



Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en las propiedades anticancerosas y antimetastásicas de las prodigininas

Identificación de mTOR como diana molecular en células de melanoma

Margarita Espona Fiedler

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Programa de doctorado de MEDICINA
2009-2012

Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en las propiedades anticancerosas y antimetastásicas de las prodigininas.

Identificación de mTOR como diana molecular en células de melanoma.

Siguiendo la línea de investigación en Cáncer y Genética Humana, esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Ricardo Pérez Tomás y co-dirección de la Dra. Vanessa Soto Cerrato en el grupo de investigación de Biología Celular del Cáncer-Farmacogenómica y Desarrollo de Nuevos Fármacos Antineoplásicos del Departamento de Patología y Terapéutica Experimental de la Universidad de Barcelona.

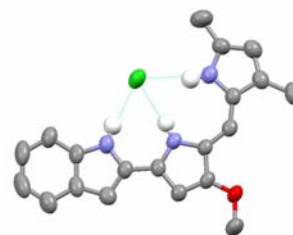
Margarita Espona Fiedler Dr. Ricardo Pérez Tomás Dra. Vanessa Soto Cerrato

Memoria presentada por Margarita Espona Fiedler para optar al grado de Doctora por la Universidad de Barcelona.

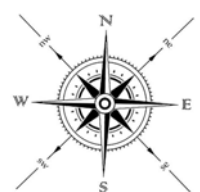
- Prólogo -

La falta de tratamientos quimioterapéuticos efectivos hace que la prognosis de los pacientes con melanoma siga siendo poco alentadora. En células de melanoma, se han descrito diversos mecanismos moleculares que confieren resistencia a las terapias actuales. La identificación de moléculas capaces de superar dichas barreras resulta siempre esperanzador de cara a diseñar nuevas estrategias terapéuticas más eficaces.

Durante años nuestro grupo de investigación ha estudiado el efecto citotóxico de las prodigininas en diferentes células cancerosas. Las prodigininas son compuestos tripirrólicos de origen natural con una probada actividad anticancerosa. Sin embargo, resolver los mecanismos de acción a través de los cuáles estas moléculas inducen su efecto es una cuestión todavía abierta, y en la que se está trabajando activamente. El interés farmacéutico que ha despertado estas moléculas es evidente en vista de los resultados obtenidos con obatoclax, un derivado sintético de las prodigininas, actualmente en estudios clínicos en fase III. Así pues, esclarecer esta cuestión resulta clave para una mayor comprensión del potencial quimioterapéutico atribuido a estas moléculas. Para ello, es imprescindible conocer bien sus dianas moleculares. A lo largo de este proyecto, resolver esta cuestión ha sido el principal objetivo, y nos ha llevado a plantearnos otras nuevas: ¿qué ventajas podrían aportar estas moléculas respecto a los actuales tratamientos contra el cáncer?, o bien, ¿cómo diseñar y desarrollar nuevos derivados sintéticos con una mayor actividad anticancerosa y antimetastásica?. Esta tesis pretende dar respuesta a estas, y otras preguntas, que podrían ayudar a sentar las bases de nuevas estrategias más eficaces.



A mi familia



- Agradecimientos -

En primer lugar, agradecer a mi director de tesis, Dr. Ricardo Pérez Tomás, y co-directora, Dra. Vanessa Soto Cerrato, no sólo el asesoramiento y el haber puesto a mi disposición las herramientas y conocimientos necesarios para la realización de esta tesis, sino la oportunidad de haber realizado este proyecto contando con su apoyo y confianza.

Este proyecto, además, no hubiera sido posible sin la colaboración de diversos grupos de investigación. Agradecer al Dr. Roberto Quesada y cols. (Departamento de Química, Universidad de Burgos) la síntesis y provisión de diferentes derivados sintéticos de las prodigininas, así como su colaboración en los estudios SAR que establecieron la relación entre estructura y actividad de estas moléculas; al Dr. Víctor Guallar y Ali Hussein (Supercomputing Center; Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats, Barcelona) el diseño de los modelos *in silico* que han resultado imprescindibles para el estudio de las interacciones entre estas moléculas y posibles dianas moleculares; a la Dra. Margarida Fardilha, Sara Esteves y Joao Figueredo (Centro de Biología Celular, Universidad de Aveiro, Portugal) los años de colaboración y proyectos conjuntos en el estudio de las fosfatasa como posibles dianas terapéuticas. Igual de imprescindible ha sido contar con el asesoramiento del Dr. José M. Lizcano (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Autónoma de Barcelona), a quién, además, debo agradecer todo el aprendizaje previo que recibí bajo su dirección durante la realización del Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina. Gracias por tu apoyo y guía en todo momento.

Por sus consejos y ejemplo, gracias también, a la Dra. Soledad Alcántara, Dr. Jordi Domingo, Dr. José Luis Rosa, Dr. Francesc Ventura, Dra. Celia García, Dra. Teresa Vinuesa y Dr. Miquel Viñas de la Universidad de Barcelona (Campus de Bellvitge).

Gracias a tantas otras personas como la Dra. Marta Taulés (Unidad de Citometría, Parc Científic) quién me asesoró en la puesta a punto del sistema Biacore T-100 y Benjamin Torrejón (Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona) por toda su ayuda en lo que se refiere a técnicas de microscopia. A mis

compañeros de grupo y laboratorio Paulina Iglesias, Alberto Ortega, Zaida Álvarez, Marta Mattoti, Aina Castells, Nuno Coelho, Dencho Gugutkoy, son muchos los momentos en que su ayuda en diversas técnicas y herramientas me han facilitado el trabajo. Sin embargo, su mayor aportación en esta tesis ha sido contagiarme sus ganas, su alegría y su compañerismo. No sólo compañeros, mi punto de apoyo. Gracias, en general, al Departamento de Patología Terapéutica Experimental, donde he tenido el placer de conocer y trabajar al lado de gente como Eva Sánchez, Lidia López, Ester Fusté, M^a Isabel Bahamonte, Núria Camarero, Ariadna Pérez, Mercè Izquierdo o Santiago López, siempre dispuestos a echar una mano o simplemente unas palabras de ánimo.

A nivel personal, gracias a Arantza Rodríguez Asiain a quién le debo más de lo que, incluso yo, creo. A Judit España, Roger Cubí, Gerard Ruíz, Tatiana Erazo, Tania Martiáñez, Natalia Moreno y demás colegas con los que empecé este camino y que, sin ellos, hubiera sido todo más difícil y menos divertido.

A mi familia, con quienes comparto este logro personal, pues también es fruto de su esfuerzo. Siempre presentes en cada paso que doy.

Resumen

El melanoma metastásico es un modelo de tumor especialmente agresivo y resistente a inmuno, radio y quimioterapia. La pobre prognosis de los pacientes y el preocupante incremento de casos en los últimos años hacen necesario el diseño y desarrollo de nuevos y mejorados agentes anticancerígenos, así como nuevas estrategias terapéuticas más eficaces.

Las células de melanoma presentan alteraciones genéticas y moleculares que alteran el control de la proliferación y supervivencia celular. Estas alteraciones permiten superar las barreras de control del crecimiento y migración celular, aspectos asociados no sólo con la inmortalización y adquisición de las propiedades invasivas, sino que también les confieren resistencia frente a tratamientos quimioterapéuticos.

Tanto la vía PI3K/AKT/mTOR, como la vía mitogénica mediada por MAPKs, son claves en la supervivencia y crecimiento celular. Ambas vías, a través de GSK-3 β , se encuentran implicadas en la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2. La sobreexpresión de esta familia de proteínas facilita que la célula escape a los mecanismos apoptóticos inducidos por agentes citotóxicos convencionales. Por esta razón, estrategias terapéuticas basadas en la inhibición de estas vías han mostrado su potencial en estudios clínicos. Este potencial radica en la activación simultánea de dos mecanismos de muerte celular: apoptosis y autofagia.

De entre la familia de compuestos anticancerosos conocidos como prodigininas (PGs), en un principio, prodigiosina destacó por su marcado efecto pro-apoptótico en diferentes líneas tumorales. Actualmente, un derivado sintético de las PGs, obatoclax, que fue diseñado como molécula BH3 mimética, está siendo evaluado en ensayos clínicos en fase III. Sin embargo, los estudios realizados en melanoma muestran la modesta eficacia de obatoclax como agente individual, lo que hacía necesario estudios más exhaustivos sobre los mecanismos de acción de esta molécula. Un efecto citotóxico más marcado se ha obtenido mediante el tratamiento con prodigiosina. A pesar de que ambas moléculas han mostrado desencadenar similares mecanismos moleculares, las diferencias estructurales entre ambas moléculas serían críticas en su actividad. Los nuevos datos aportados contribuyen a un mejor entendimiento de los eventos moleculares que desencadenan la actividad anticancerosa y antimetastásica de las PGs. En este aspecto, la caracterización de PGs como inhibidores duales de mTORC1 y mTORC2 pone en evidencia la relevancia que estas moléculas podrían tener en un futuro en la terapia contra el cáncer. La vía de mTOR es una vía compleja debido a la

cantidad de reguladores y sustratos que, además, comparte con otras vías de señalización. Esta compleja red de mecanismos de regulación e interconexión entre las diferentes vías permite compensar la inhibición de mTORC1 con la activación de otros efectores. Es el caso de la activación de AKT a través del feedback negativo S6K/IRS1, o bien la activación de ERK1/2 a través de Ras o Raf que actúan como centros de integración de señales entre ambas vías. Las PGs son capaces de bloquear estos mecanismos mediante la inhibición de diferentes dianas terapéuticas al mismo tiempo. Estos compuestos reducirían la necesidad de usar diferentes quimioterapéuticos en las terapias que actualmente se utilizan contra el cáncer, con la consecuente reducción de efectos adversos.

El potencial quimioterapéutico de las PGs radica en la activación conjunta y prolongada tanto de la vía mitocondrial apoptótica como autofágica. Por un lado, confirmamos que prodigiosina, al igual que ya fue descrito para obatoclax, es capaz de antagonizar MCL-1 induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial, salida del citocromo c a citosol y, en consecuencia, la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Además, identificamos mTOR, uno de los principales efectores de la vía de supervivencia PI3K/AKT y reguladores de autofagia, como diana molecular clave en la mediación de los efectos citotóxicos. Conocer los efectos de las PGs sobre las principales vías de supervivencia resulta imprescindible para esclarecer, no sólo los mecanismos a través de los cuáles las PGs median su efecto citotóxico, sino aquellos que limitan su eficacia.

La interacción de PGs con el centro activo de mTOR se confirmó mediante técnicas de resonancia de plasmón superficial (SPR), monitorizando las interacciones, a tiempo real, usando biosensores ópticos. Los parámetros cinéticos y de afinidad mostraron que ambas moléculas forman complejos estables, específicos, y de alta afinidad a concentraciones nanomolares. Los ensayos de competición con ATP revelaron que no existe competición entre ATP y las PGs por su lugar de unión, sugiriendo que las PGs actúan como inhibidores ATP no miméticos. Este dato fue confirmado mediante ensayos de actividad quinasa donde se observó que la inhibición de los complejos endógenos de mTOR es irreversible en presencia de concentraciones saturantes de ATP.

Inhibidores de mTOR de segunda generación capaces de inhibir diferentes proteínas quinasas y bloquear diferentes mecanismos de compensación, han mostrado su eficacia tanto como agentes individuales como en terapias combinadas en diferentes tipos tumorales. Es por esto que la industria farmacológica se ha interesado cada vez más en este tipo de moléculas. Las similitudes funcionales y estructurales entre inhibidores de mTOR ATP-miméticos como PP242 y PGs, nos hacen ser optimistas en cuanto a las expectativas futuras que puedan generar estas moléculas en la terapia contra el cáncer. Los resultados obtenidos son equiparables tanto en lo que se refiere a la afinidad de estas moléculas por su unión al centro activo de mTOR, como a la inhibición dual de ambos complejos endógenos, mTORC1 y mTORC2. De esta manera, PGs son capaces de bloquear el *feedback loop* S6K/IRS1 evitando la activación de AKT tras la inhibición de mTORC1.

Un valor añadido de estas moléculas son sus probadas propiedades antimetastásicas. En este aspecto, demostramos que la inhibición de mTOR promueve la desestabilización del complejo ILK/riCTOR con la consecuente pérdida de señalización a través de la vía de las integrinas, crítica para el movimiento celular. Observamos que, todo ello conlleva a la desorganización del citoesqueleto, pérdida de los contactos focales y pérdida de la capacidad migratoria de las células.

Finalmente, estrategias análogas fueron utilizadas para llevar a cabo estudios de relación estructura-actividad de las PGs. La estructura tripirrólica de prodigiosina contiene grupos amino y metoxi comunes en obatoclastax relacionados con su actividad citotóxica. El bloqueo de estos grupos mediante la adición del grupo aniónico F2B resultó en la pérdida de actividad de esta molécula. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de estos grupos en la actividad de PGs, y aportan nuevos datos para el diseño de nuevos derivados sintéticos más efectivos y menos tóxicos.

Índice

Índice

Prólogo	i
Agradecimientos	ii
Resumen	iv
I.- ÍNDICE	1
II.- ABREVIATURAS	5
III.- INTRODUCCIÓN	7
1.- Prodigininas: agentes terapéuticos de origen bacteriano	7
1.1.- Antecedentes históricos	7
1.2.- Actividad anticancerosa	9
1.2.1.- Tipos de muerte celular	11
1.2.1.1.- Apoptosis	11
1.2.1.2.- Autofagia	13
1.2.2.- Mecanismos de acción de las prodigininas	15
1.2.2.1.- Moléculas BH3 miméticas	15
1.2.2.2.- Inhibidores de Topoisomerasas I y II	17
1.2.2.3.- Transportadores de aniones	18
1.2.2.4.- Inhibidores del ciclo celular	18
1.2.2.5.- Regulación de vías de transducción de señales	19
1.2.3.- Estudios clínicos	20
1.2.3.1.- Obatoclax	20
2.- Carcinogénesis	22
2.1.- El melanoma	23
2.1.1.- Modelo de progresión de Clark	23
2.2.- Mecanismos moleculares en la progresión del melanoma	26
2.2.1.- La vía Ras/Raf/MAPK	26
2.2.2.- La vía PI3K/AKT/mTOR	28
2.2.3.- Mecanismos de regulación	31
2.2.4.- Papel de las MAPKs y mTOR en migración y metástasis	33

3.- Estrategias terapéuticas en melanoma	36
3.1.- Terapia molecular	36
3.1.1.- Inhibidores de MAPKs	37
3.1.2.- mTOR como diana terapéutica en cáncer	38
3.1.2.1.- Inhibidores de mTOR	38
3.1.2.1.1- Primera generación: Rapálogos	39
3.1.2.1.2.- Segunda generación:	
Inhibidores ATP miméticos	40
3.1.3.- Terapias combinadas en melanoma	42
IV.- OBJETIVOS	45
V.- MATERIAL Y MÉTODOS	47
1.- Reactivos	47
2.- Cultivos celulares	47
3.- Ensayos de viabilidad celular	47
4.- Técnicas de inmunodetección	48
4.1.- Inmunoblot	48
4.2.- Inmunofluorescencia	50
4.2.1.- Espectros de emisión de las prodigininas	50
5.- Tinción Hoechst	51
6.- Tinción Phalloidin	51
7.- Ensayos de co-inmunoprecipitación	52
8.- Ensayos de actividad quinasa	53
9.- Fraccionamiento subcelular	53
10.- Ensayos de resonancia de plasmón superficial (SPR)	53
11.- Ensayos de herida (<i>Wound Healing</i>)	57
12.- <i>Kinase profiling</i>	57
13.- Ensayos <i>in silico</i>	57
14.- Análisis estadístico	58
VI.- RESULTADOS	59
1.- Caracterización del efecto citotóxico inducido por prodigininas en células de melanoma	59

1.1.- Efecto citotóxico mediado por prodigiosina y obatoclax	59
1.2.- Estudio de los mecanismos de muerte celular activados por prodigiosina	60
1.2.1- Activación de autofagia y apoptosis inducida por prodigiosina	61
1.2.1.1.-Identificación de prodigiosina como antagonista de MCL-1	61
2.- Identificación de mTOR como diana molecular de prodigininas	65
2.1.- Estudio de la prodigiosina como inhibidor multi-quinasa	65
2.2.- Efecto de las prodigininas en las vías de supervivencia PI3K/AKT/mTOR y Ras/Raf/MAPK	66
2.3.- Prodigininas, inhibidores duales de los complejos mTORC1 y mTORC2	68
2.3.1.- Bloqueo del <i>feedback</i> negativo S6K1/ IRS-1 en la vía mTOR	68
2.3.2.- Inhibición de los complejos mTORC1 y mTORC2 <i>in vitro</i>	69
2.4.- El papel de mTOR en el efecto citotóxico de las prodigininas	71
2.5.- Caracterización de la unión de las prodigininas al centro activo de mTOR	73
2.5.1.- Cinética, afinidad y especificidad de la interacción	73
2.5.2.- Prodigininas, inhibidores ATP no-miméticos	76
2.5.3.- Modelo <i>in silico</i> de la interacción de las prodigininas al centro activo de mTOR	79
2.5.4.- Estudios SAR (<i>Structure-Activity Relationship</i>)	80
2.6.- Tratamientos combinados con inhibidores de MAPK y PI3K	85
2.7.- El papel de las fosfatasa PP1/PP2A en el efecto citotóxico de las prodigininas	86
3.- Caracterización de las propiedades antimetastásicas de las prodigininas	90
3.1.- Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en los efectos antimetastásicos	90

3.2.- Inhibición de la migración y adhesión celular mediados por las prodigininas	96
VII.- DISCUSIÓN	99
1.- Potencial quimioterapéutico de las prodigininas	99
1.1.- Efecto citotóxico de prodigininas en células de melanoma	100
1.2.- Tipos de muerte celular inducidos por prodigininas	101
1.3.- Relación estructura-actividad de las prodigininas	102
2.- Dianas moleculares de las prodigininas	103
2.1.- Prodigininas, moléculas BH3 miméticas	103
2.2.- mTOR como diana molecular de prodigininas	105
2.2.1.- Prodigininas, inhibidores ATP-no competitivos	106
2.3.- Fosfatasas como dianas moleculares de prodigininas	108
2.4.- Otras dianas moleculares	109
3.- Mecanismos antimetastásicos de las prodigininas	110
4.- Expectativas futuras de las prodigininas como agentes quimioterapéuticos	111
4.1.- Estrategia terapéutica: terapia molecular combinada	112
4.1.1.- Inhibición dual de la vía PI3K y MAPK	112
4.1.2.- Inhibición dual de vías de supervivencia y proteínas BCL-2	112
4.2.- Pros y contras de las prodigininas como quimioterapéuticos	114
VIII.- CONCLUSIONES	116
IX.- BIBLIOGRAFÍA	118
X.- ANEXOS	129
Anexo I	129
Anexo II	139

- Abreviaturas -

4E-BP1	Eukariotic initiation factor 4E binding protein 1
ADF	Actin depolymerizing factor
AMPK	AMP-activated kinase
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor1
Atg	Autophagy-related genes
ATP	Adenosin triphosphate
BAD	Bcl2-Antagonist of Cell Death
BCL-2	B cell lymphoma type-2
BH	BCL-2-homology domain
CDC42	Cell Division Cycle-42
CDK	cyclin-dependent kinase
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
DAG	Diacylglycerol
EGFR	Epidermal growth factor receptor
eIF-4E	Eukaryotic initiation factor 4E
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FAK	Focal adhesion kinases
FIP	Focal adhesion kinase family-interacting protein
FKBP12	FK506-binding protein of 12 kDa
FRB	FKBP12-rapamycin binding domain
GAP	GTPase-activating protein
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GPCRs	G-Protein Coupled Receptors
GSK3	Glycogen Synthase Kinase
HIF	Hypoxia induced factor
IAPs	Inhibitors of apoptosis proteins
IGF	Insulin growth factor
ILK	Integrin-linked kinases
IR	Insulin receptor
IRS-1	Insulin receptor-substrate 1
IKK-alpha	I-KappaB Kinase-Alpha
JNK	c-ju N-terminal kinase
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MDM2	Mouse double minute 2
MEFs	Mouse embryo fibroblasts
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
MLCK	Myosin Light Polypeptide kinase
mLST8	Mammalian ortholog of LST8
MNKs	MAPK-Interacting Kinases
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
MSH	Melanocyte-stimulating hormone
MSKs	Mitogen- and Stress-activated protein kinases
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC	mTOR complex
NCI	National Cancer Institute
NF-KB	Necrosis factor-kappa B

NSCLC	non-small cell lung cancer
OBX	Obatoclox
PAK	p21-activated kinases
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PG	Prodigiosin
PGs	Prodiginines
PAK	protein-21 activated kinase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIKK	Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-kinase-related kinase
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKB	Protein kinase B; AKT
PKC	Protein kinase C
PLC-Beta	Phospholipase-C-Beta
PRAS40	Proline-rich AKT substrate of 40 kDa
pRB	Retinoblastome protein
PROTOR	Protein observed with RICTOR; PRR5
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Rap	Rapamicina
RAPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR
RGP	Radial growth phase
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
ROCK	Rho kinase
ROS	Reactive oxygen species
RSKs	90 kDa Ribosomal protein S6 kinases
RTK	Receptor tyrosine-kinase
SAPK	Stress-activated protein kinase
S6K1	Ribosomal S6 kinase 1
SGK1	Serum- and glucocorticoid-induced protein kinase-1
SSH	Slingshot phosphatase
STK11	Serine threonine kinase 11; LKB1
TM	carboxy-terminal hydrophobic domain
TNF	Tumoral necrosis factor
TSC	Tuberous sclerosis complex
ULK	unc-51-like kinase 1
VEGF	Vascular endothelial cell growth factor
VGP	Vertical growth phase
VPS34	Vacuolar sortong protein-34

Introducción

1. Prodigininas: agentes terapéuticos de origen bacteriano.

Diversas moléculas de origen bacteriano están siendo evaluadas como agentes quimioterapéuticos a raíz de su potente actividad anticancerosa en diferentes tipos tumorales. Entre ellas, en los últimos años, ha ido en aumento el interés por el estudio, diseño y síntesis de nuevas moléculas sintéticas derivadas de la familia de las prodigininas. En el siguiente bloque, haremos un repaso desde los estudios previos hasta los últimos avances en el conocimiento de los mecanismos de acción de estas moléculas. En vista de los resultados pre-clínicos y clínicos obtenidos con prodigiosina y obatoclax, tomaremos especial atención en ambas moléculas.

1.1. Antecedentes históricos.

Las Prodigininas (PGs) son compuestos naturales derivados del metabolismo de bacterias gram positivas y negativas como *Streptomyces* y *Serratia*. Estas bacterias, del género *Bacillus*, crecen bien en alimentos ricos en almidón y en lugares húmedos. La pigmentación rojiza de estos metabolitos secundarios ha dado pie a varias anécdotas a lo largo de la historia, atribuyéndose la apariencia sanguinolenta de alimentos y estatuas, a milagros y augurios [Gaughran ER, 1969; Bennet JW et al., 2000]. Aunque existen evidencias ya desde la época de Pitágoras (501 aC) de contaminaciones debidas a *Serratia marcescens*, la primera referencia la encontramos en el año 332 aC. El pan “ensangrentado” partido por los soldados de Alejandro Magno fue considerado un buen augurio en el asedio de la ciudad de Tiro. A lo largo de la edad media también queda constancia de la aparición de “sangre” en el pan utilizado en las Eucaristías prediciendo el derramamiento de sangre cristiana (año 1169, Alsen, Dinamarca). Quizás el caso más conocido sea el “Milagro de Bólsena” (año 1263, Bólsena, Italia) el cual quedó plasmado en un fresco del Vaticano pintado por Rafael en 1512. Entre 1819 y 1823, los estudios llevados a cabo por el doctor Vincenzo Sette y el farmacéutico Bartolomeo Bizio (Padua, Italia) desmontaron las teorías de supersticiones y milagros al demostrar que el aspecto sanguinolento de ciertos alimentos era producido por un microorganismo al que le dieron el nombre de *Serratia marcescens*. Aunque erróneamente lo clasificaron, en un principio, como un hongo, estos estudios establecieron las bases para posteriores estudios microbiológicos [Yu VL, 1979].

Son diversas las aplicaciones que se les han dado a bacterias del género *Serratia*. Cultivos de *S. marcescens*, al creerse inocuos, se utilizaron como marcadores biológicos en estudios de transmisión de infecciones. Estos estudios se llevaron a cabo tanto en el Reino Unido como en Estados Unidos entre 1906-1960. Sin embargo, hoy en día es bien conocida la patogenicidad de esta bacteria. Son diversos los casos de infecciones por *Serratia* en hospitales. Además son numerosos los estudios sobre la citotoxicidad de las PGs tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* [Pérez-Tomás R et al., 2010].

Desde finales del s.XIX encontramos los primeros indicios de las propiedades anticancerosas de las PGs. Entre 1893 y 1960, las toxinas de Coley (aisladas a partir de una mezcla de cultivos de *Streptococcus sp.* y *S.marcescens*) se utilizaron para el tratamiento de múltiples tipos de cáncer [Carswell EA et al., 1975]. El efecto antitumoral de estas toxinas se podría atribuir a la presencia de PGs en estos cultivos.

La resolución de las estructuras químicas de PGs y el desarrollo de nuevos y mejorados compuestos sintéticos derivados de éstas, ha propiciado un gran interés por estas moléculas en la industria farmacéutica. La prodigiosina (PG) y los compuestos sintéticos PNU156804 y obatoclax son un ejemplo del potencial de estas moléculas como agentes terapéuticos [Williamson NR et al., 2007] (**figura I1**).

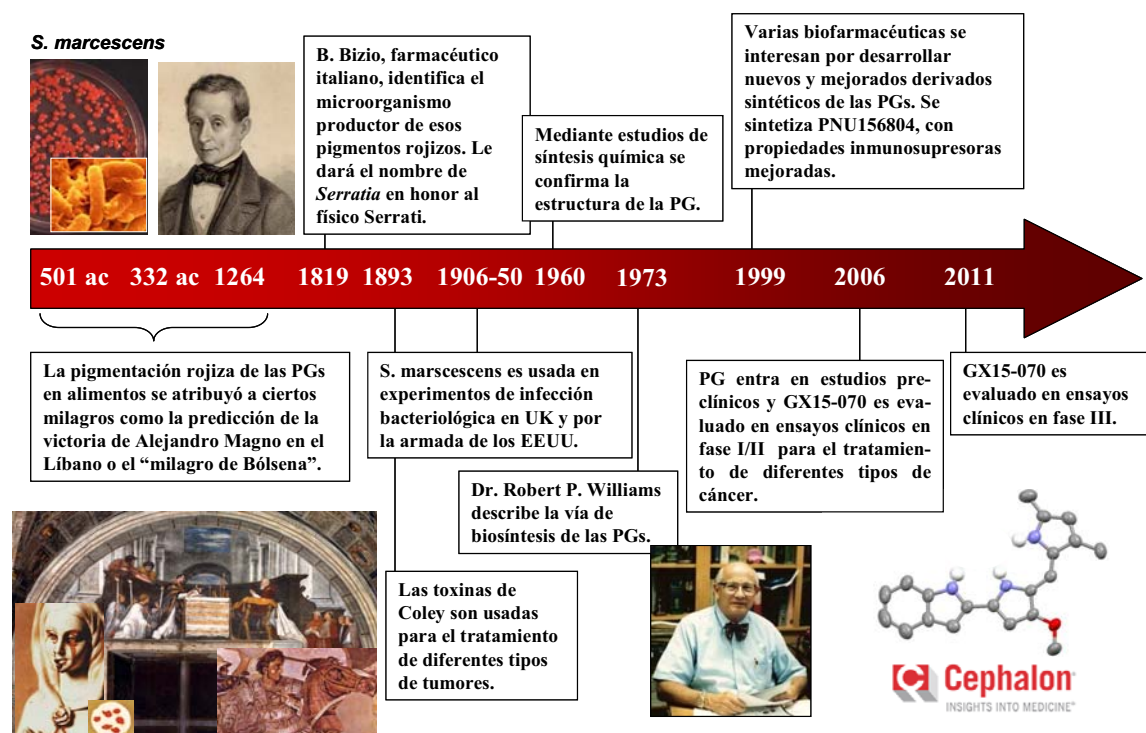


Figura I1. Cronograma de las prodigininas.

1.2. Actividad anticancerosa.

Las PGs son una familia de compuestos tripirrólicos que presentan numerosas actividades biológicas incluyendo antimicrobiana, antimalárica, inmunosupresiva y anticancerosa [Pérez-Tomás R et al., 2010]. Propiedades con una potencial aplicabilidad farmacéutica, aunque quizás sea ésta última propiedad, la anticancerosa, la que ha despertado mayor interés en este campo (**tabla I1**).

