ensamblaje inducido por ligando son reacciones ligadas, no podemos realizar medidas de unión a bajas concentraciones de ligando. No obstante, las concentraciones críticas en presencia de cantidades supra-estequiométricas de epotilona A calculadas de los datos de la figura 32 y representadas en la figura 56 (círculos negros) siguen un comportamiento de saturación, tal y como se ha discutido anteriormente.

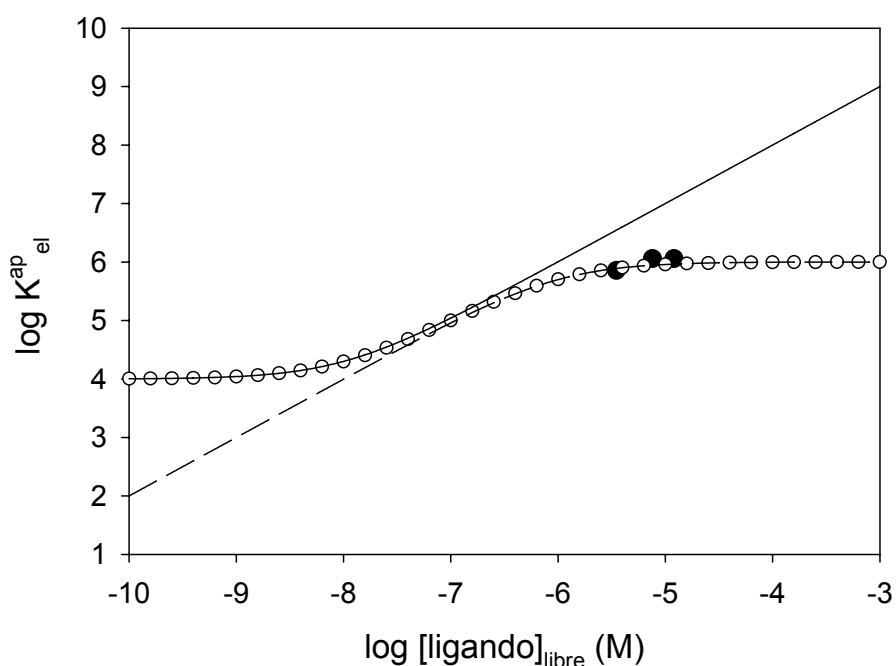


Figura 56. Dependencia de la concentración crítica aparente del ensamblaje inducido por ligando, con la concentración de ligando libre. La línea continua representa una simulación para el caso de un mecanismo de *ensamblaje facilitado por ligando*, la línea discontinua el caso de *ensamblaje mediado por ligando* y los puntos blancos representan la simulación de ambos mecanismos a simultáneamente. Las constantes de elongación y de unión empleadas fueron: constante de elongación de tubulina si ligando $K_{el} 10^{-4} M^{-1}$, constante de afinidad del ligando a microtúbulos ensamblados $K_{bin1} 10^8 M^{-1}$; constante de unión del ligando a tubulina no ensamblada $K_{bin2} 10^6 M^{-1}$; constante de elongación de tubulina con ligando unido $K_{el2} 10^6 M^{-1}$. Los círculos sólidos representan las concentraciones críticas aparentes de tubulina GTP en tampón PEDTA7-1mM GTP incubados con distintas concentraciones supra-estequiométricas de epotilona A. Los datos experimentales proceden de la figura 32.

Se podría argumentar que una pequeña fracción de tubulina inactiva se podría desviar del comportamiento lineal predicho de la ecuación A2. No obstante, ya que las concentraciones críticas de los análogos de epotilona más potentes son mucho más bajas que las de las epotilonas A y B, el comportamiento saturante no puede deberse a esta pequeña fracción inactiva de proteína. De cualquier forma, para confirmar esto, se realizaron experimentos en tampones con bajas concentraciones de magnesio, en los que las concentraciones de tubulina soluble (no polimerizada) en el sobrenadante son mayores que las concentraciones de proteína polimerizada. De nuevo, se observó un comportamiento saturante en estos experimentos.

Este comportamiento sugiere, por un lado que el ensamblaje inducido por epotilonas procede por un *mecanismo mediado por ligando* y por otro, que el

mecanismo de ensamblaje facilitado por ligando es irrelevante desde el punto de vista termodinámico, ya que no contribuye al cambio de energía libre total de la reacción de ensamblaje y por tanto se puede considerar despreciable. Se puede deducir de la ecuación AB que la concentración crítica medida en condiciones de saturación, que son las condiciones experimentales que se usan normalmente, corresponde a $1/K_{el2}$.

Aunque en un principio, K_{bin2} y K_{el2} no tienen por qué estar necesariamente relacionadas, ya que son reacciones diferentes con constantes de equilibrio diferentes (ecuación B2), los datos experimentales muestran que, de alguna manera, lo están (figuras 47 y 54), ya que las energías libres de unión y de elongación están correlacionadas (r^2 0.58 y 0.76, respectivamente). El hecho experimental de que K_{el2} dependa de K_{bin2} , se podría explicar si el ligando unido al extremo del polímero, interaccionara de alguna forma con el siguiente protómero que se une al polímero, durante la elongación de éste, de forma que la presencia del ligando proporcione energía adicional a la reacción de elongación.

Como resumen, los resultados mostrados previamente sugieren que las epotilonas inducen el ensamblaje de tubulina por un mecanismo mediado por ligando, de una forma similar a como lo hace el taxol.

5. Mecanismos de unión de ligandos al sitio taxol

Como ya se ha descrito en Resultados, la ciclostreptina se une covalentemente al sitio de taxol, bloqueando la unión de los ligandos de este sitio. La ciclostreptina no es el primer ligando que se une covalentemente a tubulina y modula su ensamblaje, ya que la pironetina se une covalentemente a la LYS352 de la subunidad alfa, bloquea la unión de vinblastina e inhibe el ensamblaje de los dímeros de tubulina (Usui y col., 2004). De cualquier forma, la ciclostreptina es el primer ligando que estabiliza microtúbulos uniéndose covalentemente a éstos.

En el presente trabajo, utilizando la interacción covalente de la ciclostreptina con el sitio de taxol, hemos obtenido evidencias experimentales directas del mecanismo de unión de los ligandos al sitio de taxol, corroborando la existencia de un sitio de taxol, previamente propuesto, en el exterior de los microtúbulos, al que el taxol se une antes de internarse al interior del microtúbulo (Díaz y col., 2003; Díaz y col., 2005; Díaz y col., 2000). Este sitio de taxol en la pared externa de los microtúbulos, ha sido previamente propuesto para explicar los datos cinéticos de la unión de análogos fluorescentes de taxol (flutax) a los microtúbulos. Esta cinética es muy rápida y la velocidad de unión está limitada por difusión y no se corresponde con un sitio de unión en el interior de los microtúbulos (Díaz y col., 2003; Díaz y col., 2000). Además, la unión del taxol en el interior de los microtúbulos es totalmente incompatible con la formación de complejos terciarios flutax-anticuerpo-microtúbulo que han sido recientemente descritos (Díaz y col., 2005), lo que implica necesariamente la unión del flutax a un sitio externo accesible desde el exterior de los microtúbulos. Se ha propuesto que este sitio externo estaría situado en el poro de tipo I (Díaz y col., 2003), muy próximo al sitio de taxol en el interior de los microtúbulos y que los residuos de 214, 220, 221 y 222 de la subunidad beta de la tubulina podrían formar parte de éste (figura 57).

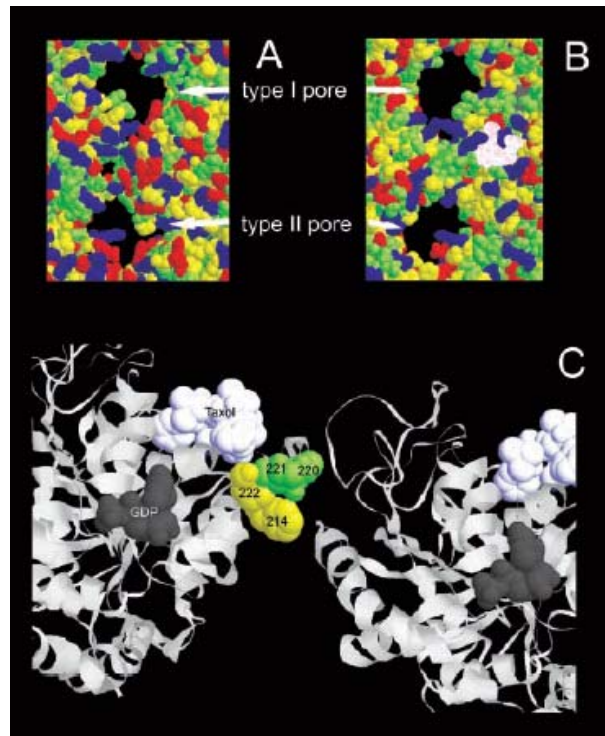


Figura 57. Representación del poro de tipo I en los microtúbulos. Vista de la superficie exterior e interior (A y B, respectivamente) de un modelo de microtúbulo a alta resolución (Chacon y Wriggers, 2002), mostrando los dos tipos diferentes de poros en la pared de un microtúbulo (tipo I y tipo II). Las bolas verdes representan los residuos polares; las bolas amarillas representan los residuos hidrofóbicos; las bolas rojas representan los residuos ácidos; las bolas azules representan los residuos básicos y las bolas blancas representan al taxol unido en el sitio interno. Panel C. Detalle del poro de tipo I visto desde arriba. Representación de dos subunidades beta de dos protofilamentos adyacentes, vistas desde el "extremo +" del microtúbulo. Taxol, GDP y los cuatro residuos que forman el sitio externo posible de taxol se representan como esferas de van der Waals. Tomado de (Díaz y col., 2003).

Los resultados mostrados en el presente trabajo muestran a la ciclostreptina unida tanto al sitio interno como al posible sitio externo de los microtúbulos. Esta es la primera evidencia directa de un segundo sitio de unión en el exterior de los microtúbulos y esto sugiere un posible mecanismo de unión de ligandos al sitio de taxol de, al menos, dos etapas. Un primer paso consistiría en la unión del ligando al sitio externo en el microtúbulo, accesible desde fuera, que explicaría la cinética de unión extremadamente rápida del flutax (Díaz y col., 2003; Díaz y col., 2000). Una segunda etapa involucraría la traslocación del ligando hacia el sitio interno, presumiblemente, mediante cambios en los residuos del poro de tipo I.

En el caso de la ciclostreptina, primero se observaría la unión al sitio externo y una vez unido allí, se pueden dar dos reacciones: la modificación

covalente del residuo THR220 en el sitio externo o la traslocación hacia el sitio en el interior del microtúbulo. Una vez en el sitio interno, la ciclostreptina podría modificar covalentemente el residuo ASN228 (figura 58).

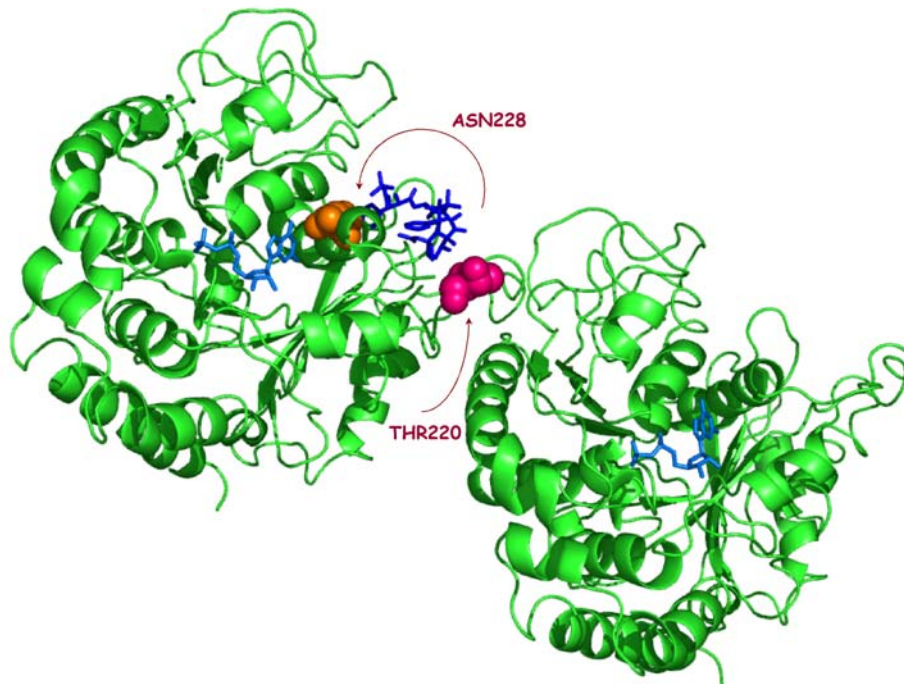


Figura 58. Esquema del mecanismo propuesto para la unión de la ciclostreptina al sitio de taxol. Representación de dos subunidades de beta tubulina de dos protofilamentos adyacentes, vistas desde el "extremo +" del microtúbulo. Para construir esta figura se ha empleado el modelo de microtúbulos a alta resolución descrito en (Li y col., 2002). Los residuos que se modifican covalentemente se representan como esferas de van der Waals: THR220 en color magenta y ASN228 en color naranja. El GDP y el taxol, unido al sitio interno, están coloreados de azul claro y azul oscuro, respectivamente. Las flechas representan esquemáticamente el modelo de dos etapas propuesto para la unión de la ciclostreptina al sitio interno de taxol.

Dado que sólo se puede unir una molécula de taxol por dímero de tubulina, ambos sitios han de ser mutuamente excluyentes, es decir la unión de un ligando en el sitio interno impide la unión de ligandos al sitio externo, posiblemente porque ambos sitios comparten elementos comunes. No obstante, la unión de un ligando al sitio externo sería suficiente para inducir el ensamblaje y la estabilización de microtúbulos (Díaz y col., 2003).

Adicionalmente, la ciclostreptina, a diferencia del taxol, es capaz de unirse irreversiblemente a tubulina dimérica, no polimerizada, pero sólo al sitio externo, lo que implica necesariamente que este sitio de taxol debe existir en la tubulina

dimérica antes de formarse el microtúbulo y una vez formado. Por el contrario, el sitio interno sólo existe en el polímero. Esto tiene importantes implicaciones, ya que se ha propuesto que el taxol induce el ensamblaje de tubulina polimerizada por unión preferencial a la forma polimerizada de la tubulina (ver apartado 4.2.1.1 de Introducción), siendo imposible detectar la unión del ligando a tubulina no polimerizada (Díaz y col., 1993). Por el contrario, la ciclostreptina es capaz de unirse tanto a la tubulina dimérica como a los microtúbulos y por tanto, no existe esa unión preferencial a los microtúbulos, con lo que no hay un desplazamiento del equilibrio hacia la forma polimerizada. Esto está en perfecta concordancia con la débil actividad inductora/moduladora del ensamblaje de tubulina del ligando (tabla 3), a pesar de su elevada citotoxicidad y su alta afinidad aparente por el sitio de taxol (Edler y col., 2005).