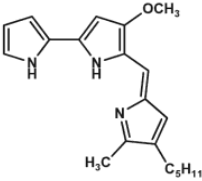
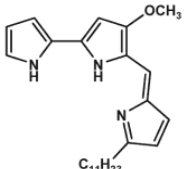
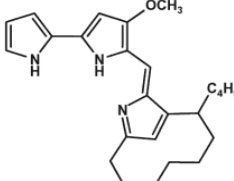
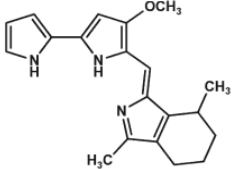
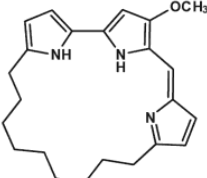
Prodigininas	Bacterias productoras	Actividad anticancerosa
<p>Prodiginosina</p> 	<p><i>Serratia</i> 39006 <i>Serratia marcescens</i> <i>Serratia plymuthica</i> <i>Hahella chejuensis</i> <i>Pseudomonas magnesorubra</i> <i>Vibrio psychroerythreus</i> <i>Vibrio gazogenes</i> ATCC 29988 <i>Vibrio ruber</i> sp.nov.</p>	<p>Madin-Darby canine kidney (MDCK), Chinese hamster ovary (CHO), Human epithelial carcinoma (HeLa), Green monkey kidney (Vero (-317), Human myeloid leukemia (U937), Human acute leukemia T cells (Jurkat-T), Human lung carcinoma (A549, NCI-H460), Human colon adenocarcinoma (DLDI, HT29, SW-620), Human breast carcinomas (MDA-MB-231, MCF-7), Human promyeloblast (HL60), Mouse fibroblast (MC-3T3-E1), Small cell lung cancer (GLC4), Human myeloma (NSO), Human Burkitt lymphoma (Ramos), Human gastric carcinoma (HGT-1), Human neuroblastomas (LAN-1, IMR-2, SH-SY5Y, SK-N-AS).</p>
<p>Undecilprodiginosina</p> 	<p><i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (2) <i>Streptomyces longisporus ruber</i> <i>Saccharopolyspora</i> sp. nov. <i>Actinomadura madurae</i> <i>Streptomyces griseus</i> <i>Streptomyces lividans</i> <i>Streptomyces</i> sp. CP1130</p>	<p>Mouse lymphoma (P388), Human promyeloblast (HL60), Human lung carcinoma (A549, SPCA4), Human hepatic carcinoma (BEL-7402), Baby hamster kidney (BHK)</p>
<p>Streptorubin B (GX15)</p> 	<p><i>Streptomyces coelicolor</i> A3 (2) <i>Saccharopolyspora</i> sp. nov.</p>	
<p>Cicloprodiginosina</p> 	<p><i>Pseudoalteromonas dentrificans</i> <i>Beneckeia gazogenes</i> <i>Ateromonas rubra</i></p>	<p>Human acute leukemia T cells (Jurkat-T), Human promyeloblast (HL60), Human hepatic carcinoma (Huh-7, HCC-M, HCC-T), Human hepatoblastoma (HepG2), Rat hepatic carcinoma (WiDr, SW480)</p>
<p>Ciclononilprodiginosina</p> 	<p><i>Actinomadura pelletieri</i> <i>Actinomadura madurae</i></p>	

Tabla I1. Clasificación estructural de las prodigininas.

Las PGs se caracterizan por su esqueleto pirrolildipirrolilmetano y pueden clasificarse en cuatro clases estructurales según su estructura lineal o cíclica. Son

tripirroles lineales prodigiosina (que contiene un grupo metil en C-2 y un grupo pentil en C-3 del anillo pirrólico C) y undecilprodigiosina (que contiene una cadena undecil en la posición C-2). Con estructura cíclica encontramos butil-meta-cicloheptilprodigionina (streptoburin B o GX15, que contiene un anillo entre las posiciones 2 y 4 del anillo pirrólico C), cicloprodigiosina (contiene un anillo entre las posiciones 3 y 4 del anillo pirrólico C y un grupo metil en la posición C-2, y ciclononilprodigiosina (prodigionina macrocíclica con un anillo entre la posición 2 del pirrol C y la posición 10 del pirrol A).

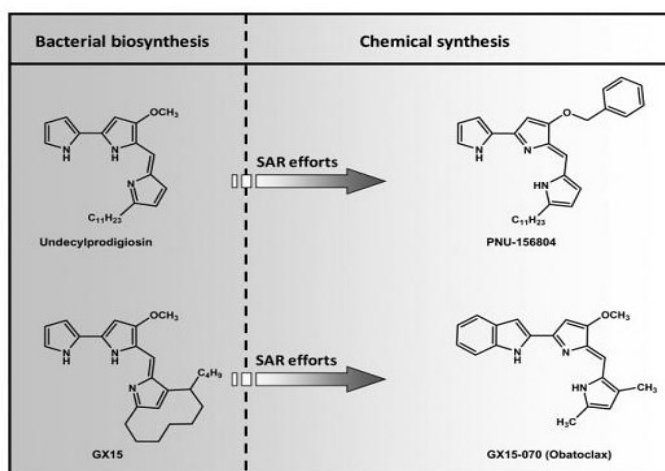
Las propiedades citotóxicas de las PGs han sido ampliamente descritas ya desde 1977 cuando Fullan y colaboradores observaron la actividad antitumoral de PG en ratones [Fullan NP et al., 1977].

Son numerosos los estudios que describen sus efectos proapoptóticos en diferentes líneas cancerosas *in vitro*, sin mostrar una marcada citotoxicidad en células normales. Dentro del programa de desarrollo terapéutico NCI/NIH llevado a cabo por el *National Cancer Institute (Division of Cancer Treatment and Diagnostics)*, la citotoxicidad de PG fue evaluada frente a un panel de 60 líneas tumorales humanas dando un valor de inhibición de la viabilidad celular del 50% (IC50) de 2,1 μM de media. Resultados que pueden ser consultados en www.dtp.nci.nih.gov. Estos resultados presentaron las PGs como prometedores agentes anticancerosos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer incluyendo el cáncer de mama, pulmón, hígado, colon, diferentes tipos de leucemias, etc. Además, el progreso que se ha conseguido recientemente en la comprensión de la biosíntesis y regulación de las PGs ha permitido el desarrollo de moléculas sintéticas más eficaces teniendo en cuenta aspectos como la relación estructura-actividad de estas moléculas [Williamson NR et al., 2007] (**figura I2**).

Figura I2. Principales derivados sintéticos de las prodigininas en uso terapéutico.

PNU156804, es la prodiginina con propiedades inmunosupresoras por excelencia. Fue diseñado a partir de estudios SAR (*Structure-Activity Relationship*) mediante la modificación del grupo metoxi de la undecilprodigiosina. Obatoclax, principal prodiginina anticancerosa, se diseñó con el fin de modificar el anillo pirrólico A de GX15.

Williamson NR et al., 2007



Son varias las compañías biofarmacéuticas que han iniciado programas de investigación con la finalidad de desarrollar moléculas sintéticas derivadas de las PGs más activas y menos tóxicas. Son el ejemplo de moléculas como PNU156804 desarrollado en Pharmacia&Upjohn [Mortellaro A et al., 1999; D'Alessio R et al., 2000] y obatoclax (GX15-070) desarrollado en GeminX (actualmente adquirido por Cephalon, Inc.) [Trudel S et al., 2007]. Hasta 2003, el derivado sintético de la undecilprodigiosina PNU156804 era considerado uno de los derivados más prometedores para su aplicación clínica como inmunosupresor. Sin embargo, hoy en día las investigaciones se han volcado en obatoclax, un indolil-dipirrometano derivado del GX15 (streptoburin B), actualmente en estudios clínicos en fase III como agente antineoplásico [Paik PK et al., 2011].

1.2.1. Tipos de muerte celular.

Las células regulan la supervivencia y muerte celular a través de diferentes mecanismos. Del equilibrio entre estos mecanismos depende el buen funcionamiento celular. Existen varios tipos de muerte celular que se dan de manera regulada, entre ellos apoptosis y autofagia.

1.2.1.1. Apoptosis.

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que no sólo afecta a células dañadas debido, por ejemplo, a tóxicos; sino que, además, este proceso es indispensable en el desarrollo normal y mantenimiento de la homeostasis tisular [Kerr JF et al., 1972]. Este mecanismo está regulado por dos vías diferentes, la vía intrínseca (o mitocondrial), y la vía extrínseca (o de receptores de muerte) (**figura I3**).

La vía intrínseca de apoptosis se inicia principalmente a través de estímulos extracelulares como factores de estrés, o bien, por daño al ADN. Esta vía es regulada por los complejos que forman entre si los diferentes miembros de la familia de proteínas BCL-2 (*B cell lymphoma type-2*). Éstos se clasifican en proteínas anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-X_L, MCL-1, BCL-W y A1) y pro-apoptóticas. Entre las proteínas pro-apoptóticas se encuentran proteínas multi-dominio (BAX, BAK y BOK) y proteínas con un solo dominio BH3 o BH3-only (BAD, BIM, NOXA, PUMA, etc). En respuesta a los estímulos de muerte/estrés celular, los complejos formados por miembros anti- y pro-apoptóticos se rompen al interaccionar las proteínas BH3-only con éstos. La rotura de

estos complejos permite la permeabilización de la membrana mitocondrial externa gracias a la formación de los poros mitocondriales que conforman BAK/BAX al oligomerizar [Zhou L et al., 2008]. A través de estos poros salen moléculas proapoptóticas al citosol, entre ellas, el citocromo c. El citocromo c, en combinación con Apaf-1 (*apoptosis protease-activating factor 1*) y la procaspasa-9 (caspasa iniciadora en forma inactiva), conforman un complejo multimérico, el apoptosoma. La formación de este complejo permite la activación de la procaspasa-9. En su forma activa, la caspasa-9 promueve, a su vez, la activación de las caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7) que integran la vía, y que en último lugar inducen la muerte celular gracias a su actividad proteasa [Willis SN et al, 2007].

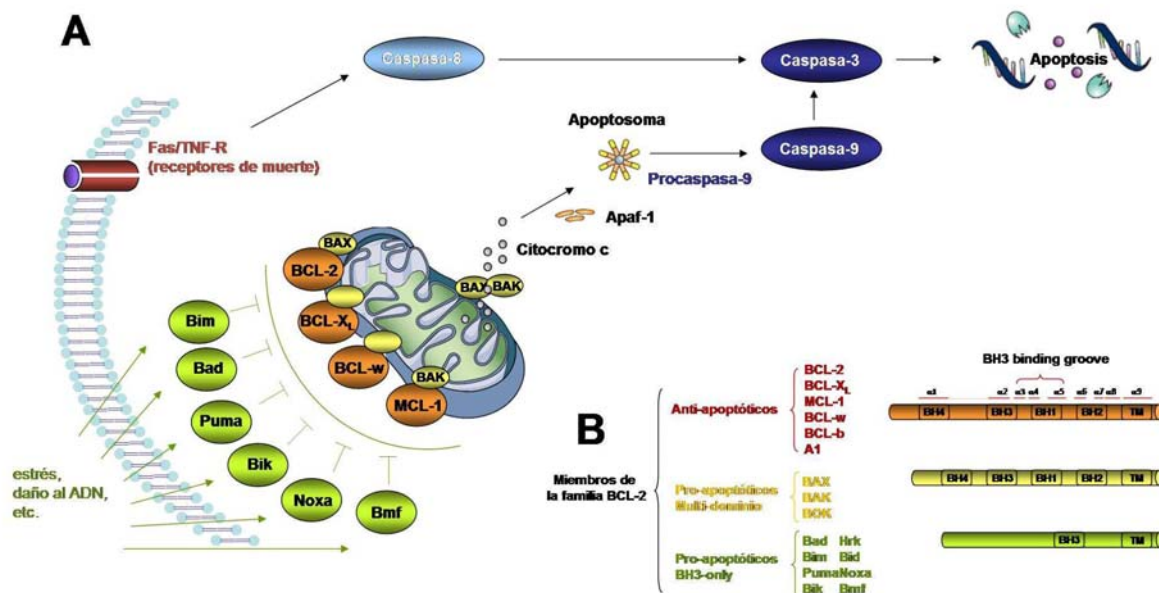


Figura 13. (A) Vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. (B) Miembros de la familia BCL-2. Se indican los diferentes miembros anti-apoptóticos y pro-apoptóticos de la familia BCL-2 con sus respectivos dominios conservados BH de homología (*BCL-2-homology*) y los dominios TM (*carboxy-terminal hydrophobic*).

La vía extrínseca es estimulada por señales extracelulares que activan diferentes tipos de receptores de muerte celular: la proteína transmembrana Fas, TRAIL o el factor de necrosis tumoral (TNF). La vía extrínseca converge con la vía intrínseca tras la activación de la caspasa-8 y -10.

Durante el proceso apoptótico se dan cambios morfológicos característicos de este tipo de muerte celular. El citoplasma y el núcleo se condensan sin que se produzca rotura de la membrana celular. Los elementos deteriorados del citoplasma y núcleo (orgánulos, ADN, etc) forman los cuerpos apoptóticos de apariencia globular.

1.2.1.2. Autofagia.

La autofagia, o muerte celular programada tipo II, es un proceso homeostático, de degradación catabólica, donde las proteínas y orgánulos celulares son envueltos por autofagosomas (vesículas citoplasmáticas), digeridos y reciclados. La digestión de estos componentes se da una vez los autofagosomas se han fusionado con los lisosomas para formar los autolisosomas, donde actúan las hidrolasas. Los metabolitos resultantes son devueltos al citosol para su reciclaje. De esta manera, en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, hipoxia y otras señales de estrés celular, la autodegradación de componentes intracelulares permite el reciclaje de aminoácidos proveyendo así de nutrientes a nivel intracelular, lo que permite el mantenimiento del metabolismo celular [Hoyer-Hansen M et al., 2008] (**figura I4**).

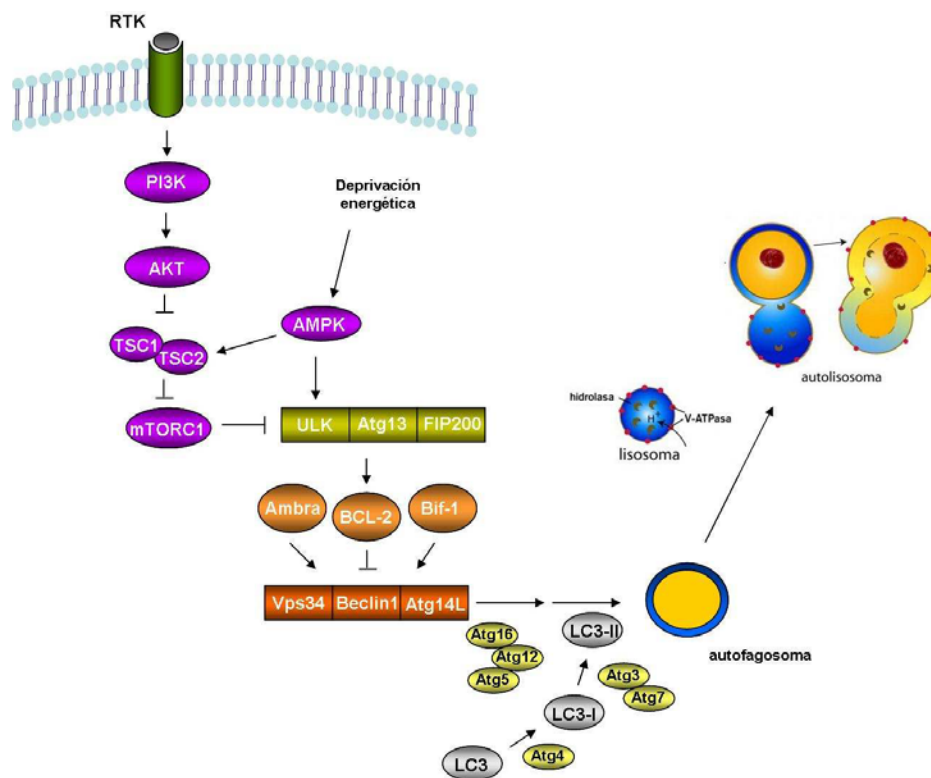


Figura I4. Vías implicadas en la regulación de autofagia. La formación de los autofagosomas es inducido por el complejo ULK, que es regulado por las vías mTOR y AMPK.

La formación de los autofagosomas es regulada a través de los genes *atg* (*autophagy-related genes*). La vía mTOR contribuye al aumento de la expresión de los genes *atg*, además regula S6K1, un regulador positivo de autofagia [Neufeld TP, 2010]. El complejo mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex-1*) inhibe este

mecanismo mediante la fosforilación de Atg13 reduciendo la interacción con ULK1 (*unc-51-like kinase 1*), que junto con Atg17 conforman el complejo que regula la iniciación de la autofagia. La inhibición de mTORC1, que forma complejo con FIP200 (*focal adhesión kinase family-interacting protein of 200 kDa*) y ATG101, promueve la formación de autofagosomas [Bracho-Valdés I et al., 2011]. El autofagosoma contiene la proteína vacuolar vps34 (*vacuolar sorting protein 34*), de la familia PI3K-III, que forman complejo con beclin 1. Este complejo es esencial para el reclutamiento de las proteínas Atg. Durante la fase inicial, la formación del complejo Atg5-12-16 promueve el reclutamiento y conversión de LC3-I a la forma lipídica LC3-II (unida a membrana). Tras la formación del autofagosoma, las proteínas Atg son recicladas a citosol, mientras que LC3-II permanece en los autofagosomas maduros hasta que la fusión con lisosomas es completada.

En cáncer, la autofagia juega dos papeles aparentemente contradictorios: como supresor de tumores previniendo la acumulación de proteínas y orgánulos dañados; y como mecanismo de supervivencia celular favoreciendo el crecimiento tumoral. Sin embargo, la activación de autofagia también suprime la tumorigénesis por lo que, tanto moléculas pro- como anti-autofágicas están siendo evaluadas como posible terapia contra el cáncer. Todavía se desconoce la base molecular de esta aparente controversia. Se sabe que las células tumorales activan la autofagia en respuesta a estrés celular, debido a los bajos niveles de oxígeno y nutrientes, y al aumento de demanda metabólica relacionada con su rápida proliferación. Esta activación, además, se encuentra relacionada con resistencia a quimioterapéuticos [Yang ZJ et al., 2011]. En modelos preclínicos se ha observado que la inhibición de autofagia mediante clorquina, u otros inhibidores de autofagia, reestablece la quimiosensibilidad y favorece la muerte de las células tumorales. Por otro lado, la inhibición de mTOR seguida de la activación de autofagia está dando resultados prometedores en el tratamiento diferentes tipos de cáncer que presentan una elevada quimioresistencia. Además, diversos inhibidores de mTOR en uso clínico han mostrado la capacidad de activar simultáneamente la apoptosis, efecto que potencia la efectividad del tratamiento. Este efecto se ha atribuido al *cross-talk* que existe entre ambos mecanismos. Por un lado, estos mecanismos comparten diversos mediadores BCL-2 y BCL-X_L, y por otro, se sabe que, tras la activación de la autofagia, las hidrolasas lisosomales, que salen a citosol desde los

autolisosomas, facilitan la acción de las caspasas. Estos resultados establecen la autofagia como potencial diana terapéutica.

1.2.2. Mecanismos de acción de las prodigininas.

La caracterización de los efectos citotóxicos en diferentes líneas tumorales permitió establecer los posibles mecanismos de acción de las PGs. Entender bien los mecanismos de acción requiere de la identificación de sus dianas moleculares, así como profundizar en los estudios SAR que pretenden identificar los grupos funcionales críticos en la actividad clínica que presentan estas moléculas tripirrólicas. Avances en el conocimiento de estos aspectos serán cruciales para el diseño de nuevos agentes terapéuticos, así como lo fueron para el desarrollo de obatoclax (OBX) [Williamson NR et al., 2007].

Los mecanismos de internalización de las PGs son aún desconocidos. Se postuló que, gracias a su lipofiliidad, estas moléculas podrían atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva, o bien integrarse en la membrana y ser transportada en vesículas. Una vez en el dominio intracelular, las PGs localizan en vesículas ácidas, como mitocondrias y lisosomas, e internalizan en el núcleo. Se ha demostrado que las PGs, en general, serían capaces de promover diversos mecanismos de acción que llevan a la muerte celular [Pérez-Tomás R et al., 2003] (**figura I5**).

1.2.2.1. Moléculas BH3 miméticas.

De entre las PGs, la única molécula descrita como BH3 mimética hasta la fecha es OBX. En la membrana mitocondrial, OBX se une a las proteínas de la familia BCL-2 a través del *BH3 binding groove*. Esta interacción desplaza BAX y BAK permitiendo la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación del citocromo c. La salida del citocromo c a citosol, como vimos más detalladamente en el apartado 1.2.1.1., induce la muerte celular por apoptosis [Bajwa N et al., 2011]. Sin embargo, se ha observado que este no es el único mecanismo de muerte activado por OBX. En células de carcinoma se observó, además, la activación de autofagia tras el tratamiento con OBX [Pan J et al., 2010].

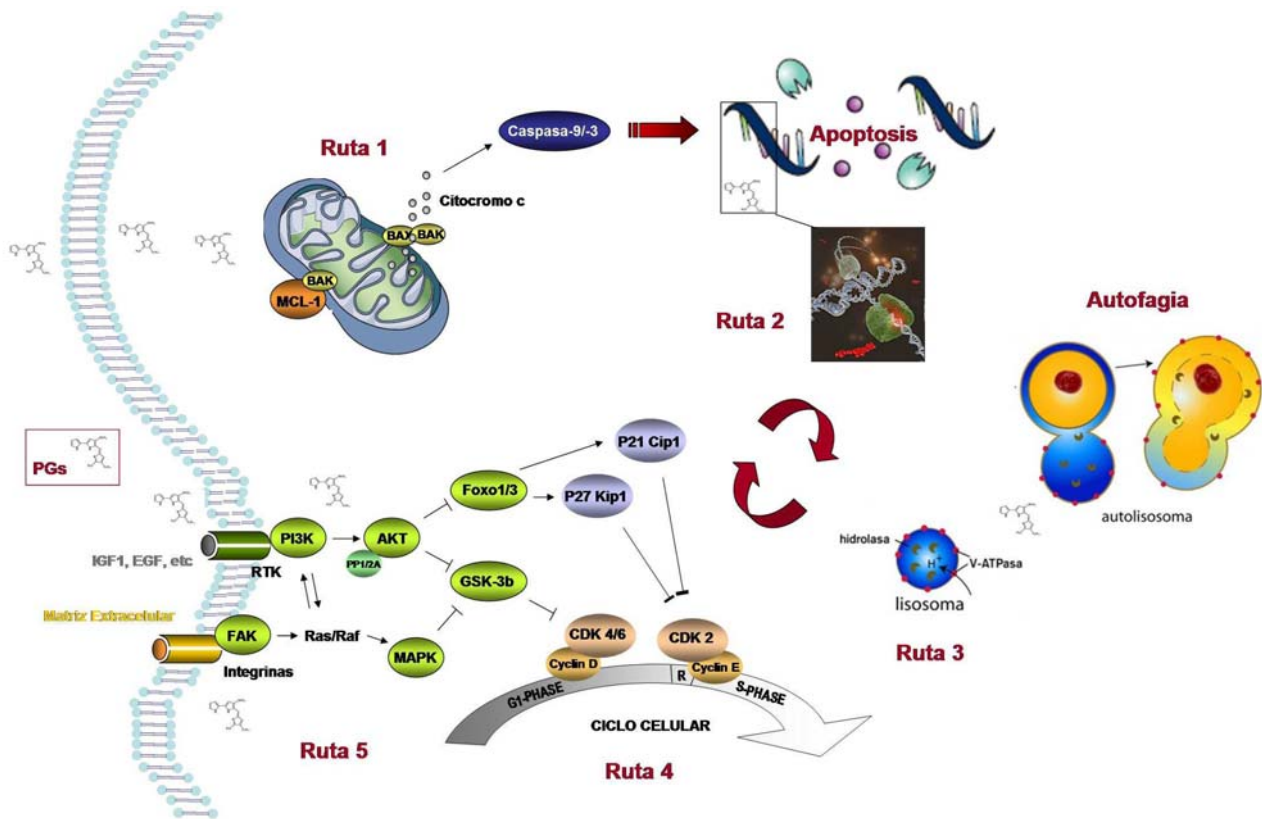


Figura 15.- Mecanismos de acción de las prodigininas. Ruta 1: Inhibición de proteínas BCL-2. **Ruta 2:** Rotura de la doble cadena de ADN e inhibición de topoisomerasas. **Ruta 3:** acidificación intracelular mediante el transporte simporte de H^+/Cl^- . **Ruta 4:** Parada del ciclo celular. **Ruta 5:** Inhibición de vías de transducción de señales involucradas en supervivencia celular.

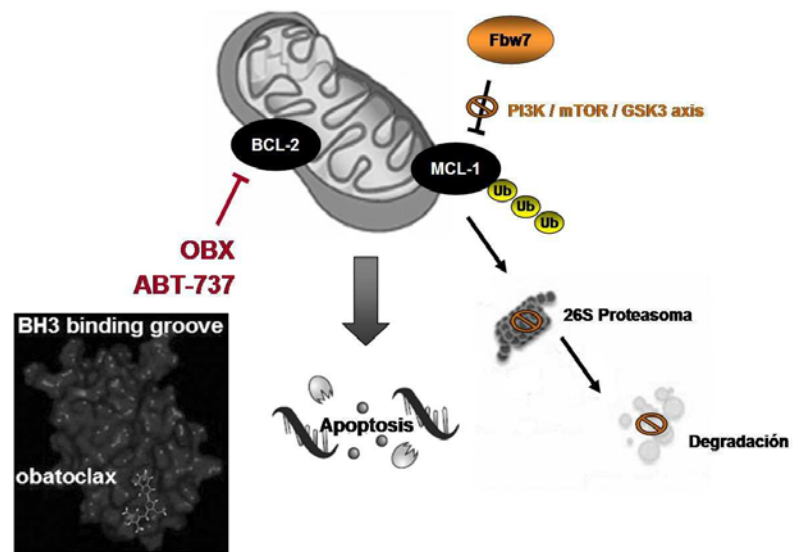
La familia de proteínas BCL-2 son atractivas dianas terapéuticas ya que se encuentran reguladas positivamente en el 50% de cánceres [Kang MH et al., 2009]. En cáncer, los niveles de proteínas BCL-2 se encuentran desmesuradamente elevados debido a la pérdida de actividad de E3 ubiquitin ligasas, las cuáles, en condiciones normales median la ubiquitinación y degradación de proteínas BCL-2. Esto, por una parte, permite a la célula tumoral escapar de los mecanismos de muerte celular y, por tanto favorece la tumorigénesis; y por otra, le confiere al tumor resistencia frente a los tratamientos con agentes anticancerígenos pro-apoptóticos [Schmitt CA et al. 2000; Inuzuka H et al., 2011].

Las moléculas BH3 miméticas (también conocidas como inhibidores BH3 o de BCL-2) son capaces de evitar que las células cancerígenas escapen a los mecanismos apoptóticos de muerte celular. Es por esta razón que se les considera prometedores agentes anti-cancerígenos, especialmente en la terapia contra tipos de cáncer resistentes

a las actuales quimioterapias [Hartman ML et al., 2012]. Este es el caso de OBX, capaz de unirse a un amplio espectro de proteínas de la familia BCL-2 (incluyendo BCL-2 y MCL-1) [Zhai D et al. 2006].

Las moléculas BH3 miméticas como OBX y ABT-737, debido a su hidrofobicidad, son capaces de localizar en la membrana mitocondrial externa, en dónde se unen al surco del dominio BH3 (*BH3 binding groove*) de las BCL-2 inhibiendo su actividad anti-apoptótica [Nguyen M et al., 2007; Paik PK et al., 2011] (**figura I6**).

Figura I6. Mecanismos de resistencia frente a qui-mioterapéuticos en célu-las cancerosas. En cáncer, la pérdida de actividad de Fbw7 evita la ubiquitinación de MCL-1, y por tanto, su degradación vía proteasoma. Este mecanismo, en condiciones no patológicas se da de una manera GSK3-dependiente. Los elevados niveles de proteínas BCL-2 anti-apoptóticas confieren a las células cancerosas una vía de escape a la muerte celular. Esta vía de escape es bloqueada por OBX o ABT-737, capaces de interaccionar en el *BH3 binding groove*.



Los estudios realizados por P.K. Paik y colaboradores, además, demostraron que el efecto sinérgico que se consigue usando ambas moléculas de manera combinada, permite superar la resistencia mediada por los elevados niveles de MCL-1 en cáncer.

1.2.2.2. Inhibidores de Topoisomerasas I y II.

Las moléculas capaces de interaccionar con el ADN regulan mecanismos centrales de los que dependen diversas funciones celulares, incluyendo la replicación del ADN y la expresión génica [Palchadhuri R et al., 2007].