Aunque no es posible cuantificar la unión de la ciclostreptina a los sitios interno y externo de taxol, se puede proponer que el sitio externo (que existe tanto en la tubulina no polimerizada como en el polímero) es de baja afinidad, mientras que el sitio interno (que sólo existe en la forma polimerizada de tubulina) es de alta afinidad. De esta forma, no es posible detectar la unión del taxol a tubulina no polimerizada, debido a la baja afinidad del sitio externo. Cuando en el microtúbulo existe un segundo sitio de alta afinidad (sitio interno), la unión aparente del taxol está favorecida por la unión final al sitio de alta afinidad. Al contrario de lo que ocurre con el taxol, es posible detectar ciclostreptina unida al sitio externo de baja afinidad porque su unión es irreversible.

Conclusiones

1. Los compuestos: tacalonolidas A y E, poliésteres de jatrofano A, B y C, luteína, dicumarol y lonafarnib, descritos previamente como agentes estabilizadores de microtúbulos, no poseen tal actividad en sistemas experimentales *in vitro* de tubulina pura.
2. La laulimalida y el pelorusido A compiten por el mismo sitio de unión en los microtúbulos, y éste es diferente al de taxol.
3. Los ligandos del sitio de taxol y de laulimalida tienen efectos sinérgicos en la estabilización de microtúbulos.
4. La afinidad de unión de ligandos al sitio de taxol está correlacionada con la concentración crítica de tubulina del ensamblaje inducido por ligando.
5. La entalpía libre aparente de unión de un ligando al sitio de taxol predice su citotoxicidad.
6. Las epotilonas estabilizan microtúbulos por un mecanismo mediado por ligando, de forma similar a como lo hace el taxol.
7. Del estudio de las relaciones estructura-actividad en la molécula de epotilona se puede concluir:
 - 7a. Los carbonos 13 y 15 deben tener estereoquímica S para maximizar la unión, mientras que la estereoquímica del carbono 12 puede ser S o R.
 - 7b. La sustitución del grupo epóxido por un anillo ciclopropano favorece la unión, pero la sustitución por un anillo ciclobutano desfavorece la unión.
 - 7c. La sustitución del grupo metilo del carbono 21 por un grupo tio-metilo favorece la unión.
 - 7d. El anillo tiazol de la cadena lateral se puede sustituir por un anillo piridina sin apenas pérdida de afinidad.

7e. La sustitución del grupo metilo del carbono 21 por un grupo tiometilo favorece la unión si el anillo de la cadena lateral es tiazol.

7f. La introducción de un grupo metilo en el carbono 12 aumenta la afinidad si la estereoquímica de este carbono es S.

7g. Los efectos de estas modificaciones sobre los parámetros termodinámicos son aditivos dentro del error experimental.

8. La constante de afinidad aparente de unión está correlacionada con la concentración crítica del ensamblaje inducido por epotilonas.

9. La energía libre aparente de unión de las epotilonas al sitio de taxol está correlacionada con su citotoxicidad.

10. Las modificaciones en la molécula de epotilona que incrementan el componente entálpico de la energía libre aparente de unión, generan compuestos con una citotoxicidad mayor que aquellas modificaciones que incrementan el componente entrópico.

11. La ciclostreptina interacciona con los microtúbulos y los estabiliza a través de la unión irreversible al sitio de taxol y esta unión bloquea irreversiblemente la unión de ligandos al sitio de taxol.

12. La interacción de la ciclostreptina con los microtúbulos implica la modificación covalente de los residuos THR220 o ASN228, siendo el primero accesible y el segundo inaccesible desde el exterior de los microtúbulos.

13. La interacción de la ciclostreptina con la tubulina dimérica no ensamblada implica la modificación covalente del residuo THR220.

Bibliografía

Adam, G. C., Vanderwal, C. D., Sorensen, E. J. y Cravatt, B. F. (2003). (-)-FR182877 is a potent and selective inhibitor of carboxylesterase-1. *Angew Chem Int Ed Engl* *42*, 5480-5484.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J. M., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. (1989). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing *New York & London*.

Aldaz, H., Rice, L. M., Stearns, T. y Agard, D. A. (2005). Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human gamma-tubulin. *Nature* *435*, 523-527.

Altmann, K. H. (2003). Epothilone B and its analogs - a new family of anticancer agents. *Mini Rev Med Chem* *3*, 149-158.

Amos, L. y Klug, A. (1974). Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *J Cell Sci* *14*, 523-549.

Amos, L. A. y Lowe, J. (1999). How Taxol stabilises microtubule structure. *Chem Biol* *6*, R65-69.

Anderson, H. J., Coleman, J. E., Andersen, R. J. y Roberge, M. (1997). Cytotoxic peptides hemiasterlin, hemiasterlin A and hemiasterlin B induce mitotic arrest and abnormal spindle formation. *Cancer Chemother Pharmacol* *39*, 223-226.

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

Andreu, J. M., Bordas, J., Díaz, J. F., Garcia de Ancos, J., Gil, R., Medrano, F. J., Nogales, E., Pantos, E. y Towns-Andrews, E. (1992). Low resolution structure of microtubules in solution. Synchrotron X-ray scattering and electron microscopy of taxol-induced microtubules assembled from purified tubulin in comparison with glycerol and MAP-induced microtubules. *J Mol Biol* *226*, 169-184.

Andreu, J. M., Díaz, J. F., Gil, R., de Pereda, J. M., Garcia de Lacoba, M., Peyrot, V., Briand, C., Towns-Andrews, E. y Bordas, J. (1994). Solution structure of Taxotere-induced microtubules to 3-nm resolution. The change in protofilament number is linked to the binding of the taxol side chain. *J Biol Chem* *269*, 31785-31792.

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

Bibliografía

Aoe, K., Kiura, K., Ueoka, H., Tabata, M., Matsumura, T., Chikamori, M., Matsushita, A., Kohara, H. y Harada, M. (1999). Effect of docetaxel with cisplatin or vinorelbine on lung cancer cell lines. *Anticancer Res* *19*, 291-299.

Bai, R., Cichacz, Z. A., Herald, C. L., Pettit, G. R. y Hamel, E. (1993). Spongistatin 1, a highly cytotoxic, sponge-derived, marine natural product that inhibits mitosis, microtubule assembly, and the binding of vinblastine to tubulin. *Mol Pharmacol* *44*, 757-766.

Bai, R., Pettit, G. R. y Hamel, E. (1990). Dolastatin 10, a powerful cytostatic peptide derived from a marine animal. Inhibition of tubulin polymerization mediated through the vinca alkaloid binding domain. *Biochem Pharmacol* *39*, 1941-1949.

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

Balog, A., Meng, D., Kamenecka, T., Bertinato, P., Su, D. S., Sorensen, E. J. y Danishefsky, S. J. (1996). Total synthesis of (-)-Epothilone A. *Angew Chem* *35*, 28012803.

Batra, S., Karlsson, R. y Witt, L. (1996). Potentiation by estramustine of the cytotoxic effect of vinblastine and doxorubicin in prostatic tumor cells. *Int J Cancer* *68*, 644-649.

Bissery, M. C., Guenard, D., Gueritte-Voegelein, F. y Lavelle, F. (1991). Experimental antitumor activity of taxotere (RP 56976, NSC 628503), a taxol analogue. *Cancer Res* *51*, 4845-4852.

Bocca, C., Gabriel, L., Bozzo, F. y Miglietta, A. (2002). Microtubule-interacting activity and cytotoxicity of the prenylated coumarin ferulenol. *Planta Med* *68*, 1135-1137.

Bocca, C., Gabriel, L., Bozzo, F. y Miglietta, A. (2004). A sesquiterpene lactone, costunolide, interacts with microtubule protein and inhibits the growth of MCF-7 cells. *Chem Biol Interact* *147*, 79-86.

Bollag, D. M., McQueney, P. A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E. y Woods, C. M. (1995). Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res* *55*, 2325-2333.

Bordas, J., Mandelkow, E. M. y Mandelkow, E. (1983). Stages of tubulin assembly and disassembly studied by time-resolved synchrotron X-ray scattering. *J Mol Biol* *164*, 89-135.

Borisy, G. G. y Taylor, E. W. (1967a). The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-3H to cellular protein. *J Cell Biol* *34*, 525-533.

Borisy, G. G. y Taylor, E. W. (1967b). The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. *J Cell Biol* *34*, 535-548.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* *72*, 248-254.

Budman, D. R. y Calabro, A. (2002). In vitro search for synergy and antagonism: evaluation of docetaxel combinations in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* *74*, 41-46.

Budman, D. R., Calabro, A. y Kreis, W. (2002). Synergistic and antagonistic combinations of drugs in human prostate cancer cell lines in vitro. *Anticancer Drugs* *13*, 1011-1016.

Budman, D. R., Calabro, A., Wang, L. G., Liu, X. M., Stiel, L., Adams, L. M. y Kreis, W. (2000). Synergism of cytotoxic effects of vinorelbine and paclitaxel in vitro. *Cancer Invest* *18*, 695-701.

Burns, R. G. y SurrIDGE, C. (1990). Analysis of beta-tubulin sequences reveals highly conserved, coordinated amino acid substitutions. Evidence that these 'hot spots' are directly involved in the conformational change required for dynamic instability. *FEBS Lett* *271*, 1-8.

Chacon, P. y WriggerS, W. (2002). Multi-resolution contour-based fitting of macromolecular structures. *J Mol Biol* *317*, 375-384.

Chen, Z., Wang, B. y Chen, M. (1987). Steroidal bitter principles from *Tacca plantaginea*. Structures of taccalonolide A and B. *Tetrahedron Letters* *28*, 1673-1678.

Bibliografía

Chretien, D., Fuller, S. D. y Karsenti, E. (1995). Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J Cell Biol* *129*, 1311-1328.

Chretien, D. y Wade, R. H. (1991). New data on the microtubule surface lattice. *Biol Cell* *71*, 161-174.

Corley, D. G., Herb, R., Moore, R. E., Scheur, P. J. y Paul, V. J. (1988). Laulimalide. New potent cytotoxic macrolides from a marine sponge and a nudibranch predator. *J Org Chem* *53*, 3644-3646.

Cotran, S. R., Robbins, S. L. y Kuma, V. (1999). Patología estructural y funcional. Editorial McGraw-Hill.

Crabtree, D. V., Ojima, I., Geng, X. y Adler, A. J. (2001). Tubulins in the primate retina: evidence that xanthophylls may be endogenous ligands for the paclitaxel-binding site. *Bioorg Med Chem* *9*, 1967-1976.

Cross, D., Dominguez, J., Maccioni, R. B. y Avila, J. (1991). MAP-1 and MAP-2 binding sites at the C-terminus of beta-tubulin. Studies with synthetic tubulin peptides. *Biochemistry* *30*, 4362-4366.

Culine, S., Roch, I., Pinguet, F., Romieu, G. y Bressolle, F. (1999). Combination paclitaxel and vinorelbine therapy: in vitro cytotoxic interactions and dose-escalation study in breast cancer patients previously exposed to anthracyclines. *Int J Oncol* *14*, 999-1006.

Cutts, J. H., Beer, C. T. y Noble, R. L. (1960). Biological properties of Vincalokoblastine, an alkaloid in *Vinca rosea* Linn, with reference to its antitumor action. *Cancer Res* *20*, 1023-1031.

D'Amato, R. J., Lin, C. M., Flynn, E., Folkman, J. y Hamel, E. (1994). 2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 3964-3968.

Dang, Q. y Frieden, C. (1997). New PC versions of the kinetic-simulation and fitting programs, KINSIM and FITSIM. *Trends Biochem Sci* *22*, 317.

de Ines, C., Leynadier, D., Barasoain, I., Peyrot, V., Garcia, P., Briand, C., Rener, G. A. y Temple, C., Jr. (1994). Inhibition of microtubules and cell cycle arrest by a new 1-

deaza-7,8-dihydropteridine antitumor drug, CI 980, and by its chiral isomer, NSC 613863. *Cancer Res* *54*, 75-84.

de Pereda, J. M., Wallin, M., Billger, M. y Andreu, J. M. (1995). Comparative study of the colchicine binding site and the assembly of fish and mammalian microtubule proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* *30*, 153-163.

Derry, W. B., Wilson, L. y Jordan, M. A. (1998). Low potency of taxol at microtubule minus ends: implications for its antimitotic and therapeutic mechanism. *Cancer Res* *58*, 1177-1184.

Díaz, J. F. y Andreu, J. M. (1993). Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry* *32*, 2747-2755.

Díaz, J. F., Andreu, J. M., Diakun, G., Towns-Andrews, E. y Bordas, J. (1996). Structural intermediates in the assembly of taxoid-induced microtubules and GDP-tubulin double rings: time-resolved X-ray scattering. *Biophys J* *70*, 2408-2420.

Díaz, J. F., Barasoain, I. y Andreu, J. M. (2003). Fast kinetics of Taxol binding to microtubules. Effects of solution variables and microtubule-associated proteins. *J Biol Chem* *278*, 8407-8419.

Díaz, J. F., Barasoain, I., Souto, A. A., Amat-Guerri, F. y Andreu, J. M. (2005). Macromolecular accessibility of fluorescent taxoids bound at a paclitaxel binding site in the microtubule surface. *J Biol Chem* *280*, 3928-3937.

Díaz, J. F., Menendez, M. y Andreu, J. M. (1993). Thermodynamics of ligand-induced assembly of tubulin. *Biochemistry* *32*, 10067-10077.

Díaz, J. F., Pantos, E., Bordas, J. y Andreu, J. M. (1994). Solution structure of GDP-tubulin double rings to 3 nm resolution and comparison with microtubules. *J Mol Biol* *238*, 214-225.

Díaz, J. F., Strobe, R., Engelborghs, Y., Souto, A. A. y Andreu, J. M. (2000). Molecular recognition of taxol by microtubules. Kinetics and thermodynamics of binding of fluorescent taxol derivatives to an exposed site. *J Biol Chem* *275*, 26265-26276.

Downing, K. H. (2000). Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* *16*, 89-111.

Bibliografía

Duflos, A., Kruczynski, A. y Barret, J. M. (2002). Novel aspects of natural and modified vinca alkaloids. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2, 55-70.

Dupont, C., Guenard, D., Tchertanov, L., Thoret, S. y Gueritte, F. (1999). D-ring substituted rhazinilam analogues: semisynthesis and evaluation of antitubulin activity. *Bioorg Med Chem* 7, 2961-2969.

Edler, M. C., Buey, R. M., Gussio, R., Marcus, A. I., Vanderwal, C. D., Sorensen, E. J., Díaz, J. F., Giannakakou, P. y Hamel, E. (2005). Cyclostreptin (FR182877), an Antitumor Tubulin-Polymerizing Agent Deficient in Enhancing Tubulin Assembly Despite Its High Affinity for the Taxoid Site. *Biochemistry* 44, 11525-11538.

Evangelio, J. A., Abal, M., Barasoain, I., Souto, A. A., Lillo, M. P., Acuna, A. U., Amat-Guerri, F. y Andreu, J. M. (1998). Fluorescent taxoids as probes of the microtubule cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* 39, 73-90.

Fersht, A. (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science* (New York, Freeman and Company).

Fuchs, D. A. y Johnson, R. K. (1978). Cytologic evidence that taxol, an antineoplastic agent from *Taxus brevifolia*, acts as a mitotic spindle poison. *Cancer Treat Rep* 62, 1219-1222.

Gaitanos, T. N., Buey, R. M., Díaz, J. F., Northcote, P. T., Teesdale-Spittle, P., Andreu, J. M. y Miller, J. H. (2004). Peloruside A does not bind to the taxoid site on beta-tubulin and retains its activity in multidrug-resistant cell lines. *Cancer Res* 64, 5063-5067.