Las PGs son capaces de llegar al núcleo y su estructura plana les permite intercalarse en el ADN inhibiendo la acción de las topoisomerasas. Concretamente, PG fue descrito como inhibidor dual de la topoisomerasa I y II [Montaner B et al., 2005]. Las topoisomerasas son enzimas que relajan la doble cadena del DNA permitiendo el

proceso de replicación. El mecanismo por el cual se inhibe la acción de las topoisomerasas todavía no está claro, sin embargo se cree que la interacción de PG en el surco pequeño del ADN crea un impedimento que evita la progresión de las topoisomerasas. PG al ser una molécula rica electrónicamente, no sólo es capaz de unirse al ADN, sino también de promover la rotura oxidativa de su doble cadena. Las células responden al colapso en la maquinaria de replicación y al daño del ADN mediante la activación de varias vías que incluyen parada de ciclo, mecanismos de reparación del ADN, y apoptosis.

1.2.2.3. Transportadores de aniones.

El mantenimiento de la homeostasis del pH citoplasmático es crítico para el buen funcionamiento de las proteínas involucradas en los diferentes procesos celulares, incluyendo las proteínas reguladoras del ciclo celular. Se encontró que diferentes miembros de las PGs eran capaces de desacoplar ambas V- y F-ATPasas (H^+ -ATPasa) promoviendo el transporte simporte de H^+/Cl^- e inducir la alcalinización de compartimentos ácidos celulares como mitocondrias y lisosomas y la acidificación del citosol promoviendo la apoptosis [Konno H et al, 1998; Castillo-Ávila W et al., 2005]. Diversos estudios han relacionado la actividad de las PGs como transportadores de iones con su efecto citotóxico [Gale PA et al., 2005; Díaz de Greñu B et al., 2011].

1.2.2.4. Inhibidores del ciclo celular.

El ciclo celular regula el crecimiento y división celular en respuesta a señales extracelulares (p.e. factores de crecimiento). El ciclo celular es regulado por ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Las ciclinas actúan como subunidad reguladora de las CDKs, de manera que, al interaccionar entre ellas forman complejos activos que promueven la progresión entre las diferentes fases del ciclo celular. En primer lugar, en respuesta a factores de crecimiento se forma el complejo ciclina D/CDK4 que promueve la activación del factor de transcripción E2F que regula la transcripción de genes que codifican para otras ciclinas como ciclina E y B. La ciclina E forma complejo con CDK2 regulando la transición G1-S, mientras que la ciclina B, unida a CDK1, regula la transición G2-M [Loog M et al., 2005].

En respuesta a diferentes señales de estrés celular, como es el daño al ADN causado por quimioterapéuticos, se induce la parada del ciclo celular a través de la activación de proteínas supresoras de tumores como p53 que activa p21, un inhibidor de

CDKs, que promueve la parada de ciclo en fase G1. Se observó que PG aumenta la actividad del inhibidor de CDKs p21, a la vez que, inhibe la expresión de ciclina E y de CDK2. En consecuencia PG induce parada de ciclo a nivel de G1/S, sin embargo, este efecto resultó ser independiente de p53 [Soto-Cerrato V et al., 2007a].

1.2.2.5. Reguladores de vías de transducción de señales.

Las células responden a señales o estímulos extracelulares, como nutrientes, factores de crecimiento, hormonas, disponibilidad energética o de oxígeno, etc. a través de circuitos moleculares formados por receptores, enzimas, canales y proteínas reguladoras que detectan, amplifican e integran las diversas señales a través de lo que se conoce como las vías de transducción de señales. Estas vías convierten estas señales extracelulares en determinadas respuestas intracelulares involucradas en los diferentes procesos celulares como es la regulación de la expresión génica, la regulación de una vía metabólica o la migración celular. Los factores de crecimiento, entre otros estímulos, regulan vías tan importantes para la supervivencia, crecimiento y proliferación celular como son la vía de las *mitogen-activated protein kinases* MAPK o la vía *phosphatidylinositol-3-kinase* PI3K (revisadas en el apartado 2.2.). Estas vías se encuentran desreguladas durante el proceso de carcinogénesis favoreciendo la proliferación descontrolada, migración e invasión a otros tejidos de las células cancerígenas [Bogenrieder T et al., 2003].

Existen evidencias que apuntan a que el efecto citotóxico de las PGs está mediado a través de vías como la vía MAPK o la vía PI3K. Previamente, en nuestro grupo de investigación observamos la desfosforilación de AKT acompañada de la activación de GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*), dos de los principales efectores de la vía PI3K, tras el tratamiento de células de cáncer de mama MCF-7 con PG [Soto-Cerrato V et al., 2007b]. Además, el efecto citotóxico resultó ser GSK3 β -dependiente, apuntando a una posible diana dentro de esta vía. Sin embargo, GSK3 β es sustrato común tanto de la vía PI3K/AKT como de la vía MAPK [Manning BD et al., 2007]. La interconexión entre ambas vías podría explicar los efectos de las PGs descritos también en la señalización MAPK relacionada con las *stress-activated protein kinase* (SAPK)/c-jun N-terminal kinase (JNK) y p38-MAPK [Montaner B et al., 2002].

Estos efectos observados en vías de señalización tan importantes en la supervivencia y progresión del cáncer, hace pensar que efectores críticos de estas vías serían posibles dianas moleculares de PGs. La identificación de proteínas quinasas como nuevas dianas ayudaría a esclarecer qué mecanismos moleculares son realmente los impulsores de sus propiedades anticancerígenas.

1.2.3. Estudios clínicos.

Diversas PGs han sido ensayadas tanto como agentes inmunosupresores, como anticancerosos en modelos *in vitro* e *in vivo*. Los ensayos preclínicos usando PGs naturales como agentes anticancerígenos empezaron en 2006 (llevados a cabo por Aida Pharmaceuticals). El objetivo de estos ensayos se centró en aprovechar las propiedades citotóxicas de PG para desarrollar tratamientos no invasivos contra el cáncer de páncreas [Williamson NR et al., 2007]. Sin embargo, estos ensayos no progresaron a estudios clínicos debido a la reducida ventana terapéutica de PG y a los estudios infructuosos realizados *in vivo* en ratones inoculados con células cancerosas de diferente origen, incluyendo de mama, ovario o melanoma. Aunque PG no estuvo a la altura de las expectativas como agente antitumoral, los numerosos estudios permitieron establecer las bases para el diseño de nuevos agentes terapéuticos.

1.2.3.1. Obatoclax.

El diseño y síntesis de OBX fue uno de los proyectos pioneros en el desarrollo de moléculas antagonistas de proteínas BCL-2 [Nguyen M et al., 2007]. Las proteínas de la familia BCL-2 juegan un papel central controlando los eventos que desembocan en la muerte o supervivencia de la célula mediante la regulación de la vía intrínseca de la apoptosis.

Ya desde 2006, ensayos clínicos en fase I/II habían probado la efectividad de OBX tanto como agente individual como dual (en combinación con otros fármacos) en el tratamiento de múltiples tipos de leucemia, mieloma múltiple, linfoma y tumores sólidos dando resultados bastante prometedores [Bayés M et al., 2007; Schimmer AD et al., 2008; O'Brien SM et al., 2009; Hwang JJ et al., 2010; Paik PK et al., 2010, Ishitsuka K et al., 2011]. OBX, también ha mostrado su efectividad como agente individual en células de cáncer de pulmón NSCLC (*non-small cell lung cancer*) o en combinación con cisplatino (usado en tratamientos de cáncer de pulmón en estado avanzado)

mediante la rotura del complejo MCL-1/BAK [Li J et al., 2008; Katzel JA et al., 2009]. Katzel y colaboradores, observaron que OBX también actúa sinérgicamente con Gefitinib. Además, OBX ha mostrado efectos antiproliferativos en células de cáncer de mama MCF-7, MCF/18 y MTR-13 en combinación con Lapatinib y GW2974 (inhibidores de EGFR/HER-2) [Mitchell M et al., 2010], así como con Ara C en células de leucemia mieloide aguda (AML) y cultivos primarios [Konopleva M, 2008].

En 2011, Cephalon presentó los resultados clínicos en fase II, los cuáles mostraron una reducción de tumores sólidos en pacientes de cáncer de pulmón SCLC (*small cell lung cancer*) tras el tratamiento de OBX en combinación con Bortezomib (inhibidor del proteosoma), Carboplatin (agente alquilante) y Etoposide (inhibidor de la topoisomerasa). Estas terapias combinadas fueron bien toleradas por lo que OBX ha pasado a ensayos de fase III [Paik PK et al., 2011].

2. Carcinogénesis.

El melanoma es un modelo de cáncer que presenta una elevada resistencia a quimioterapéuticos. Esta resistencia se encuentra asociada a la sobre-activación de diferentes vías de transducción de señales, que como veremos, también juegan un papel crítico en el desarrollo, progresión y adquisición de las propiedades invasivas del cáncer.

En el siguiente bloque, haremos un repaso sobre las alteraciones moleculares que permiten a las células cancerígenas progresar a través de los diferentes estadios de crecimiento hasta alcanzar su potencial metastático. Estas alteraciones conllevan la desregulación de diversos procesos celulares como es la supervivencia, proliferación, migración y adhesión. Las vías MAPK y PI3K/AKT/mTOR se encuentran involucradas en estos procesos. Veremos con detenimiento la funcionalidad y regulación de estas vías, así como los diferentes mecanismos de interconexión entre ellas.

La carcinogénesis es el proceso de transformación progresiva de las células normales en células malignas. Este proceso se da como consecuencia de una expresión genética anormal seguida de una desregulación de las vías de señalización que controlan funciones celulares tan fundamentales como la supervivencia, metabolismo, crecimiento, migración y proliferación. Este proceso puede ser resultado de factores endógenos como errores en la replicación del ADN, la inestabilidad intrínseca de ciertas bases del ADN, o bien, por lesiones generadas por los radicales libres que se liberan durante el metabolismo celular. Factores exógenos como la exposición prolongada a radiación (ionizante o ultravioleta) o a carcinógenos químicos, también son la causa [Bogenrieder T et al., 2003].

A pesar de los mecanismos de reparación, ciertas alteraciones producidas quedan de manera permanente en los genes implicados en el funcionamiento normal de la célula. El equilibrio entre proliferación y muerte celular se pierde al quedar inactivados los genes que normalmente actuarían inhibiendo la proliferación (genes supresores de tumores) y la activación de genes que la estimulan o que confieren protección contra la muerte celular (oncogenes). La proliferación y crecimiento celular descontrolado

(neoplasia) permiten el desarrollo de todos los aspectos del fenotipo maligno: la inmortalización celular, la independencia de factores de exocinos para el crecimiento, la nueva formación de vasos sanguíneos y/o linfáticos, la inhibición de la respuesta inmunológica, la invasión tumoral y la metástasis [Berrocal A et al., 2009].

Aunque la base genética que induce la carcinogénesis es muy diferente dependiendo del tipo celular, los pasos celulares y moleculares que se requieren para que se produzca son muy similares en todas las líneas celulares cancerígenas.

2.1. El melanoma.

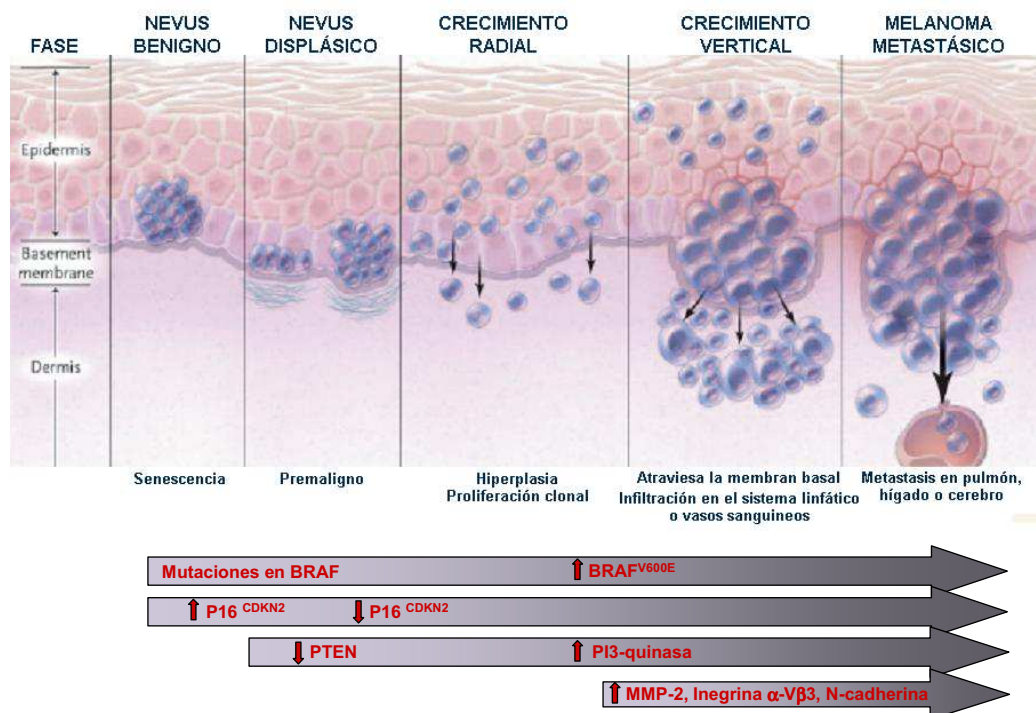
El melanoma es un tipo de cáncer dermatológico que se forma como consecuencia de un cúmulo de anomalías genéticas dentro del melanocito. Los melanocitos son aquellas células epidérmicas que se encargan de producir melanina, un pigmento de la piel, ojos y pelo cuya principal función es la de protección frente a la radiación solar ultravioleta (UV), evitando que dañen el ADN de las células de estas regiones. Además de factores ambientales, la susceptibilidad de padecer un melanoma viene dado también por factores genéticos y casos de inmunosupresión. La exposición a radiación UV promueve alteraciones genéticas (polimorfismos) que afectan a la función inmune cutánea aumentando la producción local de factores de crecimiento y la inducción de ROS (*reactive oxygen species*). Estas alteraciones permiten el desarrollo de todos los aspectos del fenotipo maligno que permiten la progresión del melanoma por las diferentes fases de crecimiento hasta adquirir la capacidad de metastatizar [MacKie RM, 2002].

2.1.1.- Modelo de progresión de Clark.

El diseño del modelo de Clark (1960) ayudó a una mayor comprensión sobre los eventos moleculares asociados con la progresión del melanoma por cada una de las fases de crecimiento hasta la adquisición de las propiedades metastásicas: conexión entre las vías moleculares, factores de riesgo, pasos de transformación neoplásica, así como los patrones de cambios moleculares en melanoma [Clark WH et al., 1984 y 1989].

En el modelo de Clark, el primer cambio fenotípico en melanocitos es el desarrollo de nevus benigno congénito o adquirido, el cuál progresa a nevus displásico. Durante estas primeras fases las células tumorales del melanoma están confinadas en la

epidermis. Éstas se extienden durante la fase de crecimiento radial, y tras esta fase, puede iniciarse una fase de crecimiento vertical. Esta fase es capaz de invadir la dermis en forma de nidos expansivos, y extenderse tanto de manera regional como a distancia, haciendo metástasis en otros órganos. A partir del modelo de Clark, Miller y colaboradores relacionaron la capacidad de progresión por las diferentes fases de crecimiento del melanoma con determinadas mutaciones genéticas que afectan la señalización molecular que contribuye a esta progresión [Miller AJ et al., 2006] (**figura I7**).



Modificado de Miller AJ et al., 2006

Figura I7.- Eventos moleculares en la progresión del melanoma.

Las anormalidades moleculares que se dan (inactivación de genes supresores de tumores o activación de oncogenes) afectan al crecimiento celular, reparación del ADN, y a la susceptibilidad a muerte celular. Este modelo propone que, en primer lugar, para la diferenciación de melanocitos (necesario para que se dé la displasia) se requiere la salida del ciclo celular y la expresión de genes que codifican proteínas necesarias para la producción de pigmentación en la piel. En este proceso juegan un papel importante tanto, α -MSH (α -melanocyte-stimulating hormone) como B-RAF (*v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog-1*). La hormona α -MSH se une al receptor MC1R estimulando la señalización intracelular a través de B-RAF/MEK/ERK y la expresión de enzimas relacionados con la producción de melanina. En consecuencia, aumenta la

expresión del factor de transcripción MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*) que regula el desarrollo y diferenciación de melanocitos y contribuye en la supervivencia de melanocitos mediante el aumento de la expresión del gen Bcl-2. Por otro lado, se da la inactivación de los genes supresores de tumores *cdkn2a/p14^{arf}*, *cdkn2b* (9p21) y la activación del oncogén B-Raf. Concretamente en melanoma, se encuentran la misma frecuencia de mutaciones somáticas de N-Ras (asociado con el 15% de melanomas) o B-Raf (asociado con el 50%) en todas las fases de crecimiento hasta el metastático. Más del 70% de los melanomas presenta sobreexpresión de RAF quinasas, un grupo de proteínas de la vía RAF-MEK-ERK que regulan la proliferación celular en respuesta a factores de crecimiento.

La vía PI3K/AKT/mTOR también se encuentra desregulada como consecuencia de mutaciones o amplificaciones de oncogenes, así como la pérdida de genes supresores de tumores, que conllevan a la activación de receptores de factores de crecimiento y a la amplificación y/o sobreexpresión de PI3K y AKT. Por ejemplo, son frecuentes en diferentes tumores mutaciones y amplificaciones en los oncogenes Akt y PIK3CA. Esta última, codifica la subunidad catalítica p110 α del complejo quinasa que, en consecuencia, causa una activación aberrante de AKT [Samuels Y et al., 2006]. La activación aberrante de AKT, además, puede ser debida a la inactivación o mutaciones en fosfatasas como PTEN [Guertin DA et al., 2005].

Ambas vías, MAPK y PI3K, además, están involucradas en la descohesión celular que permite a las células invadir la membrana basal y migrar hacia el torrente circulatorio o la circulación linfática. Aunque la adquisición de las propiedades metastásicas se da ya desde la fase de crecimiento radial, son los estadios más avanzados del melanoma los que presentan una mayor inestabilidad genética, dejan de depender de los factores de crecimiento y comienzan a expresar más proteínas relacionadas con la movilidad y la angiogénesis como integrinas o la proteína PI3K. Una vez el melanoma alcanza su pleno potencial metastásico a través de estas modificaciones que afectan la señalización molecular, las células tumorales podrán invadir otros órganos y crecer en ellos, afectando pulmones, hígado, cerebro, intestino y huesos [Crowson AN et al., 2007].

2.2.- Mecanismos moleculares en la progresión del melanoma.

La alteración en la adhesión celular, supervivencia, proteólisis, migración, angiogénesis, mecanismos de “escape inmunitario” y de implantación (“*homing*”) en tejidos diana, son procesos fundamentales en la progresión del melanoma y controlados por las vías Ras/Raf/MAPK y PI3K/AKT/mTOR [Yajima I et al., 2012].

2.2.1.- La vía Ras/Raf/MAPK.

Las proteínas de la familia MAPK pueden dividirse en cuatro grupos según su estructura y función: ERK1/2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase-1 and-2*), p38-MAPKs, JNK y ERK5 [Wada T et al., 2004]

Esta vía es activada a través de diversos receptores de membrana incluyendo GPCRs (*G-Protein Coupled Receptors*), RTKs (*Receptor Tyrosin Kinases*), integrinas, y canales de iones. Los factores de crecimiento, iones de calcio y quimioquinas se unen a sus receptores iniciando la activación en cascada de toda la vía (**figura I8**).

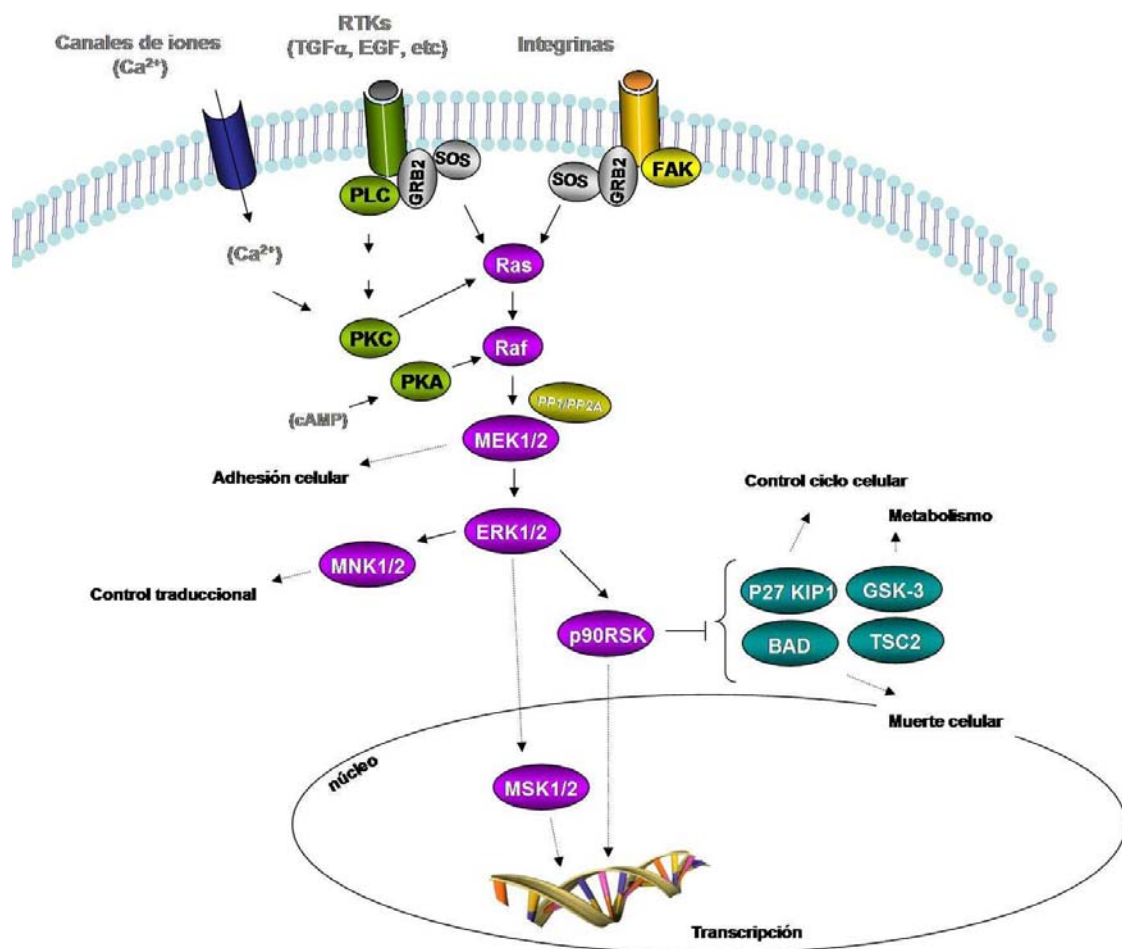


Figura I8.- Vía de señalización de las MAPK.

Tras la estimulación por factores de crecimiento, la señal de activación llega a Ras (proteína de unión a GTP), que mediante fosforilación activa a Raf quinasas las cuales, a su vez, se encargan de fosforilar/activar sucesivamente a MEK (*MAPKKK*, *MAPK Kinase Kinase*) y ERK (*MAPK*). ERK1/2 son componentes centrales en esta vía, regulando proteínas RSKs (*90 kDa Ribosomal protein S6 Kinases*), MNKs (*MAPK-Interacting Kinases*), y una vez translocado a núcleo, a MSKs (*Mitogen- and Stress-activated protein Kinases*) y diferentes factores de transcripción. p90RSK regula la actividad de varios sustratos involucrados en el control del ciclo celular (p27 KIP1), metabolismo (GSK-3) y muerte celular (BAD). También regula otras proteínas como IKK-alpha (*I-KappaB Kinase-Alpha*) que, al igual que BAD, al degradarse permite la translocación a núcleo de NFkB (*necrosis factor kappa b*), quien regula positivamente factores de transcripción relacionados con la respuesta inflamatoria e inmune, control del crecimiento celular y apoptosis.

En la regulación de esta vía, también juegan un papel clave otro tipo de proteínas, las fosfatasas. Las fosfatasas, eliminan los grupos fosfato de proteínas quinasas dejándolas inactivas. En este caso, son las serin/treonin fosfatasas PP1 y PP2A las que inhiben la vía a nivel de MEK [Ito A et al., 2003].

La señalización puede ser muy distinta dependiendo del estímulo, a través de receptores RTKs también se promueve un aumento de los niveles de cAMP que conlleva la activación, a través de PKA, de B-Raf y el resto de la cascada MAPK. Por otro lado, la cascada MAPK también se activa en respuesta a los niveles de Ca^{2+} intracelulares. El Ca^{2+} entra a través de los canales de iones e induce la activación de PKC (*Protein Kinase C*). PKC via PLC-Beta (fosfolipasa-C-beta), convierte PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) en DAG (diacilglicerol), el cual activa PKC que vía Ras activa ERKs.

La señalización mediada por integrinas se explica con más detenimiento en el apartado 2.2.3 debido a su importancia en la regulación de la migración y la capacidad de metastatizar del melanoma.

2.2.2.- La vía PI3K/AKT/mTOR.

La señalización de la vía PI3K/AKT/mTOR responde a factores de crecimiento, reservas energéticas e hipoxia.

Tras la estimulación por factores de crecimiento, se activan los receptores de membrana IGF-1R (*insulin growth factor receptor-1*), IR (*insulin receptor*), etc, que tienen como sustrato común IRS-1. La activación de IRS-1 promueve la activación de PI3K que fosforila el 3'-hidroxil de PIP2, generando PIP3. La formación de PIP3 promueve la translocación a membrana de PDK1 y AKT, en donde serán activados. AKT se encuentra co-regulada por PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase-1*) y por el complejo multi-proteico mTORC2. Además, la actividad de AKT viene regulada también a través de fosfatasa como PTEN, PHLPP o PP1/PP2A [Hay N et al., 2004; Bayascas JR et al., 2005; Carracedo A et al., 2008] (**figura I9**).

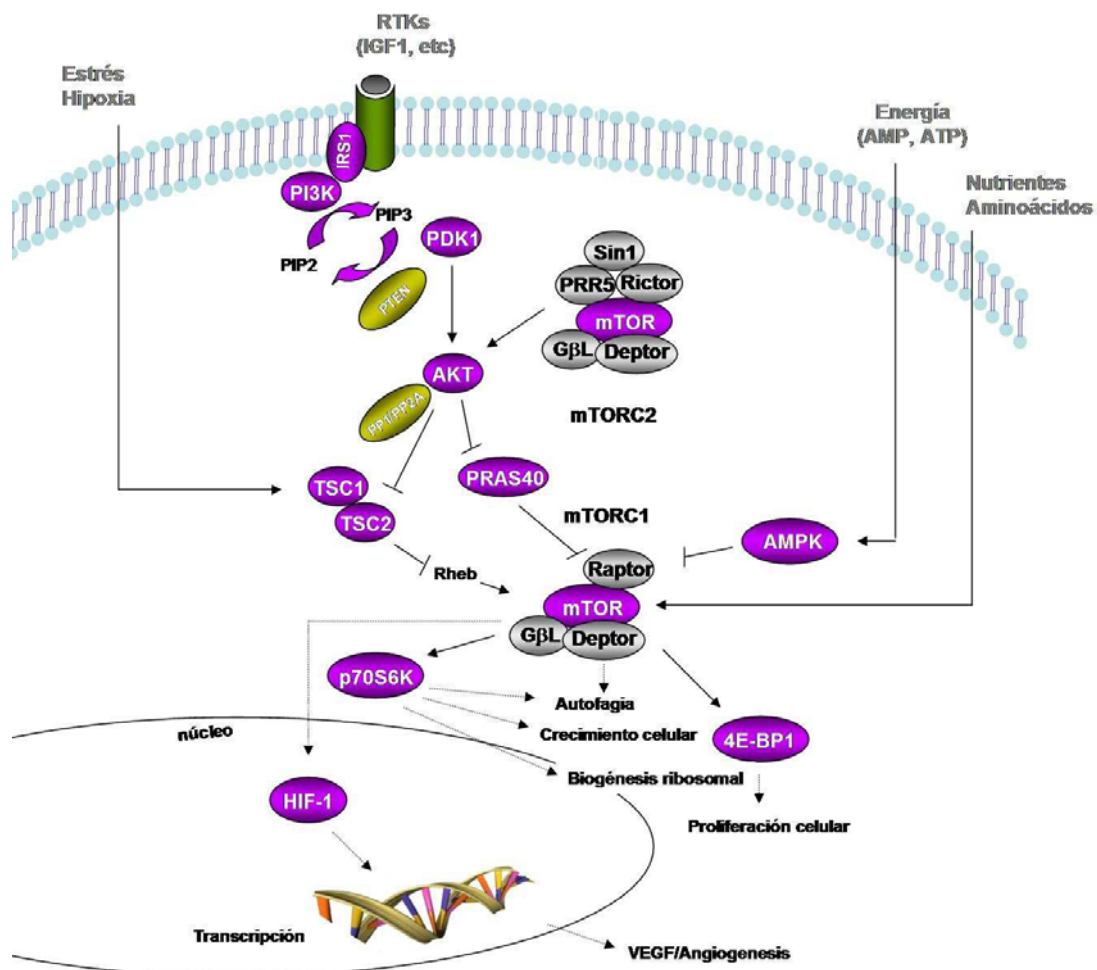


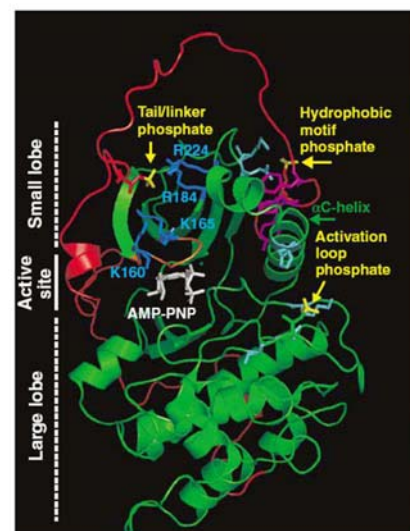
Figura I9.- Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR.

mTOR es uno de los efectores centrales dentro de la vía PI3K/AKT/mTOR [Vivanco M et al., 2002; Huang S et al., 2003]. Esta proteína es una serín/treonín quinasa perteneciente a la superfamilia de las PIKK (*phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-kinase-related kinase*). Las funciones de mTOR dependen de la formación de complejos con otras proteínas. Por un lado, mTOR está asociado al complejo mTORC2. Este complejo también lo conforman mLST8 (*mammalian ortholog of LST8*)/GβL, Deptor, Rictor (*Rapamycin-insensitive companion of mTOR*), mSIN1 y PRR5/Protor (*protein observed with Rictor*). Los mecanismos de regulación de mTORC2 no se conocen en su totalidad, aunque se demostró que Rictor y mSIN1 favorecían la señalización de mTORC2, mientras que Deptor lo regula negativamente. Sin embargo, las funciones de PRR5/Protor y mLST8/GβL siguen sin estar bien definidas [Huang J et al., 2008, Jacinto E et al., 2006; Yang Q et al, 2006; Pearce LR et al, 2007 y 2010].