Gapud, E. J., Bai, R., Ghosh, A. K. y Hamel, E. (2004). Laulimalide and paclitaxel: a comparison of their effects on tubulin assembly and their synergistic action when present simultaneously. *Molecular Pharmacology* *In press*.

Gerth, K., Bedorf, N., Hofle, G., Irschik, H. y Reichenbach, H. (1996). Epothilons A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). Production, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* 49, 560-563.

Giannakakou, P., Gussio, R., Nogales, E., Downing, K. H., Zaharevitz, D., Bollbuck, B., Poy, G., Sackett, D., Nicolaou, K. C. y Fojo, T. (2000). A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2904-2909.

- Giannakakou, P., Sackett, D. L., Kang, Y. K., Zhan, Z., Buters, J. T., Fojo, T. y Poruchynsky, M. S. (1997). Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J Biol Chem* *272*, 17118-17125.
- Giannakakou, P., Villalba, L., Li, H., Poruchynsky, M. y Fojo, T. (1998). Combinations of paclitaxel and vinblastine and their effects on tubulin polymerization and cellular cytotoxicity: characterization of a synergistic schedule. *Int J Cancer* *75*, 57-63.
- Gigant, B., Curmi, P. A., Martin-Barbey, C., Charbaut, E., Lachkar, S., Lebeau, L., Siavoshian, S., Sobel, A. y Knossow, M. (2000). The 4 A X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex. *Cell* *102*, 809-816.
- Gigant, B., Wang, C., Ravelli, R. B., Roussi, F., Steinmetz, M. O., Curmi, P. A., Sobel, A. y Knossow, M. (2005). Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* *435*, 519-522.
- Gilli, P., Ferretti, V. y Gilli, G. (1994). Enthalpy-entropy compensation in drug-receptor binding. *J Phys Chem* *98*, 1515-1518.
- Gottesman, M. M., Pastan, I. y Ambudkar, S. V. (1996). P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev* *6*, 610-617.
- Gunasekera, S., Gunasekera, M. y Longley, R. (1990). Discodermolide: a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *J Org Chem* *55*, 4912-4915.
- Hall, M. (2000). *GTPases*. Oxford University Press *Oxford*.
- Hamel, E. y Lin, C. M. (1983). Interactions of combretastatin, a new plant-derived antimetabolic agent, with tubulin. *Biochem Pharmacol* *32*, 3864-3867.
- Hamel, E., Sackett, D. L., Vourloumis, D. y Nicolaou, K. C. (1999). The coral-derived natural products eleutherobin and sarcodictyins A and B: effects on the assembly of purified tubulin with and without microtubule-associated proteins and binding at the polymer taxoid site. *Biochemistry* *38*, 5490-5498.
- Haskins, K. M., Donoso, J. A. y Himes, R. H. (1981). Spirals and paracrystals induced by Vinca alkaloids: evidence that microtubule-associated proteins act as polycations. *J Cell Sci* *47*, 237-247.

Bibliografía

He, L., Jagtap, P. G., Kingston, D. G., Shen, H. J., Orr, G. A. y Horwitz, S. B. (2000). A common pharmacophore for Taxol and the epothilones based on the biological activity of a taxane molecule lacking a C-13 side chain. *Biochemistry* *39*, 3972-3978.

Heald, R. y Nogales, E. (2002). Microtubule dynamics. *J Cell Sci* *115*, 3-4.

Heinz, D. W., Schubert, W. D. y Hofle, G. (2005). Much anticipated--the bioactive conformation of epothilone and its binding to tubulin. *Angew Chem Int Ed Engl* *44*, 1298-1301.

Himes, R. H., Burton, P. R. y Gaito, J. M. (1977). Dimethyl sulfoxide-induced self-assembly of tubulin lacking associated proteins. *J Biol Chem* *252*, 6222-6228.

Höfle, G., Bedorf, N., Steinmetz, H., Schomburg, D., Gerth, K. y Reichenbach, H. (1996). Epothilone A and B novel 16-membered macrolides with cytotoxic activity: isolation, crystal structure and conformation in solution. *Angew Chem Int Ed Engl* *35*, 1567-1569.

Honore, S., Kamath, K., Braguer, D., Wilson, L., Briand, C. y Jordan, M. A. (2003). Suppression of microtubule dynamics by discodermolide by a novel mechanism is associated with mitotic arrest and inhibition of tumor cell proliferation. *Mol Cancer Ther* *2*, 1303-1311.

Hood, K. A., West, L. M., Rouwe, B., Northcote, P. T., Berridge, M. V., Wakefield, S. J. y Miller, J. H. (2002). Peloruside A, a novel antimitotic agent with paclitaxel-like microtubule-stabilizing activity. *Cancer Res* *62*, 3356-3360.

Hotani, H. y Horio, T. (1988). Dynamics of microtubules visualized by darkfield microscopy: treadmilling and dynamic instability. *Cell Motil Cytoskeleton* *10*, 229-236.

Howard, W. y Timasheff, S. N. (1987). Quasielastic light scattering studies of tubulin aggregation. *Arch Biochem Biophys* *255*, 446-452.

Howard, W. D. y Timasheff, S. N. (1986). GDP state of tubulin: stabilization of double rings. *Biochemistry* *25*, 8292-8300.

Hyams, J. S. y Lloyd, C. W. (1993). Microtubules. *Modern Cell Biology Wiley Liss*.

Hyman, A. A., Salser, S., Drechsel, D. N., Unwin, N. y Mitchison, T. J. (1992). Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell* *3*, 1155-1167.

Isbrucker, R. A., Cummins, J., Pomponi, S. A., Longley, R. E. y Wright, A. E. (2003). Tubulin polymerizing activity of dictyostatin-1, a polyketide of marine sponge origin. *Biochem Pharmacol* 66, 75-82.

Jefford, C. W., Bernardinelli, G., Tanaka, J. y Higa, T. (1996). Structures and absolute configurations of the marine toxins, latrunculin A and laulimalide. *Tetrahedron Letters* 37, 159-162.

Jenkins, C., Samudrala, R., Anderson, I., Hedlund, B. P., Petroni, G., Michailova, N., Pinel, N., Overbeek, R., Rosati, G. y Staley, J. T. (2002). Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 17049-17054.

Johnson, I. S., Wright, H. F., Svoboda, G. H. y Vlantis, J. (1960). Antitumor principles derived from *Vinca rosea* Linn. I. Vincalukoblastine and leurosine. *Cancer Res* 20, 1016-1022.

Jordan, M. A., Margolis, R. L., Himes, R. H. y Wilson, L. (1986). Identification of a distinct class of vinblastine binding sites on microtubules. *J Mol Biol* 187, 61-73.

Jordan, M. A., Thrower, D. y Wilson, L. (1991). Mechanism of inhibition of cell proliferation by *Vinca* alkaloids. *Cancer Res* 51, 2212-2222.

Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D. y Wilson, L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9552-9556.

Jordan, M. A. y Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4, 253-265.

Kar, S., Fan, J., Smith, M. J., Goedert, M. y Amos, L. A. (2003a). Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *Embo J* 22, 70-77.

Kar, S., Florence, G. J., Paterson, I. y Amos, L. A. (2003b). Discodermolide interferes with the binding of tau protein to microtubules. *FEBS Lett* 539, 34-36.

Karjala, G., Chan, Q., Manzo, E., Andersen, R. J. y Roberge, M. (2005). Ceratamines, structurally simple microtubule-stabilizing antimitotic agents with unusual cellular effects. *Cancer Res* 65, 3040-3043.

Bibliografía

Ketzinel, S., Rudi, A., Schleyer, R., Benayahu, Y. y Kashman, Y. (1996). Sarcodictyin A and Two Novel Diterpenoid Glycosides, Eleuthosides A and B, from the Soft Coral *Eleutherobia aurea*. *J Nat Prod* *59*, 873-875.