Aunque mTOR es predominantemente citoplasmático, éste se encuentra asociado a membranas celulares, lo que permite la activación de mTORC2 a través de PI3K y su interacción con AKT [Sarbasov DD et al., 2005]. mTORC2, además, tiene otros sustratos conocidos como son SGK1 (*serum- and glucocorticoid-induced protein kinase-1*) y PKC α [Ikenoue T et al, 2008], todas ellas pertenecientes a la familia de las proteínas AGC quinasas [Hanada M et al, 2004; Ali SM et al., 2005]. Todos los miembros de la familia AGC contienen el motivo hidrofóbico C-terminal de fosforilación para mTOR, al igual que el sitio de fosforilación para PDK1 en el dominio quinasa [Hauge C et al., 2007] (**figura I10**).

Figura I10.- Estructura de las AGC quinasas.

La familia de las AGC quinasas la conforma AKT, S6Ks, SGKs, RSKs, PRKs y PKCs, todas ellas relacionadas estructuralmente. En este caso, la figura muestra el modelo molecular del dominio catalítico de AKT en estado activo. Los tres lugares de fosforilación localizados dentro del bucle o *loop* de activación se señalan en amarillo. Un grupo fosfato se localiza dentro del dominio quinasa (verde), otro en el *T-loop* de la región C-terminal contigua al dominio quinasa (rojo) y, el tercero, en el dominio hidrofóbico C-terminal (rosa). En naranja encontramos el bucle rico en glicinas y en blanco un análogo del ATP en el lugar de unión al ATP.



Hauge C et al., 2007

La activación de AKT para ser completa requiere, al menos, de su fosforilación en su residuo S473 por el complejo mTORC2 [Sarbassov DD et al, 2005] y en su residuo T308 por PDK-1 [Alessi DR et al, 1996]. Sin embargo, en AKT, al contrario de lo que ocurre en otras AGC quinasas, ambas fosforilaciones se dan de manera independiente; es decir, una vez activado mTORC2, éste fosforila AKT sin que para ello sea necesaria la fosforilación previa por PDK1, y viceversa.

Tas su activación, AKT fosforila PRAS40 (*proline-rich AKT substrate of 40 kDa*). PRAS40 forma parte del complejo mTORC1, sin embargo, al ser fosforilado por AKT en su residuo T246, éste se disocia del complejo mTORC1. PRAS40 actúa como regulador negativo del complejo, por lo que su disociación favorece la activación de mTORC1. El complejo mTORC1, a su vez, está formado por Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*) y por mLST8/GβL y Deptor, que son comunes en ambos complejos de mTOR. Raptor regula positivamente mTORC1 y ejerce funciones como proteína reclutadora de sustratos al complejo; mientras que Deptor actúa como regulador negativo [Sancak Y et al, 2007].

Por otro lado, una vez activada AKT, ésta fosforila e inhibe el complejo TSC (*tuberous sclerosis complex*)-2 o tuberina, impidiéndose así su asociación con TSC1 o hamartina. De esta manera se pierde el efecto inhibitorio que TSC2 ejerce, a través de RHEB, sobre mTORC1 [Manning BD et al., 2003].

La señalización de mTORC1 se da a través de dos proteínas clave en la regulación de la síntesis proteica: la proteína 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1*) y la proteína S6K1 (*ribosomal S6 kinase 1*), las cuáles son los efectores *downstream* mejor conocidos de mTOR [Wullschleger S et al, 2006].

Mientras que S6K1 regula la biogénesis ribosomal a través de la proteína ribosomal S6, 4E-BP1 actúa como regulador negativo del factor de iniciación traslacional eIF-4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*). El factor eIF-4E es crítico en la iniciación de la traducción proteica participando en la unión de los ribosomas al mRNA. La fosforilación de 4E-BP1 mediado por mTORC1 promueve su disociación del factor eIF-4E. Una vez disociado, eIF-4E se une al RNA mensajero (mRNA) permitiendo la iniciación de la traducción *cap*-dependiente. Como

consecuencia, aumentan los niveles de diversas proteínas involucradas en el control de la proliferación y crecimiento celular.

Al igual que en la vía de las MAPK, la señalización varía en función del estímulo. Cuando la vía es estimulada por energía (p.e. a través de ATP), la respuesta se da a través de STK11 (*serine threonine kinase 11*, también llamada LKB1). LKB1 es una proteína supresora de tumores que ejerce un efecto inhibitor en la vía de mTOR a través de la activación de AMPK (*5'AMP-activated protein kinase*) que mantiene activado TSC2, y por tanto, mTORC1 inhibido [Xie J et al., 2011].

Cada complejo de mTOR regula funciones celulares diferentes en respuesta a señales concretas. Los efectos específicos de cada complejo son atribuidos a que, aunque ambos complejos comparten ciertas proteínas, poseen sustratos específicos de cada uno de ellos [Guertin DA et al., 2009]. Así, mientras que mTORC2 promueve supervivencia celular, organización del citoesqueleto de actina y responde exclusivamente a estimulación de factores de crecimiento; el complejo mTORC1 favorece el crecimiento y proliferación celular mediante la inducción de síntesis proteica y lipídica, la biogénesis ribosomal y la reducción de muerte por autofagia.

2.2.3.- Mecanismos de regulación.

La vía PI3K/mTOR es una vía compleja debido a la cantidad de reguladores, efectores y *feedbacks loops* presentes. Las vías PI3K/mTOR y MAPK se intercomunican a varios niveles. Tanto Raf, Ras, Rac y TSC1/2 actúan como centros de integración de señales o *links* entre la vía PI3K y MAPK.

Dentro de la vía PI3K/MAPK, un primer mecanismo de regulación es el que conlleva una reducción de la actividad de AKT tras una estimulación prolongada con insulina. Este mecanismo permite la autorregulación de la vía evitando una sobreestimulación. La señalización de la vía PI3K/AKT/mTOR depende de IRS-1 (sustrato del receptor de insulina IGF-1R). IRS-1 activa toda la cascada de señalización que lleva a la activación de mTORC1 y, éste a su vez promueve un *feedback* negativo a través de S6K1 hacia IRS-1 [Harrington et al, 2004] y Rictor [Julien LA et al., 2010]. La inhibición de IRS-1 promueve la inactivación de PI3K, y por consiguiente de AKT, la

cual es favorecida a través de la inhibición de mTORC2. Como efecto contrario, al inhibirse mTORC1, el *feedback* negativo S6K/ IRS-1 queda bloqueado promoviendo la activación de IRS-1 y, en consecuencia mTORC2 y AKT. De esta manera, la pérdida de funcionalidad de mTORC1 queda compensada al reactivarse esta vía de supervivencia (figura I11).

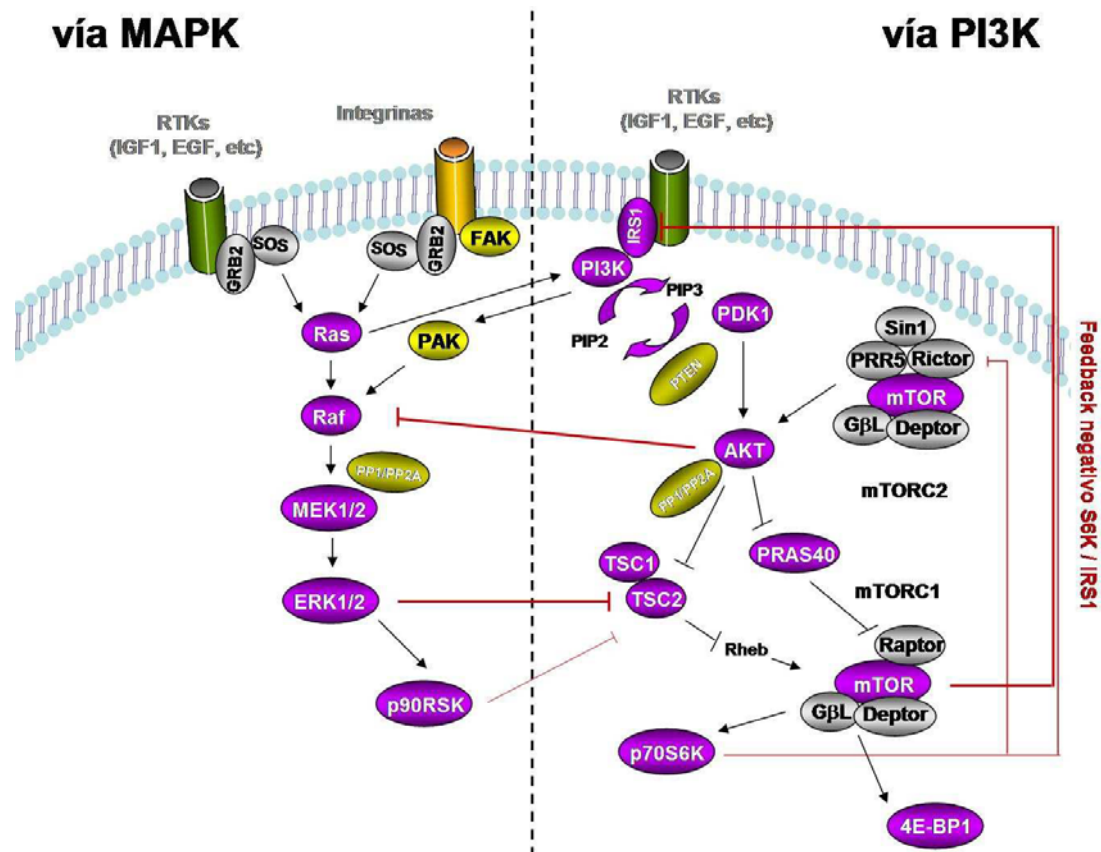


Figura I11.- Principales mecanismos de regulación e intercomunicación entre las vías PI3K/mTOR y MAPK.

Un segundo mecanismo de auto-regulación permite que RHEB sea inhibido por PRAS40 de manera dependiente a la activación de mTORC1 [Vander Haar E et al, 2007].

Existen otros mecanismos compensatorios. La hiperactivación de la vía PI3K que se da tras la inhibición de mTORC1 a través del *feedback* S6K1/IRS-1, resulta en un incremento simultáneo de la vía MAPK [Carracedo A et al, 2008] Por otro lado, también está descrita la activación de ERK1/2 a través de Raf de manera dependiente a la inhibición de AKT. Sin embargo, se han observado efectos contradictorios con estos

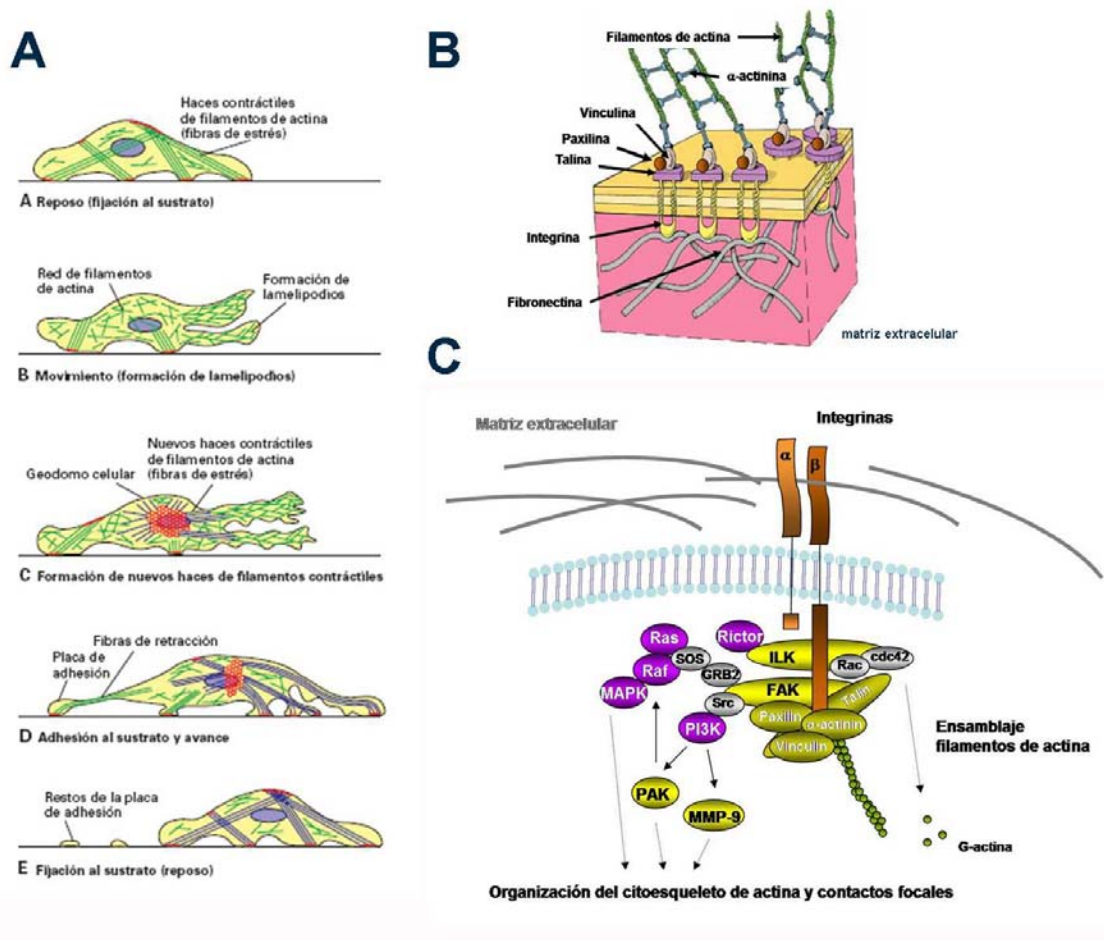
mecanismos de regulación, ya que también se ha observado que señales positivas de crecimiento provenientes de la vía Ras-MAPK inhiben TSC2 [Roux PP et al, 2004; Ballif BA et al, 2005] favoreciendo la activación de mTORC1.

En diferentes tipos tumorales, incluido en melanoma, la presencia de estos mecanismos ha sido asociada a resistencia a tratamientos quimioterapéuticos. En el bloque 3 haremos un repaso a las actuales estrategias propuestas para superar estos efectos adversos que hasta la fecha han supuesto un revés en los tratamientos utilizados en clínica.

2.2.4.- Papel de las MAPKs y mTOR en migración y metástasis.

La capacidad de migrar y atravesar la barrera epitelial, permite a las células tumorales llegar a invadir otros tejidos. En los mecanismos moleculares que llevan a la progresión y capacidad de metastatizar, se ven afectados tanto factores de crecimiento, como quimioquinas (citoquinas quimiotácticas), moléculas de adhesión celular (cadherinas, integrinas, selectinas e inmunoglobulinas) y proteasas extracelulares (metaloproteinasas que median la degradación de la matriz extracelular) [Bogenrieder T et al., 2003].

En el movimiento celular participan directamente un conjunto de microfilamentos que forman parte del citoesqueleto. Estos microfilamentos están constituidos por actina y otras proteínas asociadas a ella como la vinculina o la paxilina. Para que los microfilamentos desarrollen actividad contráctil se requiere otra proteína filamentosa, la miosina, proteína motora que permite la reorganización del citoesqueleto y el movimiento celular. Esta red de microfilamentos de actina situados debajo de la membrana plasmática permite que la célula emita proyecciones laminares (lamelipodios) que le permiten desplazarse. De la superficie de esta lámina se emiten transitoriamente prolongaciones muy finas llamadas filopodios que permiten a la célula tantear el frente de avance. Los lamelipodios establecen contactos con el sustrato al que se adhieren, mientras que los filopodios no llegan a adherirse al sustrato y se repliegan de nuevo al citoplasma. La célula avanza tras el lamelipodio, mientras retrae la parte posterior [Hynes RO et al., 2002] (**figura I12A**).



Ross, M. H. y Pawlina, W. Histología 5ª edición 2007

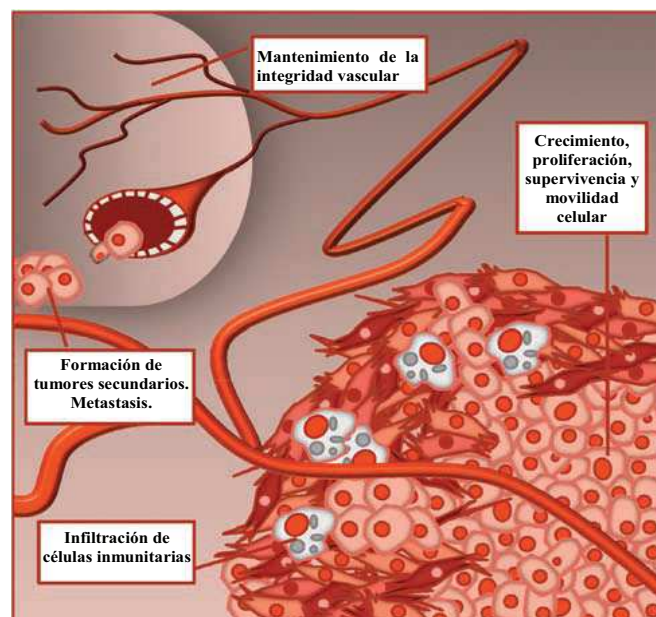
Figura I12.- Migración y adhesión celular. (A) Formación de lamelipodios y filopodios durante el movimiento celular. (B) Componentes de los contactos focales (C) Vía de señalización mediada por integrinas.

Durante el movimiento celular, la formación y desaparición de los contactos focales permiten la adhesión/desadhesión de la célula, permitiendo el avance de ésta. Los contactos focales conforman un enlace dinámico entre la actina del citoesqueleto y proteínas de la matriz extracelular a través de proteínas como α -actinina, vinculina, paxilina, talina e integrinas (**figura I12B**). En la adhesión/desadhesión y remodelaje del citoesqueleto necesario para el movimiento celular, juegan un papel clave las integrinas. Las integrinas median las interacciones físicas entre las proteínas de la matriz extracelular (como la laminina, fibronectina o el colágeno de tipo IV). Además, a un nivel molecular, juegan un papel de conexión entre las vías de supervivencia MAPK y PI3K/mTOR, esenciales para la progresión tumoral [Liotta LA et al., 2001]. Las señales de movilidad y supervivencia convergen dentro de estas vías y vuelven a divergir

activando diferentes efectores *downstream* que regulan la expresión y función de diferentes moléculas de adhesión celular y las PAKs (*p21-activated protein kinases*).

La señalización mediada por integrinas promueven la fosforilación de las FAK (*focal adhesion kinase*) y de ILK (*integrin linked kinases*), ambas esenciales para la activación de las PAKs que median la adhesión y migración celular. FAK e ILK interactúan a través de los dominios SH2 con PI3K, RAC y CDC42 (*Cell Division Cycle-42*) (**figura I12C**). Por una parte, RAC y CDC42, dos GTPasas de la familia RAS, promueven la activación de MAPKs a través de las PAKs. Las PAKs influyen en la polimerización de actina mediante la regulación de la cofilina y del factor de depolimerización ADF (*actin depolymerizing factor*), los cuáles son proteínas de unión a actina que regulan la dinámica del citoesqueleto [Bockoch G.M., 2003; Bamburg JR et al., 2002]. La activación del complejo ADF/cofilina es regulada por PAK4 [Soosairajah J et al, 2005]. Así a través de las PAKs se regulan funciones celulares directamente relacionadas con procesos de adhesión celular y migración, como la reorganización del citoesqueleto y la formación de contactos focales, además de supervivencia. Por otra parte, se ha descrito la interacción del complejo mTORC2 al dominio quinasa de ILK a través de Rictor [McDonald PC et al., 2008; Riaz A et al., 2012]. A través del complejo ILK/Rictor, la vía PI3K/mTOR regula diversos procesos involucrados en la progresión del cáncer como son migración, transición epitelio-mesénquima y metastasis a través del complejo ILK/Rictor [Li H et al., 2012; Jacinto E et al, 2004] (**figura I13**).

Figura I13.- Papel de la vía PI3K/mTOR en el microambiente tumoral. En células tumorales, la vía PI3K favorece la iniciación, crecimiento y proliferación tumoral. También regula la proliferación de células endoteliales e infiltración de células inmunitarias, favoreciendo el crecimiento tumoral, intravasación e invasión.



Yuan TL y Cantley LC., 2008

3.- Estrategias terapéuticas en melanoma.

Actualmente, la terapia molecular está dando resultados bastante alentadores en el tratamiento contra el cáncer. Abordaremos las diferentes terapias, tanto individuales como combinadas, basadas en la inhibición de las principales vías de señalización involucradas en la carcinogénesis, prestando especial atención en los inhibidores de mTOR de segunda generación. Detallaremos los mecanismos de acción que median la efectividad de estas moléculas como agentes anticancerosos, entre ellos el bloqueo de los mecanismos compensatorios que confieren resistencia a las células cancerosas.

Hasta la fecha, la extirpación quirúrgica del tumor es la opción más efectiva contra el cáncer. Sin embargo, ciertos tumores, como es el caso del melanoma avanzado son inoperables, lo que impulsó el desarrollo y diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

En el tratado actualizado del melanoma se recogen las diferentes terapias utilizadas contra el cáncer de melanoma avanzado: anticuerpos inmunomoduladores de la respuesta antitumoral, vacunas antitumorales, inhibidores de las vías de señalización de la proliferación celular y de la angiogénesis, y reguladores de la apoptosis [Berrocal A et al., 2009]. Algunas de estas estrategias, como es el caso de las vacunas antitumorales o ciertos agentes quimioterapéuticos han obtenido hasta el momento resultados modestos, lo que ha motivado la búsqueda de distintos abordajes. Este es el caso de la terapia molecular.

3.1.- Terapia molecular.

Los estudios proteómicos y genómicos han llevado a un mejor entendimiento de los procesos involucrados en la carcinogénesis y progresión del cáncer. A nivel molecular, la desregulación de las vías de señalización juega un papel clave en la desprogramación y adquisición de las propiedades “inmortales” de las células cancerosas. La terapia molecular se basa en el desarrollo de moléculas que sean capaces de revertir esta desprogramación, desde la desregulación del ciclo celular hasta la

inhibición de los mecanismos de muerte. Estas moléculas interactúan con dianas moleculares específicas, en su mayoría proteínas quinasas, causando una disfunción en las células cancerosas que puede conllevar a su muerte.

Aunque en la teoría estas terapias podrían ser prometedoras, los resultados obtenidos, en un principio, con inhibidores de quinasas usados como agentes individuales no dejaron de ser bastante decepcionantes e incluso, a veces, desconcertantes. Veremos algunos ejemplos de estos inhibidores, incluyendo inhibidores de MAPKs y los rapálogos (inhibidores de mTOR), el motivo de la ineficacia de las monoterapias, y por tanto, la necesidad de emplear las terapias combinadas que se están evaluando actualmente en estudios clínicos [Vilar E et al., 2011].

3.1.1.- Inhibidores de MAPK.

La vía de señalización MAPK fue un claro objetivo en el estudio y búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, ya que un elevado porcentaje de tipos tumorales presentaba mutaciones somáticas en oncogenes implicados en esta vía favoreciendo la hiperplasia y formación de tumores primarios y metastáticos [Sánchez-Hernández I et al., 2012].

En ensayos clínicos se ha observado que inhibidores de B-Raf, así como inhibidores de distintos efectores *downstream* de MEK (pe, BAY43-9006 y Sorafenib), usados en mono-terapias evitan el crecimiento de melanoma, aunque sólo de una manera modesta. La ineficacia de estos inhibidores como agentes individuales se atribuyó a los *feedbacks* de regulación que compensan la inhibición de la vía MAPK con la activación de la vía PI3K/mTOR. Como comentamos en el capítulo anterior, la utilización de inhibidores de MAPKs, a través de TSC1/2, favorecen la inhibición del complejo mTORC1 y, éste a su vez, la activación de AKT a través del *feedback* negativo S6K/IRS-1. Este mecanismo compensatorio al final aumenta la respuesta de supervivencia confiriéndole resistencia al tumor. Por otro lado, por esta misma razón inhibidores de mTORC1 como la rapamicina y otros rapálogos fracasaron como agentes quimioterapéuticos en terapias individuales.

3.1.2. mTOR como diana terapéutica en cáncer.

La primera evidencia molecular de la relación entre mTOR y cáncer, se obtuvo de los estudios realizados sobre la conexión entre TSC y la vía de mTORC1. La fosforilación e inhibición de TSC2 por AKT es el *link* más claro entre mTORC1 y una vía desregulada en cáncer [Inoki K et al, 2002]. mTORC1 promueve la fosforilación de diversos efectores *downstream* y factores de transcripción que participan en procesos celulares como proliferación, supervivencia, crecimiento celular y angiogénesis. Por lo que el aumento descontrolado de la actividad de estos efectores acaba por favorecer la tumorigénesis. En cáncer, la pérdida de proteínas supresoras de tumores provoca la desregulación del *axis* TSC/RHEB/mTOR que ha sido asociado a numerosos síndromes de predisposición a desarrollar un tumor, incluyendo TSC1/2, Peutz-Jeghers (LKB1) y Cowden's (PTEN) [Shah OJ et al., 2004].

El importante papel que juega mTOR en la carcinogénesis llevó a considerar, tanto a mTOR como a sus efectores, potenciales dianas para el tratamiento contra el cáncer [Guertin DA et al, 2007].

3.1.2.1.- Inhibidores de mTOR.

Los múltiples procesos de señalización celular en los cuales participa mTOR llevaron a considerar la inhibición de mTOR como estrategia para el desarrollo terapéutico contra el cáncer. Sin embargo, tras la inhibición de mTORC1, la consecuente activación de AKT hizo que el beneficio terapéutico que se les atribuyó en un principio a moléculas como rapamicina (también conocida como sirolimus, RapamuneTM, Wyeth) o everolimus (RAD001, Afinitor; Novartis) fuera realmente limitado. La limitación de estas moléculas venía dada por la incapacidad de inhibir otros procesos celulares como la proliferación de células cancerosas mediada por AKT [Dancey JE, 2006, Taberero JM et al, 2008]. A pesar de ello, es indiscutible la relevancia que esta primera generación de inhibidores de mTOR ha tenido en el estudio y comprensión de la vía PI3K/AKT/mTOR.

Los mecanismos de acción de rapamicina han sido muy bien descritos. Esta molécula se une al dominio FRB (*FKBP12-Rapamycin binding*) perteneciente a la proteína FKBP12 (*FK506-binding protein*) y que se encuentra adyacente al dominio catalítico de mTOR [Benjamin D et al, 2011]. Diversos estudios han mostrado que

mTORC2 es insensible a rapamicina [Jacinto E et al, 2004; Sarbassov DD et al, 2006], aunque a tiempos largos de exposición a rapamicina mTORC2 también puede verse inhibido dependiendo del tejido (**Figura I14**).

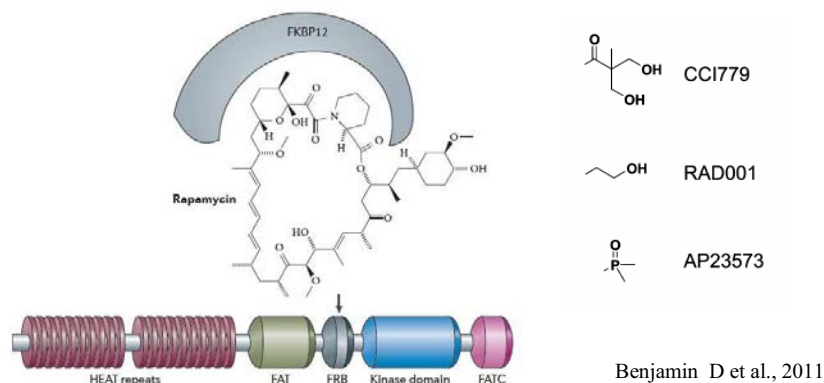


Figura I14.- Estructura química de los rapálogos y su interacción a mTOR. Los rapálogos, como la rapamicina se unen a FKBP12. Una vez formado el complejo FKBP12-rapamicina, éste se une al dominio de unión FRB que se encuentra adyacente al dominio quinasa de mTOR. El complejo resultante altera la composición y/o conformación de los complejos mTORC1 y/o mTORC2, así como el acceso a sus sustratos como PRAS40. Para los rapálogos CCI779, RAD001 y AP23573, se indican los grupos sustituyentes de la posición C-40 modificados respecto a la rapamicina.

3.1.2.1.1.- Primera generación: Rapálogos.

La rapamicina es un producto natural sintetizado por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* con propiedades fungicidas, inmunosupresoras y antiproliferativas. Sin embargo, si la rapamicina ha pasado a la historia por algo es por su actividad inhibitoria contra la proteína mTOR [Vilar E et al 2010]. La rapamicina pasó rápidamente a ensayos clínicos debido a la importancia de mTOR en cáncer. Sin embargo, no resultó ser una molécula tan eficaz como se esperaba. La rapamicina no inhibe AKT ya que no es capaz de unirse y desorganizar el complejo mTORC2, así como lo hace con mTORC1, lo que lo convierte en un inhibidor poco efectivo en terapia contra el cáncer. Esto conllevó la utilización y desarrollo de nuevos y más eficaces inhibidores de mTORC1 en clínica. A partir de la rapamicina se han sintetizado varios compuestos mejorados: temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001) y ridaforolimus (AP23573). Estos compuestos integran la familia de rapálogos, conocidos también como la primera generación de inhibidores de mTOR. Estos rapálogos son capaces de inhibir la proliferación celular mediante parada de ciclo, inducen apoptosis en algunos modelos celulares, inhiben angiogénesis y presentan una toxicidad limitada en tejidos normales. Aunque es cierto que en ensayos clínicos estos rapálogos siguen mostrando un efecto

sólo modesto, los estudios con estas moléculas aportaron un mayor conocimiento de las funciones de la vía lo que ha permitido el desarrollo de nuevos inhibidores más específicos así como el planteamiento de nuevas estrategias terapéuticas: la inhibición dual de mTORC1 y mTORC2 mediante inhibidores ATP miméticos.

3.1.2.1.2.- Segunda generación: Inhibidores ATP miméticos.

La identificación y desarrollo de nuevos y más potentes inhibidores de mTOR ha permitido superar la relativa ineficacia de los inhibidores de primera generación. La eficacia de estos nuevos inhibidores radica en su capacidad de inhibir tanto mTORC1 como mTORC2. La inhibición simultánea de ambos complejos se debe a la capacidad de estas moléculas de interactuar con el lugar de unión del ATP localizado en el centro activo del dominio quinasa de mTOR [Guertin DA et al., 2009]. Al ocupar el lugar del ATP la actividad catalítica de mTOR queda inhibida, y por tanto, la de ambos complejos. Es por esto que, a estas moléculas, se les conoce como inhibidores ATP miméticos. La ventaja respecto a los rapálogos de primera generación es que al tener como diana simultáneamente ambos complejos de mTOR reducen la regulación positiva de PI3K/AKT que se produce tras la inhibición de mTORC1. En consecuencia, han mostrado una inhibición potente de S6K1, 4E-BP1 y AKT en la Ser473 [Liu Q et al., 2009] (**Figura I15**).

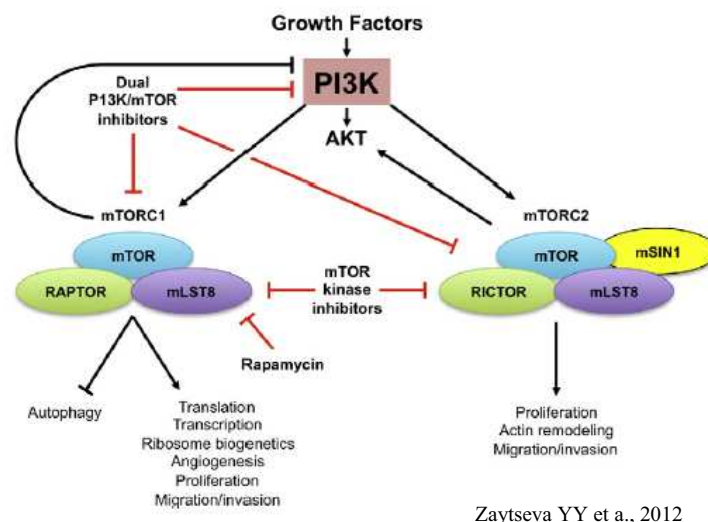


Figura I15.- Mecanismos de acción de los inhibidores de mTOR

Además, debido a que tanto el dominio catalítico de mTOR, como la subunidad p110 α de la PI3K, se encuentran relacionados estructuralmente, algunos compuestos pertenecientes a la segunda generación han mostrado una actividad dual contra ambas

proteínas, PI3K y mTOR. Este es el caso de moléculas como, AZD-8055 (AstraZeneca) OSI-027 (OSI Pharmaceuticals), WYE354 y PP242, cuya especificidad por diferentes dianas puede llegar a ser muy dispar a pesar de pertenecer a la misma familia de inhibidores (**figura I16**).

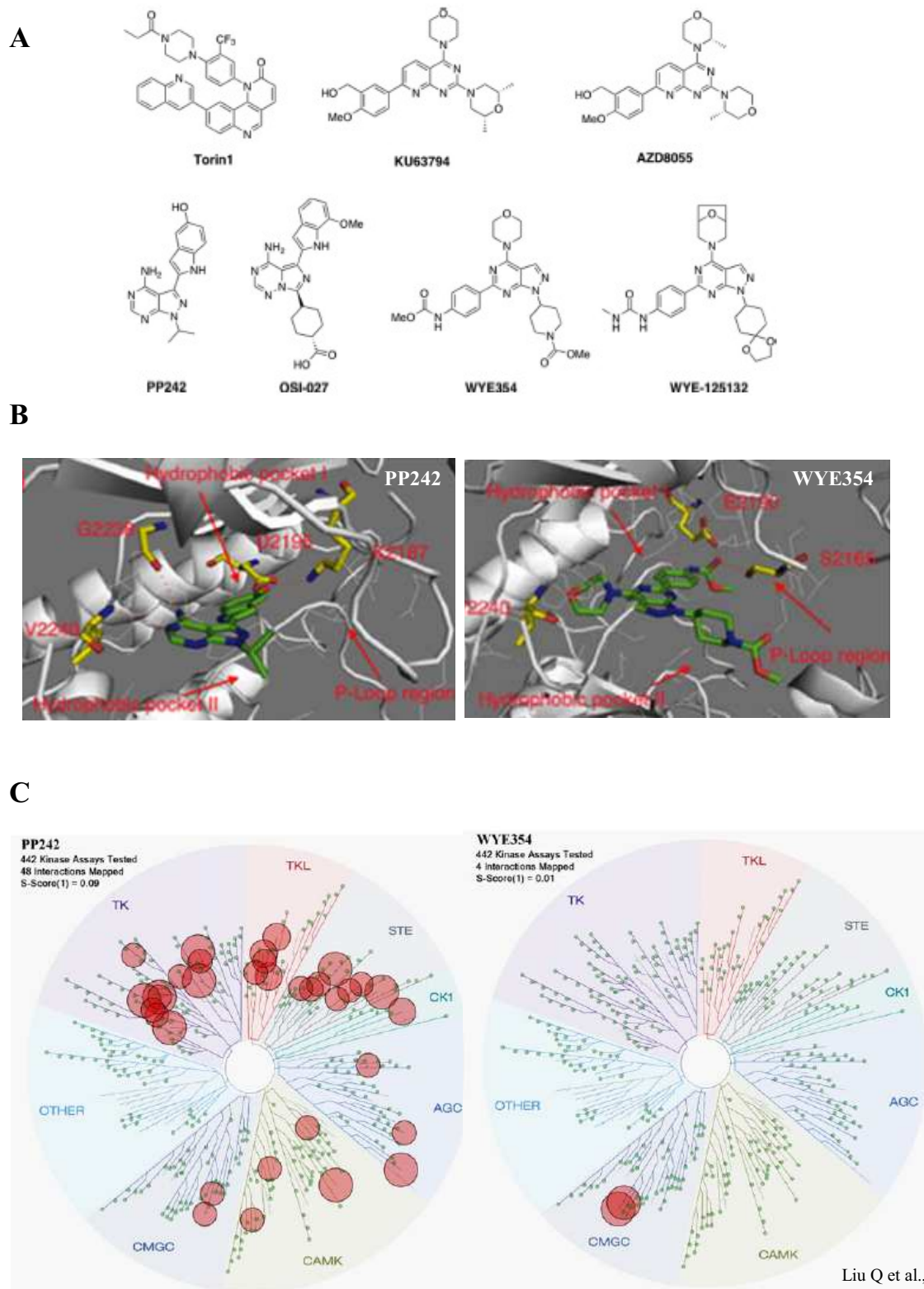


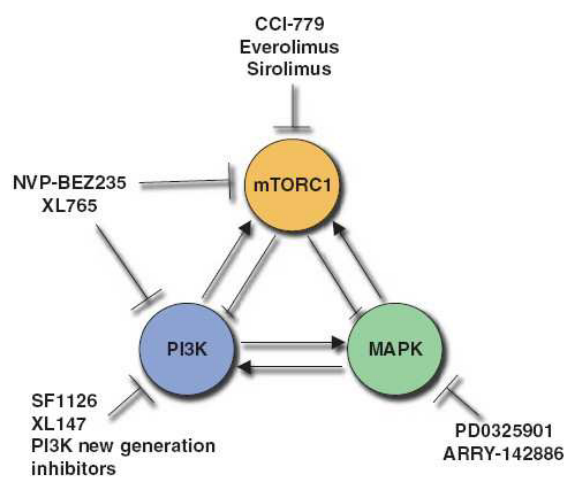
Figura I16.- Inhibidores de mTOR de segunda generación. (A) Estructuras químicas de los principales inhibidores ATP miméticos. **(B)** Modelos *in silico* de la interacción de PP242 y WYE354. **(C)** Especificidad de inhibición de PP242 y WYE354 en comparación con otras proteínas del kinoma humano.

La mayoría de inhibidores duales de PI3K/mTOR han entrado ya en fase clínica I-II, mostrando una mayor eficacia en el tratamiento contra el cáncer. La actividad anticancerígena de estas moléculas se ha ensayado como agentes únicos o en combinación con otros agentes quimioterapéuticos convencionales y radiación, mostrando actividad antiproliferativa sinérgica en diversos tipos tumores hematológicos y sólidos [Liu Q et al., 2012].

3.1.3.- Terapias combinadas en melanoma.

Con el fin de aumentar la eficacia de las mono-terapias en general, se plantearon nuevas estrategias para fines terapéuticos como la utilización de tratamientos combinados utilizando simultáneamente inhibidores de mTORC1, PI3K y/o AKT con inhibidores de MEK (MAP/ERK kinase) con el fin de bloquear además el *feedback loop* que conecta la vía PI3K/AKT/mTOR con la vía MAPK [Aziz SA et al., 2010; Carracedo A et al., 2008; Sheppard K et al., 2012] (**figura I17**).

Figura I17.- Estrategias terapéuticas combinadas. PI3K, mTORC1 y MAPK conforman un triángulo de señalización conectado a través de diferentes *feedbacks* y *cross-talks*. Las nuevas estrategias se basan en la utilización combinada de diversos inhibidores selectivos que aumenten la eficacia de las terapias.



Carracedo A et al., 2008

En melanoma, el tratamiento de referencia continúa siendo el inhibidor de B-Raf dacarbazina. Otras estrategias usando de manera combinada inhibidores de PI3K, de mTOR y de MAPK están siendo validados clínicamente [Shimizu T., 2012]. Es el ejemplo de sorafenib (inhibidor de B-Raf) en combinación con rapamicina. Los

resultados han mostrado una inhibición sinérgica de la proliferación y crecimiento tumoral [Molhoek KR et al., 2005]. El mismo efecto se ha obtenido con el inhibidor de B-Raf, BAY43-9006, en combinación con el inhibidor PI3K/mTOR, PI-103 [Marone R et al., 2009]. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con cierta cautela, ya que se han descrito efectos adversos usando PI-103 en presencia de sorafenib. La combinación de ambas moléculas promueve inmunosupresión, crecimiento tumoral *in vivo*, e incremento de la supervivencia en células de melanoma [López-Fauqued M et al., 2010]. Se observó que este efecto era debido a la inducción de proteínas anti-apoptóticas BH3, por lo que otras estrategias ya contemplan la utilización adicional de inhibidores BH3 miméticos como OBX.

Otros inhibidores de Raf como bevacizumab (Avastin) se encuentran en estudios clínicos en presencia de inhibidores de mTOR como CCI-779, temsirolimus, y derivados de PI-103. En la **tabla I2** mostramos algunos ejemplos de nuevos fármacos en estudio clínico para el tratamiento del melanoma, incluido OBX (GX15-070).

Producto y compañía	Mecanismo de acción	Situación
Avastin/bevacizumab (Roche&Genentech)	Inhibidor de B-Raf	Fase II
CI-1040 (Pfizer)	Inhibidor de MEK	Fase I/II
CHIR-265 (Chiron/Novartis)	Inhibidor de B-Raf, C-Raf, N-Ras, K-Ras	Fase I
AZD6244 (AZ/Array Biopharma)	Inhibidor de MEK	Fase II
Sunitinib (Pfizer)	Inhibidor de tirosina quinasas: PDGFR, VEGFR, c-kit, CSF-1R, etc.	Fase II
Glivec/imatinib (Novartis)	Inhibidor de tirosina quinasas: BCR/ABL, PDGFR, c-kit	Fase II
Velcade/bortezomib (Millenium/J&J)	Inhibidor del proteasoma	Fase II
GX15-070/obatoclax (GeminX)	Inhibidor pan-BCL2	Fase II/III
Nexavar/sorafenib (Bayer y Onyx)	Inhibidor de tirosina quinasas B-RAF, C-RAF, PDGFR, VEGFR, etc.	Fase III

Tabla I2.- Nuevos fármacos en desarrollo en pacientes con melanoma.

En fase clínica I, se están evaluando moléculas como dalotuzumab (anticuerpo monoclonal contra IGF-1R; MK-0646; Merck) y ridaforolimus (inhibidor de mTOR análogo a rapamicina; MK-8669, deforolimus; Merck y ARIAD). Otros estudios combinan cixutumumab (anticuerpo monoclonal inhibidor de IGF-1R; IMC-A12; Imclone) más el rapálogo temsirolimus (CCI-779, Torisel; Wyeth), así como figitumumab (anticuerpo monoclonal inhibidor de IGF-1R; CP-751871; Pfizer) y everolimus. En el tratamiento contra el cáncer de melanoma avanzado se están utilizando inhibidores de tirosina quinasas (sorafenib o nexavar, Bayer&Onyx), AKT (perifostine, Aeterna), mTOR (sirolimus), de proteasoma (bortezomib o velcade, Millenium/J&J), BH3 miméticos (obatoclax, Geminx), etc. [Berrocal A et al., 2009]. En fase II, tratamientos con bevacizumab (inhibidor de angiogénesis) en combinación con everolimus (inhibidor de mTOR) de pacientes con melanoma metastático, están siendo bien tolerados, aunque sólo muestran una actividad moderada tras 4-8 meses de tratamiento [Hainsworth JD et al., 2010].

Los resultados obtenidos, en general, son esperanzadores aunque siguen siendo necesarias nuevas estrategias y compuestos más eficaces que minimicen los efectos adversos de las actuales terapias.

Objetivos

Dar con tratamientos anticancerígenos efectivos y que no den lugar a los efectos secundarios no deseados de las terapias actuales está a la orden del día en el campo de la terapéutica experimental.

Son bien conocidas las propiedades anticancerosas de algunos miembros de la familia de las prodigininas. En un periodo de tiempo relativamente corto varias compañías han desarrollado programas de investigación, así como las pruebas clínicas para probar la actividad de estas moléculas en diferentes tipos tumorales. En concreto, la prodigiosina y el derivado sintético obatoclax (GX15-0170) se encuentran en fase de estudios pre-clínicos y clínicos, respectivamente. En paralelo, grupos científicos han continuado la investigación de los mecanismos de acción de estas moléculas aportando nuevos datos que han llevado a una mejor comprensión a nivel molecular de la actividad de estas moléculas como agentes pro-apoptóticos. Sin embargo, existen evidencias de la existencia de otras posibles dianas moleculares responsables de su acción citotóxica. Estudios previos ya relacionaron los efectos citotóxicos de las prodigininas con la inhibición de diferentes vías de señalización. Entre ellos, Soto-Cerrato y colaboradores demostraron que el efecto de prodigiosina era mediado a través de la vía PI3K/AKT/GSK3 β . Nuestra línea de investigación se ha centrado en la validación de la inhibición de proteínas quinasas como mecanismo de acción de las prodigininas. Los datos previos nos hicieron plantearnos la existencia de una posible diana molecular dentro de la vía PI3K, una de las vías de mayor interés en la investigación oncológica por su papel en la formación y progresión del cáncer, así como en la resistencia a quimioterapéuticos.

Para ello, el modelo de melanoma para el estudio de los efectos citotóxicos de las prodigininas aporta varias ventajas respecto otros modelos. En primer lugar, este es un modelo especialmente resistente a fármacos, lo que nos permitirá estudiar el efecto de las prodigininas sobre aquellos mecanismos que confieren resistencia a este modelo. Con este fin, realizaremos los estudios de manera paralela en dos líneas celulares pertenecientes a diferentes estadios de crecimiento potencialmente metastásica del melanoma, en las cuales, los niveles de activación de las vías PI3K y MAPK son diferentes. Por otro lado, los resultados obtenidos en estas dos líneas nos permitirán determinar el potencial antimetastásico de las prodigininas en este modelo.

Nuestros objetivos en este proyecto de investigación pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Ampliar el estudio del efecto citotóxico de la prodigiosina y de los mecanismos de muerte celular en el modelo de melanoma.
- Evaluar el papel de prodigiosina como molécula BH3 mimética.
- Identificar posibles dianas moleculares de prodigiosina y obatoclax dentro de las principales vías de supervivencia.
- Caracterizar la unión entre prodigininas y su diana molecular.
- Evaluar el potencial antimetastásico de prodigiosina y obatoclax en el modelo de melanoma.
- Aportar nuevos datos moleculares que correlacionen la estructura y actividad de estas moléculas con el fin de diseñar y sintetizar nuevos derivados químicos más específicos y eficaces.

Material y Métodos

1.- Reactivos.

La prodigiosina (PG) proviene del *National Cancer Drug Synthesis and Chemistry Branch Chemotherapeutic Agents Repository* (Bethesda, MD). El obatoclax (OBX) y su derivado sintético OBX-F₂B fueron sintetizados por el Dr. R. Quesada y colaboradores (Departamento de Química, Universidad de Burgos) [Díaz de Greñu B et al., 2011] (Anexo I). Las diferentes prodigininas (PGs) fueron diluidas en 100% dimetil sulfóxido (DMSO) y guardadas a -20°C.

Los diferentes inhibidores convencionales, rapamicina, wortmanina, U0126 y caliculina, fueron obtenidos de Invitrogen (Carlsbad, CA).

2.- Cultivos celulares.

Las líneas celulares de melanoma humano SK-MEL-28 y SK-MEL-5 se obtuvieron de *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA). Las células de carcinoma escamoso de piso de cavidad bucal HN4 fueron cedidas por el Dr. Silvio Gutkind del centro *National Institute of Dental and Craniofacial Research*, NIDCR (Bethesda, Maryland, USA). Las células estables de cáncer de colon humano SW480 modificadas control, *knockdown* de mTOR y *knockdown* de raptor fueron generadas por la Dra. T. Gao y colaboradores (*Markey Cancer Center*, Departamento de Bioquímica Molecular y Celular, Universidad de Kentucky). Las células modificadas estables se obtuvieron mediante infección con lentivirus shRNA, vacío, contra mTOR o contra raptor siguiendo el procedimiento descrito en Liu J et al., 2011.

Todas las líneas celulares fueron crecidas en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Biological Industries, Beit Haemek, Israel) con un suplemento del 10% de suero bovino fetal (FBS; Life Technologies, Carlsbad, CA) y 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina, y 2 mM L- glutamina (Biological Industries). Las células se crecieron a 37°C en una atmósfera al 5% CO₂.

3.- Ensayos de viabilidad celular.

La viabilidad celular fue determinada mediante ensayos MTT usando 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dipeniltetrazolium bromide (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO). Las células (1.5 x 10⁵ células/ml) se cultivaron en placas de 96 pocillos en triplicados, y se crecieron en un volumen de 100 µl de medio DMEM (10% FBS) durante 24 h. Las células se sometieron a los tratamientos pertinentes durante 24 ó 48 h. Transcurrido el tiempo de

tratamiento, las células se incubaron durante 4 h en presencia de MTT (10 μ M). El precipitado de formazan del MTT se diluyó añadiendo 100 μ l de isopropanol: 1N HCl (24:1). La absorbancia se midió a 570 nm. La viabilidad celular se expresa como porcentaje respecto al control (DMSO). Los valores muestran la media \pm S.D. (desviación estándar) de tres experimentos independientes.

4. Técnicas de inmunodetección.

4.1.- Inmunoblot.

Se siguieron diferentes protocolos en la extracción celular dependiendo de las proteínas que se pretendían visualizar mediante inmunoblot (Western-blot, WB). Antes de cada extracción se retiró el medio de cultivo y las células (adheridas y flotantes) se lavaron dos veces con solución salina PBS (*Phosphate Buffer Saline*, Biological Industries).

Para detectar la expresión de caspasas y LC-3, las células fueron lisadas (tras los respectivos tratamientos con PG) con una solución de *sodium dodecyl sulfate* SDS (85 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 100 μ M PMSF, 0,3 μ M aprotinina y 1 μ M leupeptina) durante 15 min. Los extractos celulares se centrifugaron a 12000 x g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se agitaron vigorosamente mediante un vórtex y se calentaron a 93°C durante 5 min. La concentración proteica del sobrenadante obtenido se determinó mediante ensayos de BCA (Pierce, Rockford, IL) usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. A los extractos celulares se les añadió solución *Laemli* (**Tabla M1**) y se calentaron a 100°C durante 5 min antes de ser cargados en un gel electroforético. Extractos de entre 40 – 100 μ g de proteína se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA).

Solución	Composición
Electroforesis	25 mM Tris; 192 mM Glicina; 0,1 % SDS
Transferencia	25 mM Tris; 192 mM Glicina; 20 % Metanol
TBS-T	20 mM Tris; 150 mM NaCl pH 7,6; 0,2 % Tween
Bloqueo	TBS-T; 5 % p/v leche desnatada
Laemli	Tris-HCl 25 mM pH 6,8; 2 % p/v SDS; 10% glicerol; 0,002 % p/v azul bromofenol

Tabla M1.- Composición de las soluciones utilizadas en inmunoblot.

Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la **tabla M2** y se usaron siguiendo las especificaciones recomendadas en cada caso. Se usaron anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa *horseradish* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). La señal se detectó mediante el kit de detección quimioluminiscente *ECL Western blotting detection reagents* (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). El DMSO se usó como control en cada ensayo.

En los tratamientos que requerían de estimulación con insulina, las células se privaron de suero 24 h. Previamente a la adición de insulina (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) se realizaron los diferentes tratamientos con PGs. Después de media hora de estimulación con insulina (1 μ M), las células fueron lisadas con una solución de 50 mM Tris pH 7.5, 60 mM glicerofosfato, 20 mM pirofosfato de sodio, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 30 mM NaF, 1 mM ortovanadato sódico, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 5 μ M pepstatin A, 10 μ M leupeptin. Los extractos celulares se sonicaron y centrifugaron a 12000 x g durante 15 min a 4°C. Los extractos se analizaron mediante inmunoblot usando los anticuerpos especificados en la tabla anexa.

Anticuerpo	Dilución	Técnica	Origen	Proveedor
4E-BP1	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
Actina	1:500	WB	cabra	Santa Cruz Biotechnology
AKT	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
BAK	1:1000	WB	cabra	Santa Cruz Biotechnology
BAX	1:1000/ 1:100	WB/IP	conejo	Cell Signaling Technology
BCL-2	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
Caspasa-9	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
Citocromo c	1:500	WB	ratón	Santa Cruz Biotechnology
ERK1/2	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
FAK	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
ILK	1:1000/ 1:100	WB/IP	conejo	Novus Biologicals
LC-3 I/ II	1:100	WB	ratón	Abgent
MCL-1	1:100	IP	conejo	Santa Cruz Biotechnology
MCL-1	1:1000	WB	ratón	Santa Cruz Biotechnology
mTOR	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
P70S6K	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
PP1 α	1:2000	WB	conejo	CBC2C
PP1 γ	1:5000/1:500	WB/ IF	conejo	CBC3C
PDK1	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology

PORINA	1:8000	WB	ratón	Santa Cruz Biotechnology
Procaspa-3	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
P-S241-PDK1	1:1000	WB	conejo	Signalway Antibody
P-T1135-RICTOR	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
P-S473-AKT	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
P-S308-AKT	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
P-T246-PRAS40	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
P-T202/Y204-ERK1/2	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
P-T389-p70S6K	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
P-S65-4E-BP1	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
P-S474/ S602/ S560- -PAK4/PAK5/PAK6	1:1000	WB	conejo	Cell Signaling Technology
Raptor	1:1000/ 1:100	WB/ IP	conejo	Cell Signaling Technology
Rictor	1:1000/ 1:100	WB/ IP	conejo	Cell Signaling Technology
Vinculina	1:1000	WB/ IF	ratón	Sigma-Aldrich

Tabla M2.- Listado de anticuerpos primarios utilizados en diferentes técnicas de inmunodetección. Western blot o inmunoblot (WB); inmunoprecipitación (IP); inmunofluorescencia (IF). Según las indicaciones recomendadas por el fabricante, los anticuerpos se diluyeron en 5% (p/v) BSA en TBS-T, o bien en 5% (p/v) leche en TBS-T, y se guardaron a 4 °C, o bien a -20 °C.

4.2.- Inmunofluorescencia.

Las células (2×10^5 células/ml), crecidas sobre cubres (20 x 20 mm), se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 min a T^a ambiente antes de permeabilizarse añadiendo PBS-Triton X-100 (0,5%). Tras 5 min de incubación a T^a ambiente, las células se saturaron con 1% (p/v) BSA en PBS. Después de 15 min a T^a ambiente, se incubaron con anticuerpo anti-vinculina (dilución 1:400). Se realizó una incubación de 30 min a 37 °C con el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario utilizado fue Cy³ goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, Inc.) a una dilución 1:100. Tras 30 min de incubación a 37 °C, las células fueron fijadas mediante Mowiol. Las preparaciones se dejaron secar a 4 °C y protegidas de la luz. Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio de epifluorescencia Nikon E800 a una longitud de excitación de 510-560 nm y una longitud de emisión a partir de 590 nm.

4.2.1.- Espectros de emisión de las prodigininas.

La internalización de PGs en células SK-MEL-5 fue seguida mediante el microscopio confocal espectral invertido Leica TCS-SL con control de temperatura y CO₂, acoplado a una cámara marca PeCon. La emisión de fluorescencia de PGs fue captada a una longitud de onda de 488-543 nm (**figura M1**).