Kingston, D. G. (2004). What makes epothilones stick? *Chem Biol* *11*, 153-155.

Kirschner, M. W. y Mitchison, T. (1986). Microtubule dynamics. *Nature* *324*, 621.

Kowalski, R. J., Giannakakou, P., Gunasekera, S. P., Longley, R. E., Day, B. W. y Hamel, E. (1997a). The microtubule-stabilizing agent discodermolide competitively inhibits the binding of paclitaxel (Taxol) to tubulin polymers, enhances tubulin nucleation reactions more potently than paclitaxel, and inhibits the growth of paclitaxel-resistant cells. *Mol Pharmacol* *52*, 613-622.

Kowalski, R. J., Giannakakou, P. y Hamel, E. (1997b). Activities of the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to paclitaxel (Taxol(R)). *J Biol Chem* *272*, 2534-2541.

Kraus, E., Little, M., Kempf, T., Hofer-Warbinek, R., Ade, W. y Ponstingl, H. (1981). Complete amino acid sequence of beta-tubulin from porcine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *78*, 4156-4160.

Krebs, A., Goldie, K. N. y Hoenger, A. (2004). Complex formation with kinesin motor domains affects the structure of microtubules. *J Mol Biol* *335*, 139-153.

Krebs, A., Goldie, K. N. y Hoenger, A. (2005). Structural rearrangements in tubulin following microtubule formation. *EMBO Rep* *6*, 227-232.

Kreis, W., Budman, D. R. y Calabro, A. (1997). Unique synergism or antagonism of combinations of chemotherapeutic and hormonal agents in human prostate cancer cell lines. *Br J Urol* *79*, 196-202.

Krug, R. R., Hunter, W. G. y Grieger, R. A. (1976a). Enthalpy-entropy compensation. 1. Some fundamental statistical problems associated with the analysis of van't Hoff and Arrhenius data. *J Phys Chem* *80*, 2335-2341.

Krug, R. R., Hunter, W. G. y Grieger, R. A. (1976b). Enthalpy-entropy compensation. 2. Separation of the chemical from the statistical effect. *J Phys Chem* *80*, 2341-2351.

Lakowicz, J. (1999). Principles of fluorescence anisotropy. Kluwer Academic /Plenum Publishers New York, 291-319.

- Lee, J. C., Frigon, R. P. y Timasheff, S. N. (1973). The chemical characterization of calf brain microtubule protein subunits. *J Biol Chem* *248*, 7253-7262.
- Lee, J. C., Harrison, D. y Timasheff, S. N. (1975). Interaction of Vinblastine with Calf Brain Microtubule protein. *J Biol Chem* *250*, 9276-9282.
- Lee, J. C. y Timasheff, S. N. (1975). The reconstitution of microtubules from purified calf brain tubulin. *Biochemistry* *14*, 5183-5187.
- Leza, J. C., Lizasoain, I., Fernández, P. L., Moreno, A. y Moro, M. A. (2005). Velázquez. *Farmacología básica y clínica*. Editorial Médica Panamericana.
- Li, H., DeRosier, D. J., Nicholson, W. V., Nogales, E. y Downing, K. H. (2002). Microtubule structure at 8 Å resolution. *Structure (Camb)* *10*, 1317-1328.
- Lindel, T., Jensen, P. R., Fenical, W., Long, B. H., Casazza, A. M., Carboni, J. M. y Fairchild, C. R. (1997). Eleutherobin, a new cytotoxin that mimics paclitaxel (Taxol) by stabilizing microtubules. *J Am Chem Soc* *119*, 8744-8745.
- Litman, T., Druley, T. E., Stein, W. D. y Bates, S. E. (2001). From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* *58*, 931-959.
- Long, B. H., Carboni, J. M., Wasserman, A. J., Cornell, L. A., Casazza, A. M., Jensen, P. R., Lindel, T., Fenical, W. y Fairchild, C. R. (1998). Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (Taxol). *Cancer Res* *58*, 1111-1115.
- Longley, R. E., Caddigan, D., Harmody, D., Gunasekera, M. y Gunasekera, S. P. (1991). Discodermolide--a new, marine-derived immunosuppressive compound. II. In vivo studies. *Transplantation* *52*, 656-661.
- Longley, R. E., Gunasekera, S. P., Faherty, D., McLane, J. y Dumont, F. (1993). Immunosuppression by discodermolide. *Ann NY Acad Sci* *696*, 94-107.
- Lowe, J. y Amos, L. A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* *391*, 203-206.
- Lowe, J., Li, H., Downing, K. H. y Nogales, E. (2001). Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol* *313*, 1045-1057.

Bibliografía

Luque, I. y Freire, E. (2002). Structural parameterization of the binding enthalpy of small ligands. *Proteins* *49*, 181-190.

Madari, H., Panda, D., Wilson, L. y Jacobs, R. S. (2003). Dicoumarol: a unique microtubule stabilizing natural product that is synergistic with Taxol. *Cancer Res* *63*, 1214-1220.

Mallik, R. y Gross, S. P. (2004). Molecular motors: strategies to get along. *Curr Biol* *14*, R971-982.

Mandelkow, E. y Bordas, J. (1986). Time-resolved X-ray scattering of microtubule assembly using synchrotron radiation. *Methods Enzymol* *134*, 657-676.

Mani, S., Macapinlac, M., Jr., Goel, S., Verdier-Pinard, D., Fojo, T., Rothenberg, M. y Colevas, D. (2004). The clinical development of new mitotic inhibitors that stabilize the microtubule. *Anticancer Drugs* *15*, 553-558.

Marcus, A. I., Zhou, J., O'Brate, A., Hamel, E., Wong, J., Nivens, M., El-Naggar, A., Yao, T. P., Khuri, F. R. y Giannakakou, P. (2005). The synergistic combination of the farnesyl transferase inhibitor lonafarnib and paclitaxel enhances tubulin acetylation and requires a functional tubulin deacetylase. *Cancer Res* *65*, 3883-3893.

Martello, L. A., McDaid, H. M., Regl, D. L., Yang, C. P., Meng, D., Pettus, T. R., Kaufman, M. D., Arimoto, H., Danishefsky, S. J., Smith, A. B., 3rd y Horwitz, S. B. (2000). Taxol and discodermolide represent a synergistic drug combination in human carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* *6*, 1978-1987.

Maruta, H., Greer, K. y Rosenbaum, J. L. (1986). The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J Cell Biol* *103*, 571-579.

McDaid, H. M., Bhattacharya, S. K., Chen, X. T., He, L., Shen, H. J., Gutteridge, C. E., Horwitz, S. B. y Danishefsky, S. J. (1999). Structure-activity profiles of eleutherobin analogs and their cross-resistance in Taxol-resistant cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* *44*, 131-137.

Melki, R., Carlier, M. F., Pantaloni, D. y Timasheff, S. N. (1989). Cold depolymerization of microtubules to double rings: geometric stabilization of assemblies. *Biochemistry* *28*, 9143-9152.

Meurer-Grob, P., Kasparian, J. y Wade, R. H. (2001). Microtubule structure at improved resolution. *Biochemistry* *40*, 8000-8008.

- Miglietta, A., Bozzo, F., Gabriel, L. y Bocca, C. (2004). Microtubule-interfering activity of parthenolide. *Chem Biol Interact* *149*, 165-173.
- Miglietta, A., Gabriel, L., Appendino, G. y Bocca, C. (2003). Biological properties of jatrophone polyesters, new microtubule-interacting agents. *Cancer Chemother Pharmacol* *51*, 67-74.
- Mooberry, S. L., Tien, G., Hernandez, A. H., Plubrukarn, A. y Davidson, B. S. (1999). Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. *Cancer Res* *59*, 653-660.
- Mulzer, J., Mantoulidis, A. y Ohler, E. (2000). Total syntheses of epothilones B and D. *J Org Chem* *65*, 7456-7467.
- Nettles, J. H., Li, H., Cornett, B., Krahn, J. M., Snyder, J. P. y Downing, K. H. (2004). The binding mode of epothilone A on alpha,beta-tubulin by electron crystallography. *Science* *305*, 866-869.
- Nicholson, W. V., Lee, M., Downing, K. H. y Nogales, E. (1999). Cryo-electron microscopy of GDP-tubulin rings. *Cell Biochem Biophys* *31*, 175-183.
- Nicolaou, K. C., Finlay, M. R., Ninkovic, S., King, N. P., He, Y., Li, T., Sarabia, F. y Vourloumis, D. (1998). Synthesis and biological properties of C12,13-cyclopropyl-epothilone A and related epothilones. *Chem Biol* *5*, 365-372.
- Nicolaou, K. C., Hepworth, D., King, N. P., Finlay, M. R., Scarpelli, R., Pereira, M. M., Bollbuck, B., Bigot, A., Werschkun, B. y Winssinger, N. (2000a). Total synthesis of 16-desmethylepothilone B, epothilone B10, epothilone F, and related side chain modified epothilone B analogues. *Chemistry* *6*, 2783-2800.
- Nicolaou, K. C., Hepworth, D., King, N. P., Finlay, M. R., Scarpelli, R., Pereira, M. M., Bollbuck, B., Bigot, A., Werschkun, B. y Winssinger, N. (2000b). Total synthesis of desmethylepothilone B, epothilone B10, epothilone F, and related side chain modified epothilone B analogues. *Chem Biol* *6*, 2783-2800.
- Nicolaou, K. C., Namoto, K., Li, J., Ritzen, A., Ulven, T., Shoji, M., Zaharevitz, D., Gussio, R., Sackett, D. L., Ward, R. D. y col. (2001a). Synthesis and biological evaluation of 12,13-cyclopropyl and 12,13-cyclobutyl epothilones. *Chembiochem* *2*, 69-75.

Bibliografía

Nicolaou, K. C., Namoto, K., Ritzen, A., Ulven, T., Shoji, M., Li, J., D'Amico, G., Liotta, D., French, C. T., Wartmann, M. y col. (2001b). Chemical synthesis and biological evaluation of cis- and trans-12,13-cyclopropyl and 12,13-cyclobutyl epothilones and related pyridine side chain analogues. *J Am Chem Soc* *123*, 9313-9323.

Nicolaou, K. C., Ritzen, A. y Namoto, K. (2001c). Recent developments in the chemistry, biology and medicine of the epothilones. *Chem Commun (Camb)*, 1523-1535.

Nicolaou, K. C., Ritzén, A., Namoto, K., Buey, R. M., Díaz, J. F., Andreu, J. M., Wartmann, M., Altmann, K. H., O'Brate, A. y Giannakakou, P. (2002). Chemical synthesis and biological evaluation of novel epothilone B and trans-12,13-cyclopropyl epothilone B analogues. *Tetrahedron* *58*, 6413-6432.

Nicolaou, K. C., Sasmal, P. K., Rassias, G., Reddy, M. V., Altmann, K. H., Wartmann, M., O'Brate, A. y Giannakakou, P. (2003). Design, synthesis, and biological properties of highly potent epothilone B analogues. *Angew Chem Int Ed Engl* *42*, 3515-3520.

Nicolaou, K. C., Scarpelli, R., Bollbuck, B., Werschkun, B., Pereira, M. M., Wartmann, M., Altmann, K. H., Zaharevitz, D., Gussio, R. y Giannakakou, P. (2000c). Chemical synthesis and biological properties of pyridine epothilones. *Chem Biol* *7*, 593-599.

Nicolaou, K. C., Winssinger, N., Pastor, J., Ninkovic, S., Sarabia, F., He, Y., Vourloumis, D., Yang, Z., Li, T., Giannakakou, P. y Hamel, E. (1997). Synthesis of epothilones A and B in solid and solution phase. *Nature* *387*, 268-272.

Nogales, E., Downing, K. H., Amos, L. A. y Lowe, J. (1998a). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol* *5*, 451-458.

Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A. y Downing, K. H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell* *96*, 79-88.

Nogales, E., Wolf, S. G. y Downing, K. H. (1998b). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* *391*, 199-203.

Ojima, I., Chakravarty, S., Inoue, T., Lin, S., He, L., Horwitz, S. B., Kuduk, S. D. y Danishefsky, S. J. (1999). A common pharmacophore for cytotoxic natural products that stabilize microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 4256-4261.

Oosawa, F. y Asakura, S. (1975). Thermodynamics of the polymerization of protein, (London, Academic Press).

Pantaloni, D. y Carlier, M. F. (1986). Involvement of guanosine triphosphate (GTP) hydrolysis in the mechanism of tubulin polymerization: regulation of microtubule dynamics at steady state by a GTP cap. *Ann N Y Acad Sci* *466*, 496-509.

Pelletier, P. y Caventon, J. (1820). *Ann Chim Phys* *14*, 69.

Pineda, O., Farras, J., Maccari, L., Manetti, F., Botta, M. y Vilarrasa, J. (2004). Computational comparison of microtubule-stabilising agents laulimalide and peloruside with taxol and colchicine. *Bioorg Med Chem Lett* *14*, 4825-4829.

Ponstingl, H., Krauhs, E., Little, M. y Kempf, T. (1981). Complete amino acid sequence of alpha-tubulin from porcine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *78*, 2757-2761.

Pryor, D. E., O'Brate, A., Bilcer, G., Díaz, J. F., Wang, Y., Kabaki, M., Jung, M. K., Andreu, J. M., Ghosh, A. K., Giannakakou, P. y Hamel, E. (2002). The microtubule stabilizing agent laulimalide does not bind in the taxoid site, kills cells resistant to paclitaxel and epothilones, and may not require its epoxide moiety for activity. *Biochemistry* *41*, 9109-9115.

Quasthoff, S. y Hartung, H. P. (2002). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J Neurol* *249*, 9-17.

Quiñoá, E., Kakou, Y. y Crews, P. (1988). Fijianolides, polyketide heterocyclics from a marine sponge. *J Org Chem* *53*, 3642-3644.

Ravelli, R. B., Gigant, B., Curmi, P. A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A. y Knossow, M. (2004). Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* *428*, 198-202.

Roux, D., Hadi, H. A., Thoret, S., Guenard, D., Thoison, O., Pais, M. y Sevenet, T. (2000). Structure-activity relationship of polyisoprenyl benzophenones from *Garcinia pyrifera* on the tubulin/microtubule system. *J Nat Prod* *63*, 1070-1076.

Rowinsky, E. K. (1997). Paclitaxel pharmacology and other tumor types. *Semin Oncol* *24*, S19-11-S19-12.

Sato, B., Muramatsu, H., Miyauchi, M., Hori, Y., Takase, S., Hino, M., Hashimoto, S. y Terano, H. (2000a). A new antimitotic substance, FR182877. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* *53*, 123-130.

Bibliografía

Sato, B., Nakajima, H., Hori, Y., Hino, M., Hashimoto, S. y Terano, H. (2000b). A new antimetabolic substance, FR182877. II. The mechanism of action. *J Antibiot (Tokyo)* *53*, 204-206.

Schiff, P. B., Fant, J. y Horwitz, S. B. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* *277*, 665-667.

Schlieper, D., Oliva, M. A., Andreu, J. M. y Lowe, J. (2005). Structure of bacterial tubulin BtubA/B: Evidence for horizontal gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Shearwin, K. E., Perez-Ramirez, B. y Timasheff, S. N. (1994). Linkages between the dissociation of alpha beta tubulin into subunits and ligand binding: the ground state of tubulin is the GDP conformation. *Biochemistry* *33*, 885-893.