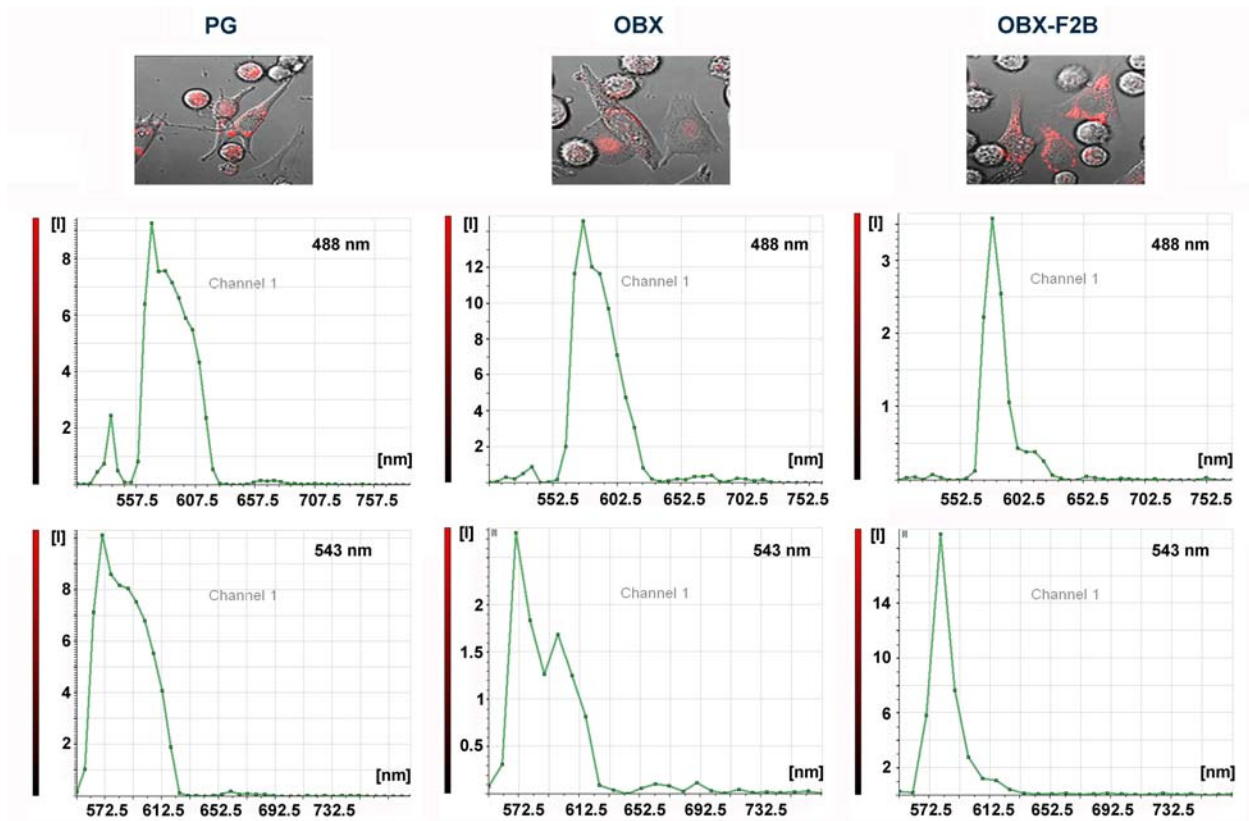


Figura M1.- Espectros de emisión de PG, OBX y OBX-F₂B.

5- Tinción Hoechst.

Para la detección de los cuerpos apoptóticos y condensación nuclear se usó el colorante de DNA Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO). Las células (2×10^5 células/ml) se lavaron con PBS y se resuspendieron en $2 \mu\text{g/ml}$ Hoescht 33342. Se incubaron durante 30 min a 37°C (protegidas de la luz). Las células se lavaron con PBS y se examinaron mediante el microscopio de epifluorescencia Nikon E800 a una longitud de excitación de 330-380 nm y una longitud de emisión a partir de 420 nm.

6.- Tinción Phalloidin.

Para la detección de los filamentos de actina se usó BODIPY FL Phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para ello, las células (2×10^5 células/ml), se incubaron en presencia de Phalloidin (dilución 1:50) durante 30 min a 37°C . Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio de epifluorescencia Nikon E800 a una longitud de excitación de 480 ± 30 nm y una longitud de emisión de 535 ± 40 nm.

7.- Ensayos de co-inmunoprecipitación.

Las interacciones entre MCL-1 y BAK, así como entre BAK y BAX, se evaluaron mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (co-IP). Después de los respectivos tratamientos (usando DMSO como control), las células SK-MEL-5 adheridas y flotantes se lavaron con PBS y se lisaron en una solución de 50 mM Tris (pH 8.0), 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% Nonidet P-40 (IGEPAL), 10 mM ortovanadato sódico, 50 mM NaF, 1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina y 0,1 mM PMSF. Los extractos celulares se centrifugaron a 10000 x g durante 15 min a 4°C. Entre 300-800 µg de extracto se llevaron a un volumen final de 1 mL con la misma solución de lisis. El complejo MCL-1/ BAK se co-inmunoprecipitó incubando el extracto celular con anticuerpo anti-MCL-1; mientras que, el complejo BAK-BAX se co-inmunoprecipitó usando anticuerpo anti-BAX siguiendo las especificaciones recomendadas para cada anticuerpo (**Tabla M2**). Los extractos se incubaron con el anticuerpo primario a 4°C durante 16 h en agitación suave. Durante 3 h adicionales se incubaron con 20 µL de proteína A-agarosa (Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO). Se realizaron 4 lavados con 1 mL de solución de lisis mediante centrifugaciones a 1000 x g durante 30 s a 4°C y el precipitado se resuspendió en un volumen final de 25 µL al que se añadió 5 µL de solución *Laemli*. Las muestras se calentaron 5 min a 100°C y se analizaron mediante inmunoblot usando los anticuerpos especificados en la **tabla M2**.

Los complejos mTORC1 y mTORC2 se aislaron mediante inmunoprecipitaron a partir de lisados de células SK-MEL-5 previamente estimuladas con insulina. Para ello, las células se lisaron con una solución de 50 mM Tris pH 7.5, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM pirofosfato sódico, 50 mM NaF, 0,3% CHAPS, 1 mM PMSF, 5 µM pepstatina A, 10 µM leupeptina. Se incubaron 200 µl de lisado celular con anticuerpo anti-raptor o anti-riCTOR, respectivamente, durante 16 h a 4°C y agitación suave. Se añadió 20 µl de proteína A-agarosa y se incubó durante 3 h adicionales antes de lavar las muestras con una solución de 50 mM Tris pH 7.5, 40 mM NaCl, 2 mM EDTA. Los inmunoprecipitados se usaron para analizar la actividad quinasa de los complejos mTORC1 y mTORC2 siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 8.

El complejo ILK/riCTOR se inmunoprecipitó a partir de lisados de células SK-MEL-5 siguiendo el mismo procedimiento descrito para los complejos de mTOR. En este caso se utilizó anticuerpo anti-ILK (dil.1/100).

8.- Ensayos de actividad quinasa.

La actividad de los complejos mTORC1 y mTORC2 inmunoprecipitados se analizó mediante ensayos de actividad quinasa no radiactivos. Para ello, se resuspendieron los inmunoprecipitados en un volumen final de 30 μ L de una solución de 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$ y 10 μ M ATP a la que se añadió 20 ng de proteína recombinante p70-S6K1 o AKT1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), respectivamente. La mezcla se incubó durante 30 min a 30°C en agitación vigorosa y constante. La reacción se detuvo añadiendo 6 μ L de solución *Laemli*. Las muestras se calentaron a 100°C durante 5 min y se analizaron mediante inmunoblot.

9.- Fraccionamiento subcelular.

Las células SK-MEL-5 se trataron con PG (100 nM), OBX (10 μ M) o DMSO (control) a 37 °C durante 24 h. Las células fueron lisadas con 25 mM Tris (pH 6.8), 250 mM sucrosa, 1 mM EDTA, 0,05% digitonina, 1 mM DTT, 1 μ g/ml aprotinina, 1 μ g/ml leupeptina, 1 μ g/ml pepstatina y 0,1 mM PMSF. Las muestras se centrifugaron a 13000 x g durante 2 min a 4°C. La fracción mitocondrial (pellet) se separó de la fracción citosólica (sobrenadante) y se lavó 2 veces con la solución de lisis. El homogenado total (input), la fracción mitocondrial y la citosólica se analizaron mediante inmunoblot usando anticuerpos anti-porina (marcador mitocondrial), anti-citocromo c y anti-actina (Santa Cruz Biotechnology).

10.- Ensayos de resonancia de plasmón superficial (SPR).

Los ensayos SPR (*surface plasmon resonance*) fueron llevados a cabo mediante el sistema Biacore T-100 basado en la utilización de biosensores SPR (**figura M2A**). La tecnología basada en la resonancia de plasmón o plasma superficial permite monitorizar a tiempo real la interacción entre proteína y proteína o bien, entre pequeñas moléculas y una proteína [Nordin H et al., 2005]. Los biosensores ópticos utilizados contienen una superficie de cristal (o prisma) recubierta por una capa metálica (en este caso, oro) entre las cuáles se generan los plasmones al hacer incidir sobre ellas luz polarizada. Los plasmones son oscilaciones colectivas de los electrones de conducción de un metal. La resonancia de plasmones superficiales es un fenómeno óptico que ocurre cuando la luz polarizada se dirige desde la capa de mayor índice de refracción (el prisma) hacia la de menor índice de refracción (la capa de oro). Al incidir la luz en la interfase entre el prisma y el metal, los electrones de esta superficie oscilan en resonancia generando una onda de plasma superficial. Al generarse

esta resonancia de plasma superficial se absorbe parte de la energía de la luz reduciendo la intensidad de la luz reflejada (**figura M2B**). El ángulo de incidencia de dicha luz es conocido como ángulo de resonancia, y éste se ve desplazado como consecuencia de cambios de índice de refracción sobre la superficie del metal. Estas variaciones en el ángulo de resonancia vienen dados al interaccionar los analitos con el ligando, y son proporcionales a la concentración de éstos. Finalmente, la intensidad de luz reflejada es detectada y expresada en unidades de resonancia (RU). Los cambios en los valores de RU recogidos, así como los valores de concentración de analito utilizados, son analizados por el software que incorpora el sistema Biacore T-100, el cuál permite determinar la cinética, afinidad y especificidad de las interacciones (**figura M2C**).

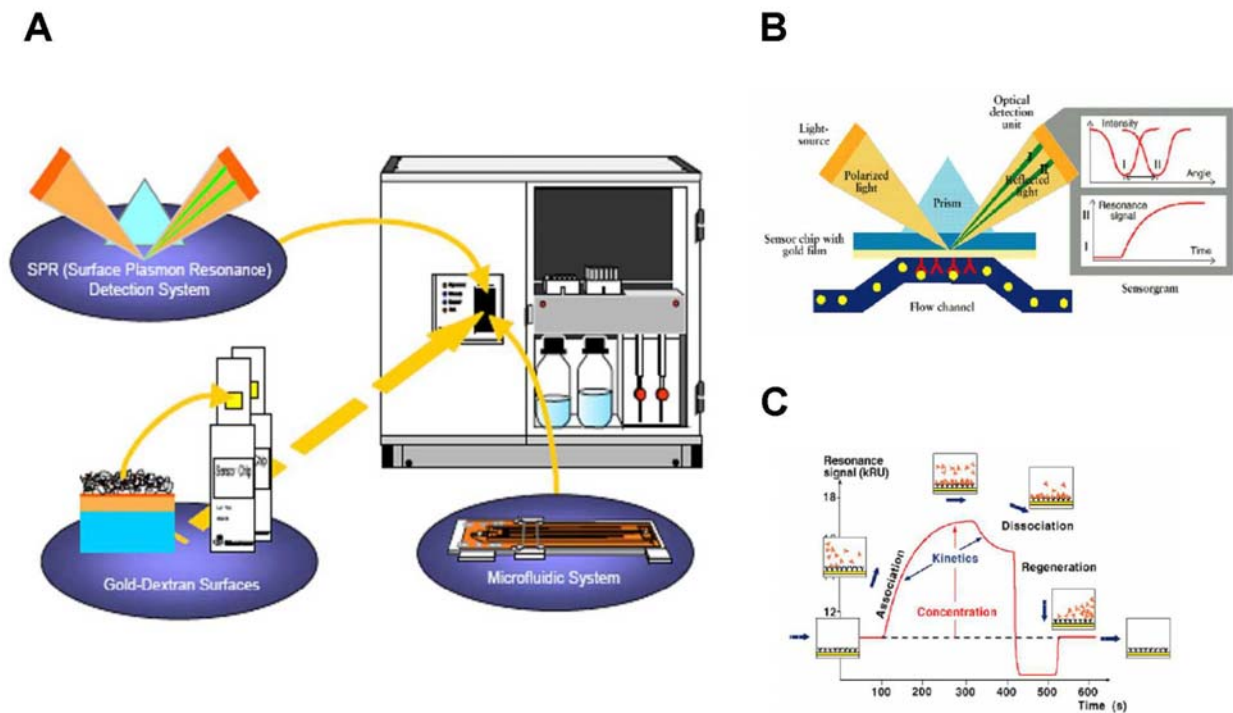
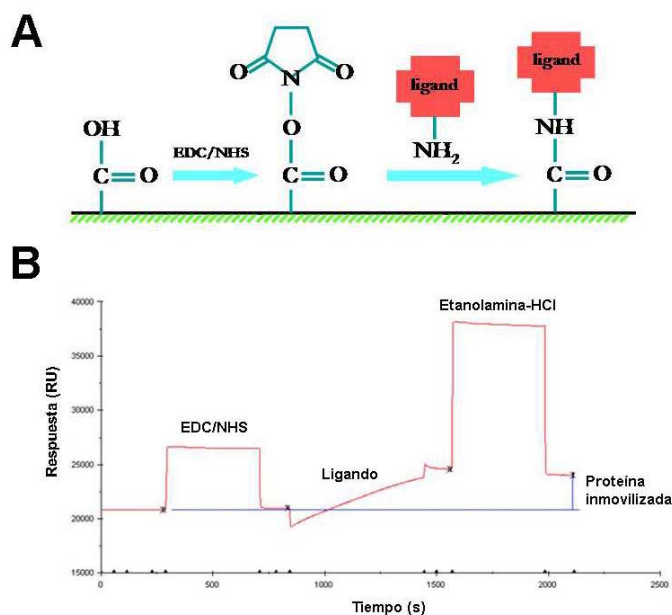


Figura M2.- Representación esquemática del sistema Biacore T-100.

Los ensayos SPR se diseñaron con el fin de monitorizar las interacciones entre mTOR, AKT1 o PP1 α (ligandos) y PG, OBX u OBX-F₂B (analitos). Los diferentes ligandos fueron inmovilizados covalentemente a la superficie del sensor siguiendo el protocolo Biacore T-100 establecido. Para ello usamos biosensores de tipo CM5 (GE Healthcare BioSciences AB, Uppsala, Sweden) que contienen una superficie de dextrano con grupos carboxil libres que permiten la unión de las proteínas a través de sus grupos amino. La superficie fue activada mediante 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-

hidroxisuccinimida (NHS) haciendo accesibles los grupos carboxil del sensor. El exceso de grupos reactivos fue desactivado mediante etanolamina (**figura M3**).

Figura M3.- Inmovilización de proteínas a través de uniones covalentes. (A) Activación de los grupos carboxil de la superficie de dextrano mediante la adición de EDC/NHS, permitiendo la unión del ligando mediante uniones amina. (B) Sensograma obtenido tras la activación, unión del ligando y bloqueo que permite estimar la cantidad real de proteína inmovilizada en el sensor.



La inmovilización de las proteínas se llevó a cabo a pH inferiores a sus respectivos puntos isoeléctricos (pI), favoreciendo así la unión covalente a la superficie de dextrano. La proteína recombinante GST-mTOR (aa 1360-2549) (Invitrogen, Carlsbad, CA) fué diluida a una concentración de 4,5 ng/ μ l en acetato pH 3.9, e inmovilizada en el canal 4 hasta un nivel de 14.000 RU (**figura M4A**). El canal 1 fue activado, bloqueado con GST y asignado como canal de referencia (**figura M4B**).

En los ensayos de especificidad, la proteína recombinante his-AKT1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) fué inmovilizada en el canal 3 siguiendo el mismo protocolo establecido. En este caso, his-AKT1 fué diluida a una concentración de 2,0 ng/ μ l en acetato pH 3.9, e inmovilizada en el canal 4 hasta un nivel de 6000 RU (**figura M4C**). El canal 2 fue activado, y asignado como canal de referencia.

En un nuevo sensor se inmovilizó 1 ng/ μ l his-PP1 α (canal 4) en acetato pH 4.8 hasta un nivel de 3.982 RU, dejando el canal 1 como canal de referencia (**figura M4D**).

Los diferentes *stocks* de PGs (diluidos en 100% DMSO) fueron diluidos en HBN-Mg (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 100 mM MgCl₂). La solución HBN-Mg fue usada como tampón de ensayo (*running buffer*). El ciclo de inyección de cada muestra se ajustó a

un flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 60 s. En cada serie de ciclos se utilizó como blanco HBN-Mg. Las fases de disociación se ajustaron a 120-200 s usando 25 mM NaOH (fase de regeneración entre ciclos). Además, entre diferentes series de inyecciones, se llevó a cabo un ciclo de corrección del solvente. Este ciclo pretende reajustar los cambios provocados en el índice de refracción al inyectar *running buffer* sólo o en presencia de analitos, evitando así errores en los valores de referencia.

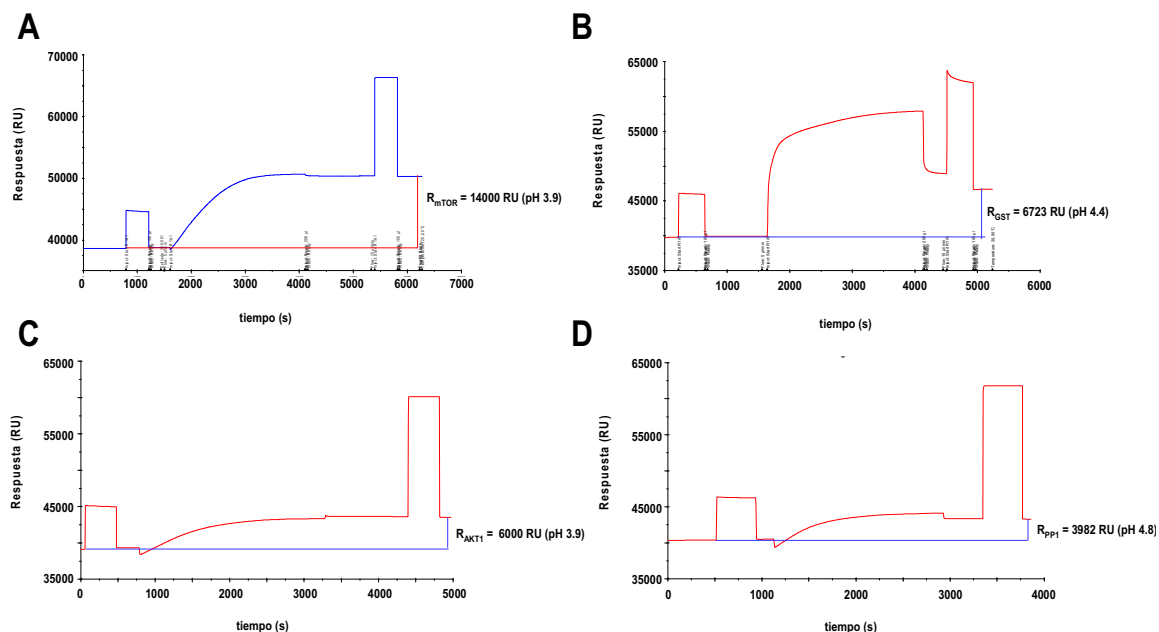


Figura M4.- Sensorgramas obtenidos tras la inmovilización de los diferentes ligandos unidos al sensor. Los valores RU a inmovilizar de cada ligando se calcularon previamente mediante la ecuación de Máxima Capacidad de Unión a la Superficie: $R_L = (MW_L/MW_A) \times R_{\text{máx}} \times s$; donde MW_L es el peso molecular del ligando, MW_A es el peso molecular del analito, $R_{\text{máx}}$ es la respuesta máxima establecida por el sistema (valores entre 20 y 500 RU), y “s” es el número de lugares de unión al que el analito podría unirse $\times L$ (consideramos $s=1$). Los valores teóricos calculados para cada ligando resultaron en un rango de: $R_{\text{mTOR}} = 10141$ a 253524 RU, $R_{\text{GST}} = 1607$ a 40193 RU, $R_{\text{AKT1}} = 3710$ a 92753 RU y $R_{\text{PP1}} = 2000$ a 57000 RU.

Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura instrumental (sensor y compartimento de las muestras) de 25°C , y a una temperatura de flujo a través de los canales de 20°C .

Para la evaluación cinética y de afinidad, se utilizó el software *Biacore T100 evaluation* (versión 1.1). Los datos se procesaron restando a cada uno de ellos los valores de RU provenientes del canal de referencia, así como los valores de RU obtenidos de los blancos de cada ensayo.

11.- Ensayos de herida (*Wound Healing*).

Las células HN4 se crecieron hasta llegar a confluencia en placas de 12 pocillos. Antes de hacer la herida, las células se sometieron a tres condiciones diferentes: manteniéndolas al 10% FBS en DMEM, reduciendo el suero al 1% durante 16 h, y añadiendo 2 µg/ml mitomicina C (Sigma) durante 2 h tras la deprivación.

Para hacer la herida en la monocapa de células confluentes se trazó una línea con una punta de plástico. Las células se lavaron con PBS para eliminar las células desenganchadas y se añadió DMEM al 10% ó 1% FBS según el caso. Las células se trataron con DMSO o PGs durante 24 h. Para analizar la evolución de la herida se tomaron fotos a diferentes tiempos con el microscopio invertido de contraste de fase Leica DM IRB con una cámara acoplada Olympus DP70.

Los resultados se muestran como porcentaje del área invadida (en relación con el área inicial de la herida). El tratamiento de las imágenes para medir las áreas se realizó con el programa *Image J*.

12.- Kinase Profiling.

Los ensayos de actividad quinasa fueron diseñados y llevados a cabo por *National Centre for Protein Kinase Profiling (MRC Protein Phosphorylation Unit, Dundee, UK)*. Todos los ensayos quinasa se realizaron en duplicados incubando cada proteína con su respectivo sustrato en presencia de ³³P-ATP. El *screening* se realizó a una concentración final de 10 µM PG siguiendo el procedimiento estándar QC de validación de cada ensayo. Las condiciones y procedimientos de validación de cada ensayo pueden consultarse en <http://www.kinase-screen.mrc.ac.uk/>

13.- Ensayos *in silico*.

Los ensayos de *modelling* fueron llevados a cabo por el Dr Guallar y colaboradores (*Supercomputing Center, Barcelona*). El ajuste obtenido mediante los algoritmos obtenidos con PELE (*Protein Energy Landscape Exploration*), combinado con el programa de *docking* Glide, permitió el análisis de la afinidad en las diferentes interacciones proteína-ligando.

Mediante aproximaciones computacionales se desarrolló un modelo de homología del centro activo de mTOR (aa 2131-2516), tal y como se describe en Espona-Fiedler M et al., 2012 (Anexo II). Por otro lado, para los modelos de los diferentes miembros de la familia BCL-2 se usaron las estructuras cristalizadas pdbname 2NLA, pdbname 1YSW y pdbname

2YXJ. En los tres modelos, se confirmó el dominio BH3 como la cavidad óptima de unión a PGs mediante el programa SiteMap.

14.- Análisis estadístico.

El análisis estadístico (ANOVA SIMPLE) de los resultados (obtenidos en triplicados) se llevó a cabo mediante Statgraphics plus 5.1. $P < 0.05$ y $P < 0.01$ son representados mediante * y **, respectivamente.

Resultados

1.- Caracterización del efecto citotóxico inducido por las prodigininas en células de melanoma.

1.1.- Efecto citotóxico mediado por prodigiosina y obatoclax.

La capacidad citotóxica de las prodigininas, prodigiosina (PG) y obatoclax (OBX) fue determinada mediante ensayos de viabilidad MTT en células de melanoma. Concretamente, en dos líneas celulares obtenidas de diferentes estadios de progresión del melanoma, la fase de crecimiento radial (células SK-MEL-28) y la fase de crecimiento vertical (células SK-MEL-5). Las células SK-MEL-28 fueron aisladas de un paciente con melanoma cutáneo *in situ*, mientras que las células SK-MEL-5 se obtuvieron del nódulo axilar de un paciente con melanoma metastásico.

Con el fin de comparar el potencial citotóxico de ambas moléculas y evaluar la sensibilidad de las células de melanoma al tratamiento con prodigininas (PGs), tratamos ambas líneas celulares a diferentes concentraciones (rango comprendido entre 1 y 8 μM) durante 24 y 48 h. La viabilidad celular, tras el tratamiento con PG a 24 h, se redujo de una manera dosis/tiempo-dependiente, obteniéndose una IC_{50} (concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad celular) de $4,51 \pm 0,47 \mu\text{M}$ y $1,02 \pm 0,15 \mu\text{M}$ en células SK-MEL-28 y SK-MEL-5, respectivamente. Mientras que a 24 h de tratamiento, los efectos citotóxicos inducidos por OBX fueron mínimos, a 48 h OBX mostró una IC_{50} de $2,2 \pm 0,43 \mu\text{M}$ y $1,8 \pm 0,21 \mu\text{M}$ en células SK-MEL-28 y SK-MEL-5, respectivamente (**figura R1A-D**).

Independientemente del origen de las células de melanoma, PG muestra una mayor eficiencia como agente citotóxico comparado con OBX. Además, las células con mayor potencial metastásico (SK-MEL-5) son las que muestran una mayor sensibilidad a los tratamientos con PGs. Estos resultados nos permiten relacionar la resistencia de estas células con su potencial metastásico.

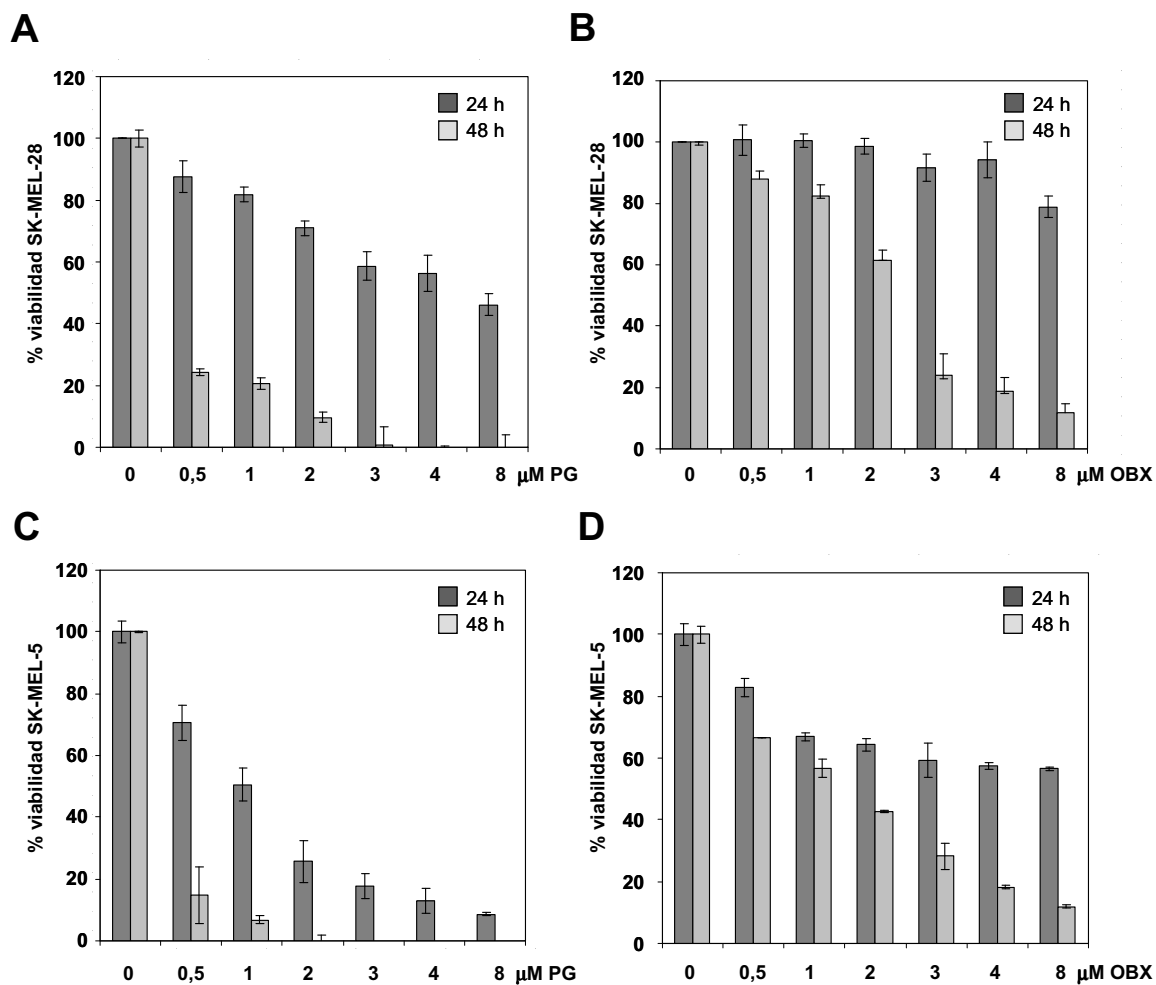


Figura R1.- Efecto citotóxico inducido por PG y OBX en células SK-MEL-28 y SK-MEL-5. Las células SK-MEL-28 fueron tratadas a 24 y 48 h con PG (A) u OBX (B) en un rango de concentraciones de 0 a 8 μ M. Los tratamientos se repitieron con PG (C) u OBX (D) en células SK-MEL-5. La viabilidad celular fue determinada mediante ensayos MTT. El porcentaje de las células viables se calculó como el ratio de A_{570} de las células tratadas respecto al control (DMSO). Los valores se muestran como la media \pm S.D. (desviación estándar) de tres experimentos independientes llevados a cabo en triplicados.

1.2.- Estudio de los mecanismos de muerte celular activados por prodigiosina.

Los efectos citotóxicos de PG y OBX han sido ampliamente descritos en diferentes tipos celulares, incluido en melanoma [Nguyen M et al., 2007; Abrahantes-Pérez MC et al., 2006]. Se observó que el efecto citotóxico mediado por OBX es inducido a través de la activación simultánea de autofagia y apoptosis en células de melanoma. Resultados que no sorprenden dada la acción de OBX como inhibidor pan-BCL-2 [Zhai D et al., 2006]. Por otro lado, los efectos pro-apoptóticos de PG también son bien conocidos, sin embargo, no se han realizado estudios que corroboren su naturaleza BH3-mimética. En este estudio nos planteamos la identificación de nuevas dianas moleculares de PG dentro de la familia de proteínas anti-apoptóticas BCL-2, así como la activación de autofagia como mecanismo de muerte adicional.

1.2.1.- Activación de autofagia y apoptosis inducida por prodigiosina.

Con el fin de ampliar y evaluar los mecanismos de muerte celular inducidos por PG, las células de melanoma fueron tratadas a diferentes tiempos con una dosis correspondiente a la IC_{50} . Tras el tratamiento, se analizaron los niveles de LC-3 (proteína marcadora de autofagia) y de las caspasas-3 y -9 (proteínas marcadoras de apoptosis) presentes en el extracto celular (**figura R2A**). Los resultados mostraron la desaparición de la forma citosólica de LC-3 I a la vez que aparece la forma conjugada a fosfatidiletanolamina LC-3 II que se localiza en la membranas de los autofosomas [Kabeya Y et al., 2004]. Simultáneamente, se detectó un aumento en los niveles de caspasa efectora de la vía intrínseca de la apoptosis (caspasa-9) y la disminución de la procaspasa-3 (forma inactiva de la caspasa-3). A las 6h de tratamiento, observamos proteólisis generalizada en células SK-MEL-28. La aparición de cuerpos apoptóticos corroboraron el efecto proapoptótico de PG en ambas líneas celulares (**figura R2B**). Estos resultados demuestran que ambos mecanismos de muerte celular, autofagia y apoptosis, se encuentran activados tras el tratamiento con PG en células de melanoma.

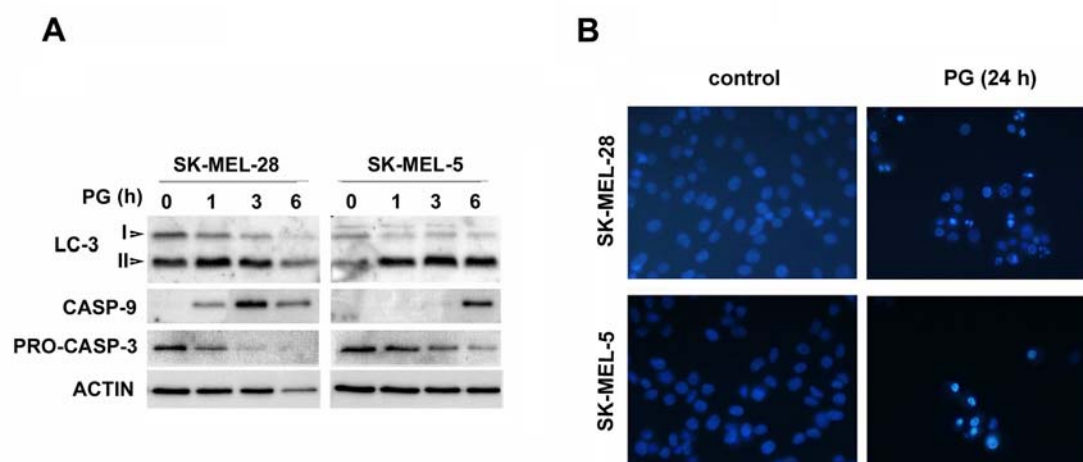


Figura R2.- PG induce la activación de los mecanismos de autofagia y apoptosis. (A) Las células SK-MEL-28 y SK-MEL-5 fueron tratadas PG (IC_{50}) a diferentes tiempos. Los extractos celulares se analizaron mediante Inmunoblot detectando los niveles de LC-3, caspasa-9 y pro-caspasa-3. Como control de carga se usó β -actina. (B) Tras 24 h de tratamiento con PG (IC_{50}), se observó la formación de cuerpos apoptóticos y condensación nuclear mediante tinción con Hoechst 33342.

1.2.1.1.- Identificación de prodigiosina como antagonista de MCL-1.

Autofagia y apoptosis son dos mecanismos de muerte celular que comparten reguladores como BCL-2 y BCL- X_L . La unión de moléculas BH3-miméticas a estos reguladores anti-apoptóticos promueve la liberación de los miembros pro-apoptóticos permitiendo la activación de la vía mitocondrial apoptótica y, en algunos casos como fue

descrito para OBX, la activación simultánea de autofagia. Tras observar la misma respuesta tratando las células de melanoma con PG, nos planteamos evaluar su capacidad de antagonizar proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2. Con este fin, combinamos estudios *in silico* e *in vitro* que nos han permitido analizar la interacción entre PG y proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2.

Los modelos *in silico* fueron generados por Ali Husseini bajo la supervisión del Dr. Víctor Guallar (*Supercomputing Center*, Barcelona). Estos modelos muestran la región del dominio BH3 de MCL-1, BCL-X_L y BCL-2, a la cuál se unen PG y OBX (figura R3A). La figura R3B muestra en detalle los residuos involucrados en la interacción entre PGs y MCL-1. Estos residuos (Val253, Val249, Ala227 y Leu267) conforman una región hidrofóbica en donde PG y OBX se unen con gran afinidad.

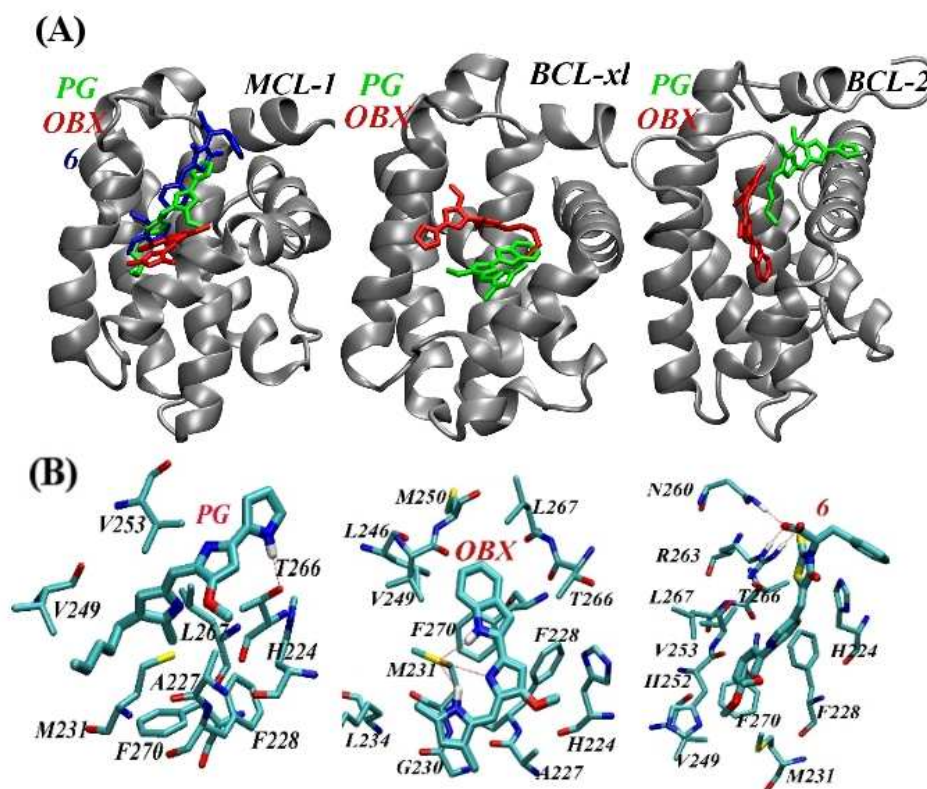


Figura R3.- Modelo *in silico* de la interacción entre PG y OBX a diversas proteínas de la familia BCL-2. En estos modelos el ligando 6 (derivado de la rodanina) fue usada como control positivo.

Estudios previos *in vitro* demuestran que las moléculas BH3 miméticas que antagonizan MCL-1 impiden la unión de BAK a su dominio BH3 y, en consecuencia, promueven los diversos eventos moleculares que conllevan la activación de la apoptosis. MCL-1 se une y regula la proteína pro-apoptótica BAK, mientras que BCL-2 regula

BAX [Willis SN et al., 2007]. Las moléculas BH-miméticas promueven la rotura de estos complejos, permitiendo la liberación de BAX y BAK que se unen conformando los poros mitocondriales por donde sale, entre otros factores pro-apoptóticos, el citocromo c y Smac/Diablo a citosol promoviendo, a su vez, la activación secuencial de las diversas caspasas que conforman la vía intrínseca de la apoptosis.

En primer lugar, analizamos los efectos sobre los niveles de expresión de estos miembros de la familia BCL-2 tras el tratamiento con PG u OBX en células de melanoma SK-MEL-5. Los resultados mostraron una disminución en la expresión de las proteínas anti-apoptóticas BCL-2 y MCL-1, mientras que variaciones en la expresión de las proteínas pro-apoptóticas BAK y BAX no fueron apreciables tras 8 h de tratamiento con PG (**figura R4A**). A partir de los extractos celulares obtenidos tras el tratamiento con DMSO (control), PG (8 h, IC₅₀) u OBX (8 h, 10 µM), MCL-1 se co-inmunoprecipitó junto con BAK, indicando que en condiciones control estas proteínas heterodimerizan. Mientras que, tanto tras el tratamiento con PG, como con OBX (usado como control positivo), se detectó el desplazamiento de BAK, demostrando que ambas PGs rompen el complejo MCL-1/BAK (**figura R4B**). La activación de la vía intrínseca de la apoptosis fue corroborada mediante la detección del complejo BAK/BAX a concentraciones nanomolares de PG tras 24 h de tratamiento. Para ello, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación análogos usando anticuerpo anti-BAX (**figura R4C**). Finalmente, se aislaron las fracciones mitocondrial y citosólica a partir de los extractos celulares obtenidos tras el tratamiento con PG (100 nM) y OBX (10 µM) a 24 h. El análisis de estas fracciones por inmunoblot permitió detectar la salida del citocromo c desde la mitocondria al citosol (**figura R4D**).

De manera conjunta, estos resultados coinciden con los efectos descritos en estudios previos con OBX [Jiang CC et al., 2009; Pan J et al., 2010; Nguyen M et al., 2007], y muestran por, primera vez, que PG también se comporta como molécula BH3 mimética.

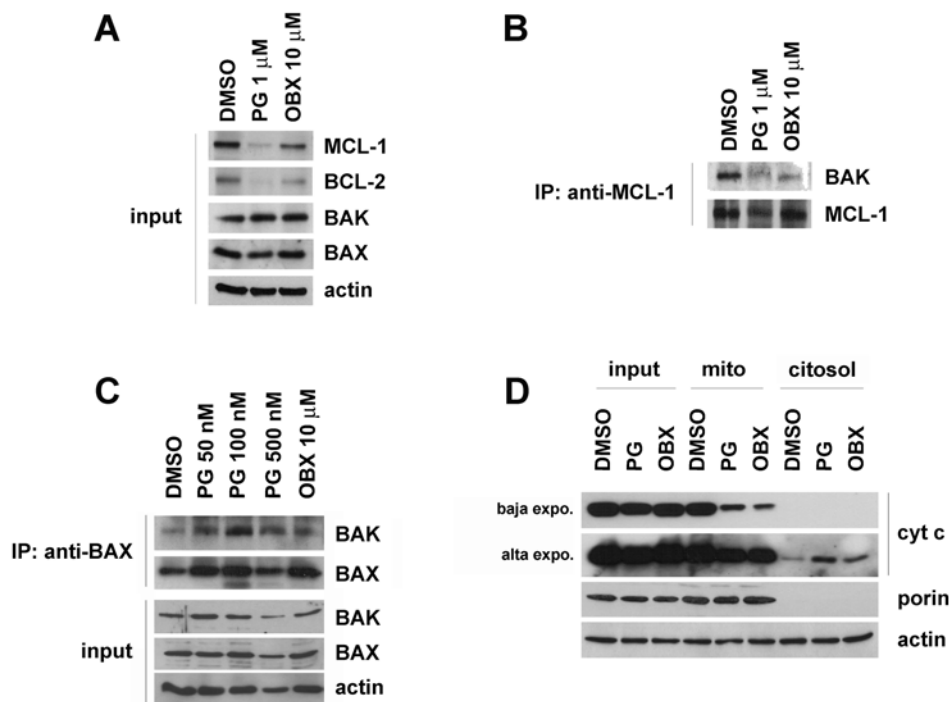


Figura R4. PG actúa como molécula BH3 mimética. (A) Niveles de expresión de proteínas BCL-2 en células de melanoma SK-MEL-5. Las células fueron tratadas con PG (1 μ M) u OBX (10 μ M) durante 8 h. El lisado celular fue analizado mediante Inmunoblot. Actina fue utilizada como control de carga. **(B) PG antagoniza MCL-1 rompiendo el complejo MCL-1/BAK.** MCL-1 fue inmunoprecipitado a partir del lisado celular obtenido tras el tratamiento a 8 h con PG u OBX a las dosis indicadas. Los inmunoprecipitados fueron analizados mediante Inmunoblot usando anticuerpos anti-MCL-1 y anti-BAK. **(C) BAK oligomeriza con BAX tras el tratamiento con PG.** BAX fue inmunoprecipitada del lisado celular obtenido tras el tratamiento a 24 h con PG (50, 100 y 500 nM), OBX (10 μ M) o DMSO (control). La formación del complejo BAX/BAK fue visualizado mediante Inmunoblot usando anticuerpos anti-BAK y anti-BAX. **(D) Salida de citocromo c a citosol tras el tratamiento con PG u OBX.** Las células SK-MEL-5 fueron tratadas durante 24 h con PG (100 nM), OBX (10 μ M) o DMSO. Mediante centrifugación diferencial se aislaron las mitocondrias de la fracción citosólica. La liberación del citocromo c a citosol se analizó mediante Inmunoblot usando Porina como marcador mitocondrial y control de calidad en el proceso de aislamiento mitocondrial.

2.- Identificación de dianas moleculares de las prodigininas.

2.1.- Estudio de la prodiginina como inhibidor multi-quinasa.

En melanoma, las vías de señalización RAS/RAF/MAPK y PI3K/AKT/mTOR juegan un papel clave en la supervivencia celular, así como en la regulación de diversos mecanismos de muerte celular. Con el fin de analizar el potencial de las PGs como reguladores de proteínas quinasas, se realizó un *screening* o cribado de la actividad de PG como inhibidor de quinasas. Este *screening* fue llevado a cabo por el *National Centre for Protein Kinase Profiling (MRC Protein Phosphorylation Unit, Dundee, UK)* usando una concentración 10 μ M de PG frente a un panel de 65 proteínas quinasas codificadas en humanos. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo usando ^{33}P -ATP en condiciones *in vitro* (**figura R5**). Los resultados mostraron que PG inhibe de manera significativa (> 70% de la actividad) mayoritariamente quinasas pertenecientes a la familia de proteínas AGC que se encuentran involucradas en las vías PI3K y MAPK. Las proteínas inhibidas por PG fueron AKT α (también conocida como *protein kinase B*, PKB α), la proteína ribosomal S6 (*ribosomal S6 kinase*, RSK-2), la proteína quinasa activada por mitógenos y factores de estrés MSK-1 (*mitogen and stress activated protein kinase*), la quinasa SGK-1 (*serum glucocorticoid-inducible kinase*), la quinasa dependiente de calmodulina CaMK-1 (*calmodulin-dependent kinase*) y la tirosin quinasa Btk (*Bruton's tyrosine kinase*) [Dalby KN et al., 1998; Hanada M et al., 2004]. Sin embargo, otras proteínas quinasas críticas en estas vías no resultaron inhibidas como PDK1 (*Phosphoinositide-dependent protein kinase-1*), GSK-3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*), los receptores de insulina IGF-IR (*insulin growth factor-I receptor*) e IR (*insulin receptor*), las proteínas quinasas activadas por mitógenos pertenecientes a la familia de las MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) ERK1/2 (*extracellular related kinases*), p38, JNK-1/2 (*c-Jun N-terminal kinase*) y la quinasa inhibidora del factor kappa-B IKK (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*). Desafortunadamente, en este panel no se encontraban incluidas otras proteínas de nuestro interés como mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Estos resultados apuntaron a que PG podía estar actuando como inhibidor multi-quinasa, inhibiendo varios de los efectores críticos en el control del ciclo celular y la progresión tumoral.

MRC		National Centre for Protein Kinase Profiling		Division of Signal Transduction Therapy, MRC Protein Phosphorylation Unit, University of Dundee			
Protein Kinase	Species	% activity	S.D.	Protein Kinase	Species	% activity	S.D.
AMPK	rat	87	6	MNK1 [2-424]	human	120	4
Aurora B [1-344]	human	49	10	MNK2α [2-465]	human	111	6
BTK [2-659]	human	15	1	MSK1 [2-802]	human	32	3
CaMK1 [2-369]	human	19	5	MST2 [2-491]	human	73	3
CaMKKβ [1-541]	human	84	3	MST4 [1-416]	human	87	10
CDK2/cyclin A	human	91	3	NEK2A [1-445]	human	73	6
CHK1 [1-476]	human	96	3	NEK6 [8-313]	human	43	3
CHK2 [5-543]	human	94	8	p38α MAPK [1-360]	human	121	3
CK1δ [1-294]	human	90	1	p38β MAPK [1-364]	human	100	19
CK2α [2-391]	human	97	10	p38γ MAPK [1-367]	human	92	1
CSK [1-450]	human	91	11	p38δ MAPK [1-365]	human	97	1
DYRK1a [1-499]	human	70	3	PhKy1[2-297]	human	67	7
DYRK2 [3-528]	human	72	6	PDK1 [52-556]	human	112	7
DYRK3 [1-588]	human	108	7	PIM1 [2-313]	human	47	2
EF2K [2-725]	human	48	11	PIM2 [2-334]	human	78	28
EPH-A2 [591-976]	human	104	15	PIM3 [2-326]	human	69	11
EPH-B3 [561-998]	human	82	10	PKBα (S473D) [118-480]	human	24	2
ERK1 [2-379]	human	78	11	PKD1 [2-912]	human	112	7
ERK2 [2-360]	human	96	15	PLK1 [1-603]	human	116	0
ERK8 [2-544]	human	95	2	PKA [2-351]	human	70	4
FGF-R1 [400-820]	human	110	24	PKCα [1-672]	human	98	3
GSK3β [2-420]	human	48	19	PKC ζ [2-592]	human	92	6
HIPK2 [165-564]	human	74	3	PRAK [1-471]	human	66	7
IGF1R [954-1367]	human	72	15	PRK2 [501-984]	human	100	8
IKKβ [1-736]	human	66	12	ROCKII [2-543]	rat	82	3
IKKε [1-716]	human	148	49	RSK1 [1-735]	human	69	10
IR [1001-1382]	human	112	12	RSK2 [2-740]	human	22	1
IRR [944-1236]	human	95	17	S6K1 (T412E) [1-421]	human	96	5
JNK1α1 [1-384]	human	77	16	SGK1 (S422D) [60-431]	human	29	3
JNK2α2 [1-424]	human	90	15	Src [2-533]	human	80	24
LCK [2-509]	mouse	68	8	SRPK1 [2-654]	human	90	4
MAPKAP-K2 [46-400]	human	40	4	SYK [1-635]	human	68	3
MARK3 [2-729]	human	121	2	TBK1 [1-729]	human	125	11
MELK [2-651]	human	113	10	VEGFR [784-1338]	human	92	3
MKK1 [1-393]	rabbit	77	13	YES1 [1-543]	human	89	8
MLCK [475-838]	human	135	18				

Figura R5.- Screening de PG como inhibidor multi-quinasa. Los ensayos de actividad quinasa con (³³P-ATP) se llevaron a cabo en condiciones *in vitro* a una concentración de 10 μM. Los ensayos fueron realizados en duplicados. Los valores que se muestran representan la media ± S.D. Según estipula el propio *National Centre for Protein Kinase Profiling*, valores con una desviación estándar superiores a 15 no se aceptaron como válidos.

2.2.- Efecto de prodigininas en las vías de supervivencia PI3K/AKT/mTOR y Ras/Raf/MAPK.

Para la caracterización de los mecanismos moleculares que median el efecto citotóxico de PGs en las células de melanoma, se requiere la identificación de la/s diana/s molecular/es de estos compuestos. En este sentido, los resultados obtenidos a

partir de los ensayos de actividad llevados a cabo por el centro MRC apuntaron a varias potenciales dianas moleculares dentro de las vías PI3K y MAPK. Con el fin de validar dichas posibles dianas se estudió el efecto de PG sobre el estado de fosforilación de los principales efectores de ambas vías en células SK-MEL-28 y SK-MEL-5. En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión y fosforilación basales de AKT y ERK1/2 (principales efectores de las vías PI3K y MAPK, respectivamente) de ambas líneas celulares (**figura R6A**). Tal y como está descrito, los resultados muestran una mayor sobre-activación de ambas vías de supervivencia en células SK-MEL-28 [Miller AJ et al., 2006]. Activación que se asocia a una mayor resistencia frente a quimioterapéuticos. Posteriormente, las células fueron tratadas con PG a una concentración IC_{50} hasta 1 h. A tiempos muy tempranos (15-30 minutos) la desfosforilación de AKT en su residuo S473 es evidente (**figura R6B**).

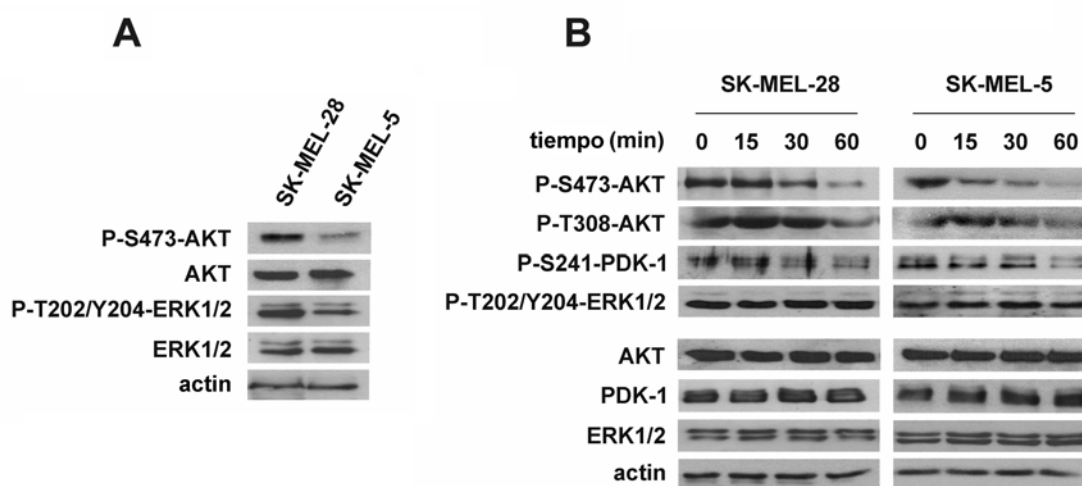


Figura R6.- (A) Estado de activación de las vías PI3K/AKT y MAPK en células de melanoma. A partir de extractos celulares sin tratar se analizaron los niveles de expresión y fosforilación de AKT y ERK1/2 mediante Inmunoblot. **(B) PG induce la desfosforilación de AKT pero no de ERK1/2.** Las células SK-MEL-28 y SK-MEL-5 se trataron de 0 a 1 h con PG (IC_{50}). Los niveles de inhibición de AKT se analizaron detectando la forma fosforilada de AKT en su residuo S473 y T308. Usamos actina como control de carga.

La actividad de AKT depende de su fosforilación en dos residuos, la S473 (fosforilado por el complejo mTORC2) y la T308 (fosforilado por PDK-1). Los resultados mostraron una desfosforilación muy marcada en la S473, mientras que la desfosforilación en la T308, en consonancia con PDK-1, resultó posterior y más sutil. Hasta 1 h de tratamiento, tampoco se detectaron variaciones marcadas en los niveles de

fosforilación de ERK1/2. Estos resultados, sugieren una posible inhibición de la vía PI3K/AKT mediada a través de mTORC2.

2.3.- Prodigininas, inhibidores duales de los complejos mTORC1 y mTORC2.

2.3.1.- Bloqueo del *feedback* negativo S6K1/ IRS-1 en la vía mTOR.

Con el fin de confirmar la inhibición de la señalización promovida a través de la vía AKT/mTOR/p70S6K en células de melanoma, examinamos los efectos sobre sus principales efectores y reguladores. Las células fueron tratadas con PG y OBX a diferentes dosis durante 1 h y, posteriormente, estimuladas con insulina. Como muestra la **figura R7A**, la estimulación de la vía con insulina promueve la fosforilación de AKT y PRAS40 (sustrato de AKT y regulador negativo de mTORC1). PRAS40, al ser fosforilado por AKT, se disocia del complejo mTORC1 perdiéndose así su actividad inhibitoria sobre este complejo, y permitiendo la fosforilación de sus sustratos p70S6K y 4E-BP1 [Sancak Y et al., 2007]. Tras el tratamiento con PGs, la desfosforilación de estos efectores, sustratos y reguladores de mTOR confirman la inhibición de la vía. Si bien es cierto que fue necesaria una mayor concentración de OBX (10 μ M) para obtener similares efectos que los obtenidos con PG (IC₅₀).

Mientras que la inhibición de mTORC1 promueve la activación de AKT a través del *feedback loop* mTORC1/S6K1/IRS-1, se observó que inhibidores duales de mTORC1 y mTORC2 eran capaces de bloquear este mecanismo de compensación manteniendo los niveles de desfosforilación de AKT [Guertin DA et al., 2009]. Así pues, evaluar el estado de activación o bloqueo de este *feedback loop* es una herramienta más para estudiar el potencial de inhibidores de mTOR. Estudios con rapamicina, un conocido inhibidor de mTORC1, fueron claves en la identificación de este *feedback*. En células de melanoma, comparamos los efectos de PG y OBX con los efectos promovidos en presencia de rapamicina, con el fin de corroborar la inhibición dual de ambos complejos de mTOR tras el tratamiento con PGs. Tras el tratamiento a diferentes concentraciones de rapamicina durante 1 h, los niveles de inhibición de mTORC1 fueron examinados a través del grado de desfosforilación de su sustrato, p70S6K y, en consecuencia del incremento de los niveles de fosforilación de AKT. La inhibición de mTORC1, dosis-dependiente, mostró su máximo efecto a 100 nM (**figura R7B**). Tratamos ambas líneas celulares con PG (IC₅₀) u OBX (10 μ M) en presencia o ausencia de rapamicina (100 nM), previamente a la estimulación de la vía con insulina. Tras el

tratamiento con ambas PGs, los resultados mostraron una disminución tanto en los niveles de fosfo-p70S6K como de fosfo-AKT, sugiriendo que éstas son capaces de inhibir de manera dual mTORC1 y mTORC2, bloqueando así el mecanismo dependiente de IRS-1 descrito. Sin embargo, en comparación con rapamicina, las PGs no mediaron una desfosforilación de p70S6K total, sugiriendo una inhibición sólo parcial de mTORC1 (**figura R7C**).