Shearwin, K. E. y Timasheff, S. N. (1992). Linkage between ligand binding and control of tubulin conformation. *Biochemistry* *31*, 8080-8089.

Shearwin, K. E. y Timasheff, S. N. (1994). Effect of colchicine analogues on the dissociation of alpha beta tubulin into subunits: the locus of colchicine binding. *Biochemistry* *33*, 894-901.

Shen, J., Chen, Z. y Gao, Y. (1991). The pentacyclic steroidal constituents of *Tacca plantaginea*: taccalonolide E and F. *Chinese J Chem* *9*, 92-94.

Shi, B., Yaremko, B., Hajian, G., Terracina, G., Bishop, W. R., Liu, M. y Nielsen, L. L. (2000). The farnesyl protein transferase inhibitor SCH66336 synergizes with taxanes in vitro and enhances their antitumor activity in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* *46*, 387-393.

Shintani, Y., Tanaka, T. y Nozaki, Y. (1997). GS-164, a small synthetic compound, stimulates tubulin polymerization by a similar mechanism to that of Taxol. *Cancer Chemother Pharmacol* *40*, 513-520.

Skoufias, D. A. y Wilson, L. (1992). Mechanism of inhibition of microtubule polymerization by colchicine: inhibitory potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes. *Biochemistry* *31*, 738-746.

Smith, C. D., Zhang, X., Mooberry, S. L., Patterson, G. M. y Moore, R. E. (1994). Cryptophycin: a new antimicrotubule agent active against drug-resistant cells. *Cancer Res* *54*, 3779-3784.

Smith, G., Neubauer, B., Sundboom, J., Best, K., Goode, Tanzer, L., Merriman, R., Frank, J. y Herrmann, R. (1988). Correlation of the in vivo anticoagulant, antithrombotic and metastatic efficacy of warfarin in the rat. *Thromb Res* *50*, 163-174.

Speicher, L. A., Barone, L. y Tew, K. D. (1992). Combined antimicrotubule activity of estramustine and taxol in human prostatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* *52*, 4433-4440.

Taylor, M. y Reide, P. (2001). *Lo esencial en farmacología*. Harcourt.

Tinley, T. L., Randall-Hlubek, D. A., Leal, R. M., Jackson, E. M., Cessac, J. W., Quada, J. C., Jr., Hemscheidt, T. K. y Mooberry, S. L. (2003). Taccalonolides E and A: Plant-derived steroids with microtubule-stabilizing activity. *Cancer Res* *63*, 3211-3220.

Torres, K. y Horwitz, S. B. (1998). Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent. *Cancer Res* *58*, 3620-3626.

Toso, R. J., Jordan, M. A., Farrell, K. W., Matsumoto, B. y Wilson, L. (1993). Kinetic stabilization of microtubule dynamic instability in vitro by vinblastine. *Biochemistry* *32*, 1285-1293.

Usui, T., Watanabe, H., Nakayama, H., Tada, Y., Kanoh, N., Kondoh, M., Asao, T., Takio, K., Nishikawa, K., Kitahara, T. y Osada, H. (2004). The anticancer natural product pironetin selectively targets Lys352 of alpha-tubulin. *Chem Biol* *11*, 799-806.

Vanderwal, C. D., Vosburg, D. A., Weiler, S. y Sorensen, E. J. (2003). An enantioselective synthesis of FR182877 provides a chemical rationalization of its structure and affords multigram quantities of its direct precursor. *J Am Chem Soc* *125*, 5393-5407.

Verdier-Pinard, P., Wang, Z., Mohanakrishnan, A. K., Cushman, M. y Hamel, E. (2000). A steroid derivative with paclitaxel-like effects on tubulin polymerization. *Mol Pharmacol* *57*, 568-575.

Volz, K. (1999). A test case for structure-based functional assignment: the 1.2 Å crystal structure of the yjgF gene product from *Escherichia coli*. *Protein Sci* *8*, 2428-2437.

Bibliografía

Wade, R. H., Chretien, D. y Job, D. (1990). Characterization of microtubule protofilament numbers. How does the surface lattice accommodate? *J Mol Biol* *212*, 775-786.

Wang, H. W. y Nogales, E. (2005). Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature* *435*, 911-915.

Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. y McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* *93*, 2325-2327.

Warwick, O. H., Darte, J. M., Brown, T. C., Beer, C. T., Cutts, J. H. y Noble, R. L. (1960). Some biological effects of Vincalokoblastine, an alkaloid in *Vinca rosea* Linn in patients with malignant disease. *Cancer Res* *20*, 1032-1040.

Weisenberg, R. C., Borisy, G. G. y Taylor, E. W. (1968). The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry* *7*, 4466-4479.

West, L. M., Northcote, P. T. y Battershill, C. N. (2000). Peloruside A: a potent cytotoxic macrolide isolated from the New Zealand marine sponge *Mycale* sp. *J Org Chem* *65*, 445-449.

Yoshimura, S., Sato, B., Kinoshita, T., Takase, S. y Terano, H. (2000). A new antimitotic substance, FR182877. III. Structure determination. *J Antibiot (Tokyo)* *53*, 615-622.

Yvon, A. M., Wadsworth, P. y Jordan, M. A. (1999). Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Mol Biol Cell* *10*, 947-959.

Publicaciones a las que ha dado lugar este trabajo de tesis doctoral:

Buey RM y colaboradores. The microtubule-stabilizing agent cyclostreptin (FR182877) reacts covalently with β -tubulin following its binding in the taxoid site on microtubules. En preparación.

Buey RM, Barasoain I, Jackson E, Meyer A, Giannakakou P, Paterson I, Mooberry S, Andreu JM y Díaz JF. (2005). Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: Thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity. *Chemistry & Biology*. En prensa.

Díaz JF y **Buey RM**. (2005). Characterizing ligand-microtubule binding by competition methods. In "Microtubule Protocols". Humana Press, Totowa, NJ. Editor: Jun Zhou. *Methods in Molecular Medicine*. En prensa.

Edler MC, **Buey RM**, Marcus AI, Vanderwal CD, Sorensen EJ, Díaz JF, Giannakakou P y Hamel E. (2005). Cyclostreptin (FR182877), an antitumor tubulin-polymerizing agent deficient in enhancing tubulin assembly despite high affinity for the taxoid site. *Biochemistry* **44**, 11525-11538.

Paterson I, Menche D, Hakanson AE, Longstaff A, Wong D, Barasoain I, **Buey RM** y Díaz JF. (2005). Design, synthesis and biological evaluation of novel, simplified analogues of laulimalide: modification of the side chain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **15**, 2243-2247.

Gaitanos TN, **Buey RM**, Díaz JF, Northcote PT, Teesdale-Spittle P, Andreu JM, y Miller JH. (2004). Peloruside A does not bind to the taxoid site on β -tubulin and retains its activity in multidrug resistant cell lines. *Cancer Research* **64**, 5063-5067.

Nota: Gaitanos TN y **Buey RM** han contribuido de la misma forma a este trabajo.

Buey RM, Diaz JF, Andreu JM, O'Brate, Giannakakou P, Nicolaou KC, Sasmal PK, Ritzén A y Namoto K. (2004). Energetics of interaction of C12, cyclopropyl and C15 side chain epothilone analogs with the paclitaxel binding site. Relationship between binding affinity, microtubule stabilization and cytotoxicity. *Chemistry & Biology* **11**, 225-236.

Ver comentario: Kingston D. (2004). *Chemistry & Biology* **11**, 153-155.

Nicolaou KC, Ritzén A, Namoto K, **Buey RM**, Díaz JF, Andreu JM, Wartmann, Altmann KH, O'Brate A and Giannakakou P (2002) "Chemical synthesis and biological evaluation of novel epothilone B and trans-12,13-cyclopropyl epothilone B analogues". *Tetrahedron* **58**, 6413-6432.