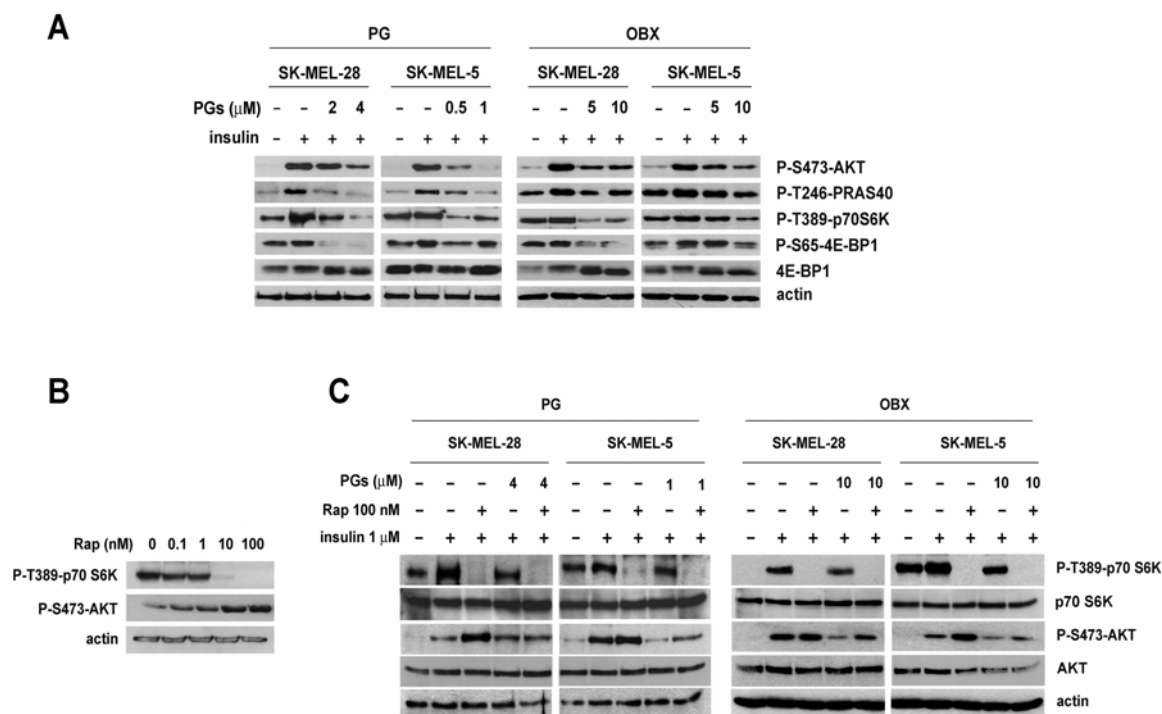


Figura R7.- Las PGs inhiben la vía PI3K/AKT/mTOR en células de melanoma. (A) Efecto de las PGs sobre los principales efectores, reguladores y sustratos de mTOR. Las células SK-MEL-28 y SK-MEL-5 fueron deprivadas durante 24 h, y tratadas a 1 h con PG (IC_{25} o IC_{50}) u OBX (5 ó 10 μ M) antes de ser estimuladas con insulina (1 μ M, 30 min). Los extractos celulares se analizaron mediante Inmunoblot usando como control de carga la actina. **(B) Respuesta dosis-dependiente de la rapamicina.** Las células SK-MEL-5 fueron tratadas con rapamicina a diferentes concentraciones en un rango de 0,1 a 100 nM durante 30 min. Los extractos celulares se analizaron mediante Inmunoblot usando anticuerpos contra las formas fosforiladas de p70S6K y AKT. **(C) Las PGs bloquean el *feedback* negativo S6K1/IRS-1.** Antes de la estimulación con insulina, las células (deprivadas) fueron pre-incubadas, o no, con rapamicina (100 nM, 15 min) y tratadas con PGs a las concentraciones indicadas durante 1 h.

2.3.2.- Inhibición de los complejos mTORC1 y mTORC2 *in vitro*.

Para corroborar lo observado, mediante ensayos de actividad (no radiactivos) evaluamos el potencial de las PGs como inhibidores duales de mTORC1 y mTORC2. Ambos complejos de mTOR fueron obtenidos a partir de extractos de células SK-MEL-5 estimuladas, previamente, con insulina. Los complejos activos mTORC1 y mTORC2

endógenos fueron inmunoprecipitados usando anticuerpos anti-raptor o anti-riCTOR, respectivamente. El complejo mTORC2 fue incubado en presencia de ATP-Mg²⁺ usando la proteína recombinante AKT como sustrato en la reacción *in vitro*. A la reacción se añadió, según el caso, DMSO (control), PG (10 μ M) u OBX (10 μ M) (**figura R8A**). Los ensayos de actividad de mTORC1 se llevaron a cabo en las mismas condiciones usando p70S6K como sustrato (**figura R8B**). Los niveles de fósforo incorporados en ambos sustratos se detectaron mediante Immunoblot, de manera que la pérdida de actividad en ambos complejos se pudo cuantificar en función de los niveles de desfosforilación de AKT o p70S6K. Respecto a la actividad basal (control), los ensayos de actividad en presencia de PG y OBX mostraron una inhibición de la actividad de mTORC2 del 89% y del 62%, respectivamente. Ambas PGs también inhibieron de manera significativa el complejo mTORC1, siendo del 48% en presencia de PG y del 78% en presencia de OBX (**figura R8C**). Estos resultados confirman que el bloqueo del *feedback loop* S6K1/IRS-1 se da a través de la inhibición dual de los complejos mTORC1 y mTORC2.

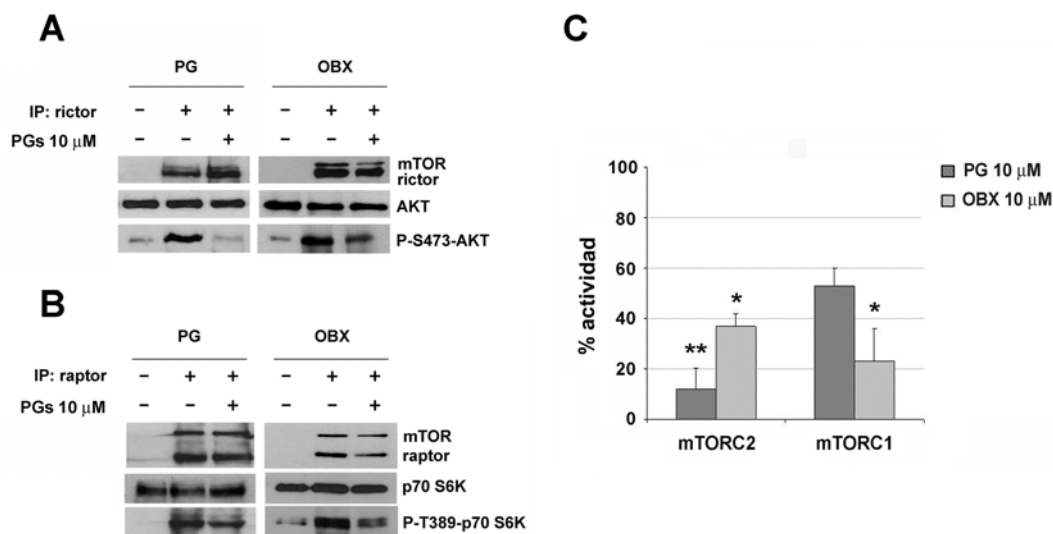


Figura R8.- Las PGs actúan como inhibidores duales de mTORC1 y mTORC2 en células de melanoma. La actividad de los complejos endógenos de mTOR se analizó mediante ensayos de actividad no radiactivos partiendo de los complejos inmunoprecipitados de células SK-MEL-5 previamente estimuladas con insulina. Los complejos activos de mTORC2 y mTORC1 fueron inmunoprecipitados usando anticuerpos anti-rictor (**A**) o anti-raptor (**B**), respectivamente. El complejo mTORC2 se incubó en presencia de proteína recombinante AKT y el complejo mTORC1 en presencia de proteína recombinante p70S6K. Las mezclas de reacción se incubaron durante 30 min a 30°C en presencia, o no, de PG u OBX (ambos a 10 μ M). Los niveles de fosforilación de p70S6K y AKT fueron visualizados por inmunoblot. (**C**) La actividad de cada complejo se expresa en valores de porcentaje. Estos valores se obtuvieron normalizando los niveles de fosfo-AKT y fosfo-p70S6K en función de los niveles totales de AKT y p70S6K. Los valores representan la media \pm S.D de tres experimentos independientes. La significancia estadística de los valores se analizó mediante el programa StatGraphs y se muestra como *, P<0.05; **, P<0.01.

2.4.- El papel de mTOR en el efecto citotóxico de prodigininas.

El siguiente objetivo que nos planteamos fue confirmar mTOR como diana molecular crítica en la mediación del efecto citotóxico de las PGs. Con este propósito, evaluamos los efectos de PG u OBX sobre la viabilidad de células modificadas estables SW-480 control (sh- ϕ), con mTOR silenciado (*knockdown* sh-mTOR) o con raptor silenciado (*knockdown* sh-raptor).

En primer lugar, evaluamos la eficacia del silenciamiento mediante la detección de los niveles de expresión de mTOR y raptor (**figura R9A**). La depleción de ambas proteínas resultó en una reducción de la expresión de la proteína mTOR endógena del 47%, mientras que la reducción fue del 74% en el caso de raptor (**figura R9B**). Además, la desfosforilación de AKT y p70S6K confirmaron la pérdida de funcionalidad de la vía mTOR debida a la depleción de mTOR o raptor. Como era de esperar, acorde con los niveles de silenciamiento, se observó una mayor disminución de fosfo-p70S6K en células sh-raptor. El tratamiento con PG u OBX (4 μ M, 1 h) promovió la completa inhibición de AKT, mientras que a 6 h de tratamiento se vieron reducidas tanto la expresión total de p70S6K como de AKT (**figura R9C**). Tras 1 h de tratamiento con PGs se observó un aumento de la actividad de la vía MAPK que detectamos analizando el estado de fosforilación de ERK1/2. Este aumento en la actividad MAPK se correlaciona con la desfosforilación de AKT observada. La activación de la vía MAPK podría ser consecuencia (y en compensación) de la inhibición de mTORC1. Está descrita la red de intercomunicación (*cross-talking*) entre la vía mTOR y la vía MAPK a través de Raf, que mantiene ERK1/2 activos mientras mTORC1 está inhibido, procurando así, la supervivencia celular a través de la vía MAPK [Carracedo A et al., 2008]. Este *cross-talk* explicaría que, en células sh-raptor, este aumento en la actividad MAPK no sea tan acusado.

El tratamiento de las células SW-480 a diferentes concentraciones (en un rango de 0-4 μ M) de PG u OBX a 24 o 48 h, demostró que el silenciamiento de mTOR o raptor previene el efecto citotóxico de las PGs (**figura R9D**). Al igual que se observó en células de melanoma, el efecto de PG sobre la viabilidad celular resultó más potente que el obtenido con OBX. Los resultados más significativos se obtuvieron tras 48 h de tratamiento. A una concentración de 4 μ M, tanto de PG como de OBX, la muerte celular

se redujo un ~35-40% en comparación con las células control tratadas, demostrando que el efecto citotóxico de las PGs está mediado, al menos en parte, por mTOR (**figura R9E**).

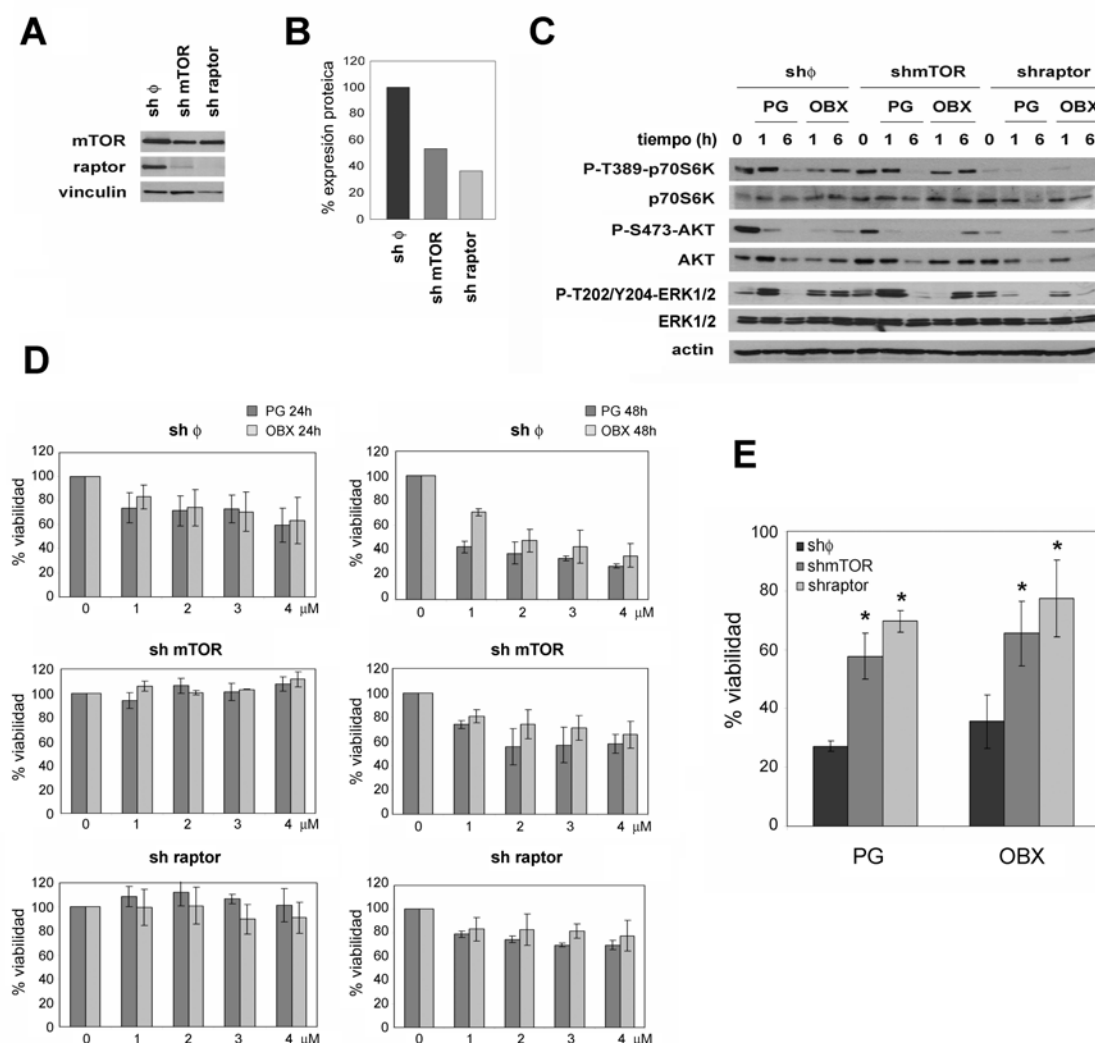


Figura R9.- La pérdida de funcionalidad de la vía mTOR previene los efectos citotóxicos de PGs. (A) Depleción de mTOR y raptor en células SW-480. Se analizaron los niveles de expresión de mTOR y raptor de células modificadas estables control (sh- ϕ), *knockdown* de mTOR (sh-mTOR) o *knockdown* raptor (sh-raptor). Como control de carga se usó la vinculina. **(B)** Los inmunoblots fueron cuantificados y normalizados en relación con los valores control. Los niveles de expresión proteica se muestran en valores de porcentaje. **(C) Inhibición de los principales efectores de mTORC1 y mTORC2 en células silenciadas.** Las células fueron tratadas con PG u OBX a una concentración de 4 μ M a 1 y 6 h. Los niveles de expresión y fosforilación de p70S6K, AKT y ERK1/2 fueron detectados mediante inmunoblot. **(D) Efecto citotóxico mediado por PGs en células estables control y *knockdown* de mTOR y raptor.** Las células sh- ϕ , sh-mTOR y sh-raptor fueron tratadas con PG u OBX (0- 4 μ M) durante 24 y 48 h. La viabilidad celular se determinó mediante ensayos MTT. El porcentaje de células viables fue obtenido del ratio entre los valores de A_{570} obtenidos de células tratadas respecto al control. Los valores se muestran como la media \pm S.D. de tres experimentos independientes realizados en triplicados. Los resultados más significativos se recogen en la gráfica **(E)**, dónde se representan los valores obtenidos de los ensayos de viabilidad usando PG u OBX a 4 μ M durante 48 h. La significancia estadística de los valores se muestra como *, $P < 0.01$.

2.5.- Caracterización de la unión de prodigininas al centro activo de mTOR.

2.5.1.- Cinética, afinidad y especificidad de la interacción.

Una vez demostrado el papel de PG y OBX como inhibidores de mTOR, nos propusimos caracterizar la unión de las PGs al centro catalítico de mTOR. Mediante ensayos SPR (*Surface Plasmon Resonance*) monitorizamos la interacción a tiempo real entre las PGs y la proteína recombinante mTOR (aa 1360-2549).

Los ensayos de *binding* fueron diseñados usando el sistema Biacore T-100, que permite la inmovilización de la proteína, en este caso mTOR, a la superficie del sensor. Sobre esta superficie se inyectaron los analitos (PG u OBX) diluidos en una solución de HBSN-Mg. Los cambios en la respuesta SPR fueron recogidos y analizados mediante las herramientas del software que incorpora el sistema (*Biacore T100 Evaluation Software*). Estos cambios, expresados en RU (unidades de resonancia), mostraron las curvas de asociación y disociación de las interacciones entre mTOR y PG (**figura R10A**) u OBX (**figura R10C**), permitiendo, a su vez, obtener las respectivas curvas de afinidad (**figura R10B y D**). Los parámetros de cinética y afinidad de ambas interacciones se recogen en la **figura R10E**. Los datos recogidos mostraron una constante de unión (K_D), resultante de la relación entre la constante de disociación (K_d) y asociación (K_a), del orden nanomolar. Estos valores reflejaron la elevada afinidad de los analitos al ligando. Tanto PG como OBX mostraron el mismo orden de magnitud en los valores de unión, así como bajos valores de disociación, sugiriendo que ambas moléculas forman complejos estables y específicos con mTOR.

Confirmamos que ambas PGs no sólo interaccionan con el centro activo de mTOR, sino que inhiben su actividad catalítica. Para ello, realizamos ensayos de actividad quinasa *in vitro* usando como catalizador de la reacción la misma proteína recombinante de mTOR usada en los ensayos de *binding*. En primer lugar, incubamos mTOR en presencia de su sustrato AKT, ATP-Mg²⁺ y concentraciones crecientes de PG (**figura R10F**) u OBX (**figura R10G**). Tras la detección de los niveles de fosforilación de AKT, se observó una disminución dosis-dependiente, observándose la inhibición de mTOR a concentraciones nanomolares.

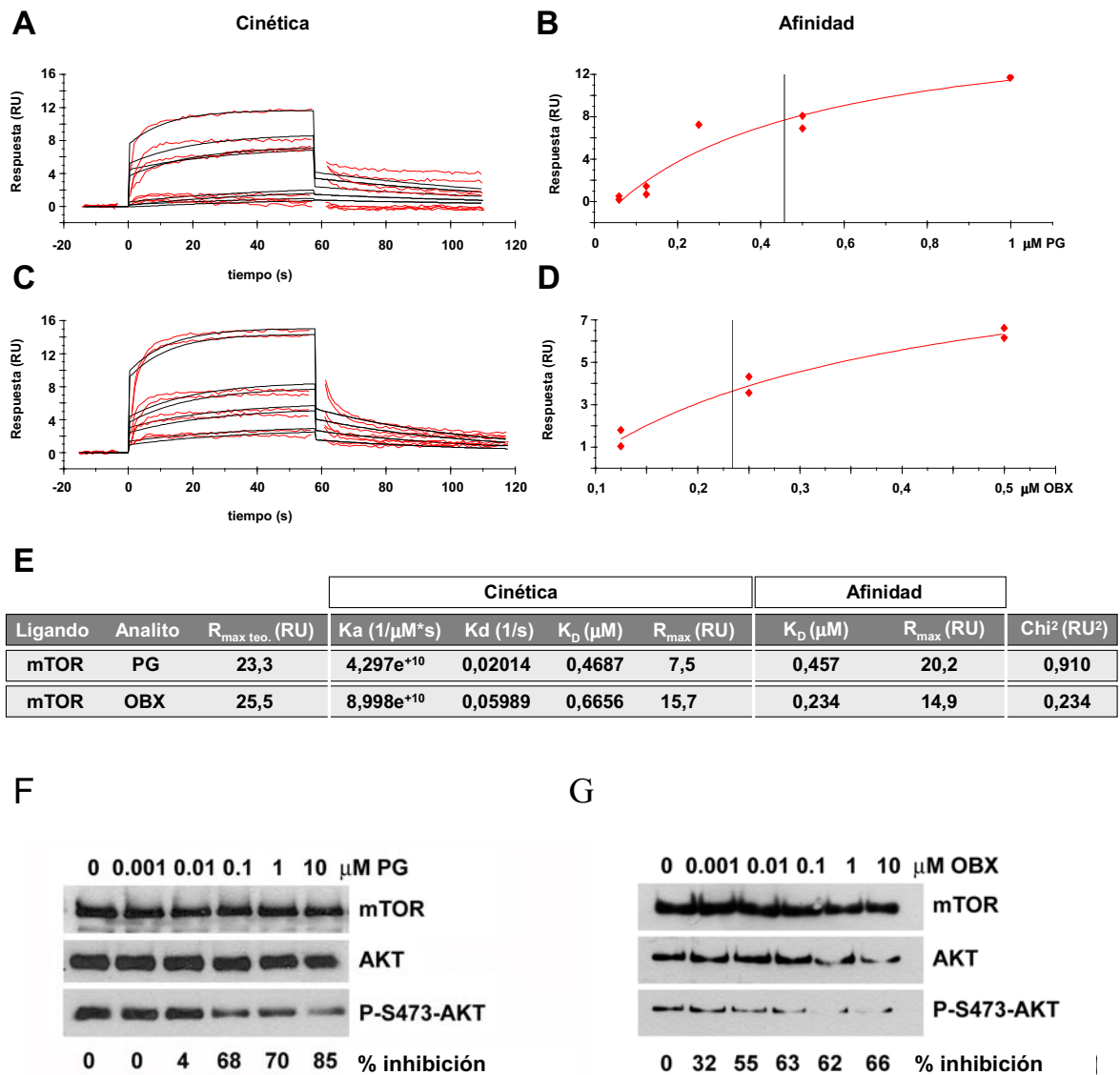


Figura R10.- Caracterización cinética de la unión de PG y OBX al centro activo de mTOR. La proteína recombinante mTOR (aa 1360-2549) se inmovilizó sobre la superficie del biosensor. Sobre esta superficie se inyectaron a diferentes concentraciones PG u OBX (0,06 - 1 μ M) en ciclos de 30 μ L/min durante 2 min cada uno. Después de cada ciclo se regeneró la superficie con una solución de NaOH (25 mM). Tanto la cinética (**A** y **C**) como la afinidad (**B** y **D**) de la interacción entre los diferentes analitos (PG u OBX) y el ligando mTOR se analizaron mediante *Biacore T100 Evaluation Software* (versión 1.1). RU, unidades de resonancia. (**E**) Parámetros de cinética y afinidad de dichas interacciones. **Inhibición de la actividad catalítica de mTOR mediada por PG y OBX.** Incubamos la proteína recombinante mTOR (aa 1360-2549) en presencia de AKT. La mezcla de reacción se incubó, o no, en presencia de PG (**F**) u OBX (**G**) en un rango de concentraciones de 0,001 a 10 μ M. Los niveles de fósforo incorporados a AKT se visualizaron mediante inmunoblot usando un anticuerpo P-S473-AKT. El porcentaje de inhibición de la actividad de mTOR se calculó a partir del ratio entre los niveles de P-AKT/AKT.

La especificidad de estas moléculas en la unión al centro activo de mTOR se analizó comparando los parámetros cinéticos obtenidos usando en los ensayos un ligando diferente, AKT. La falta de coincidencia entre los parámetros de cinética y afinidad son reflejo de la inespecificidad de las interacciones en este modelo. Por otra parte, la baja respuesta obtenida (< 5 RU) en comparación con la R_{\max} teórica (21 y 23,4 RU) confirmó una respuesta inespecífica en ambos casos (**figura R11**).

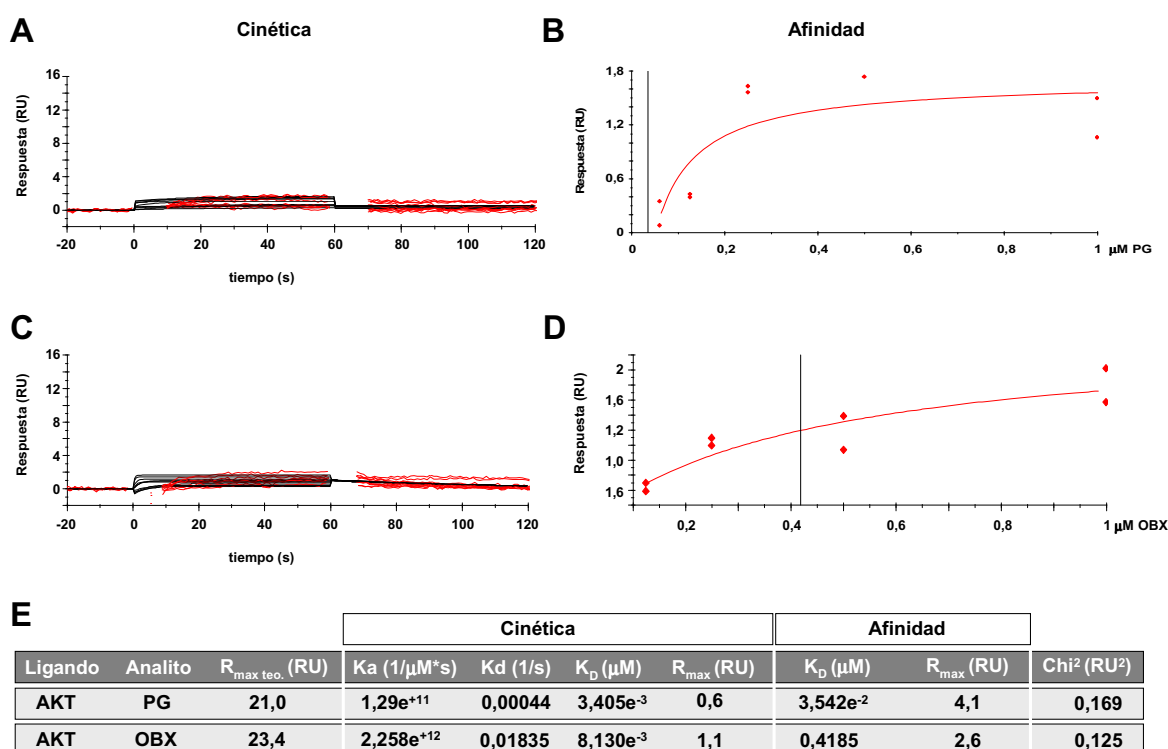


Figura R11.- Caracterización cinética de la unión de PG y OBX a AKT. La proteína recombinante AKT se inmovilizó sobre la superficie del biosensor. Sobre esta superficie se inyectaron diferentes concentraciones PG u OBX (0,06 - 1 μM) en ciclos de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 2 min cada uno. Después de cada ciclo se regeneró la superficie con una solución de NaOH (25 mM). Tanto la cinética (**A** y **C**) como la afinidad (**B** y **D**) de la interacción entre los diferentes analitos (PG u OBX) y el ligando AKT se analizaron mediante *Biacore T100 Evaluation Software* (versión 1.1). RU, unidades de resonancia. (**E**) Parámetros de cinética y afinidad de dichas interacciones.

2.5.2.- Prodigininas, inhibidores ATP no-miméticos.

Evaluamos la capacidad de las PGs de mimetizar el ATP dentro del centro activo de mTOR. Para ello, nos propusimos demostrar si dicha interacción era capaz de desplazar o competir con el ATP por su sitio de unión.

La conformación de los sensogramas es un reflejo del lugar de unión donde interaccionan los analitos. Así, dos analitos que compiten por el mismo lugar mostrarían sensogramas en los cuáles la respuesta iría disminuyendo a medida que un analito desplazara de la interacción al otro. Por el contrario, dos analitos que no compiten entre ellos, mostrarían sensogramas correspondientes a la suma de las interacciones [Nordin H et al., 2005].

Los ensayos de especificidad por el *ATP-binding site*, se llevaron a cabo inyectando, en primer lugar, una solución de HBSN-Mg a concentraciones crecientes de ATP a partir de la cuál se obtuvo la curva de afinidad del ATP al centro activo de mTOR (**figura R12A**). A continuación se inyectó una solución de HBSN-Mg a una concentración fija de ATP 10 μ M y una concentración variable de PG (**figura R12B-D**) o de OBX (**figura R12E-G**). En este caso, se utilizaron concentraciones saturantes de PGs (de 10 a 500 μ M). La primera observación es que, en presencia de ATP, los sensogramas de las PGs no se transforman siguiendo una cinética *ATP-like*, es decir, ambos sensogramas no se superponen, ni se observa una disminución en las colas de disociación tal y como se describe en el caso de inhibidores *ATP-like*. En los sensogramas obtenidos de la interacción de PGs a mTOR en presencia de ATP, en comparación con los obtenidos en su ausencia, se observa un aumento de los niveles de respuesta (RU) correspondiente a la suma de los sensogramas de PGs y ATP por sí solos. Éste aumento corresponde a la fracción de ATP unida a mTOR, indicando que el ATP no es desplazado ni por PG ni por OBX. Por tanto, ninguna de las PGs compiten con el ATP por un mismo lugar de unión.

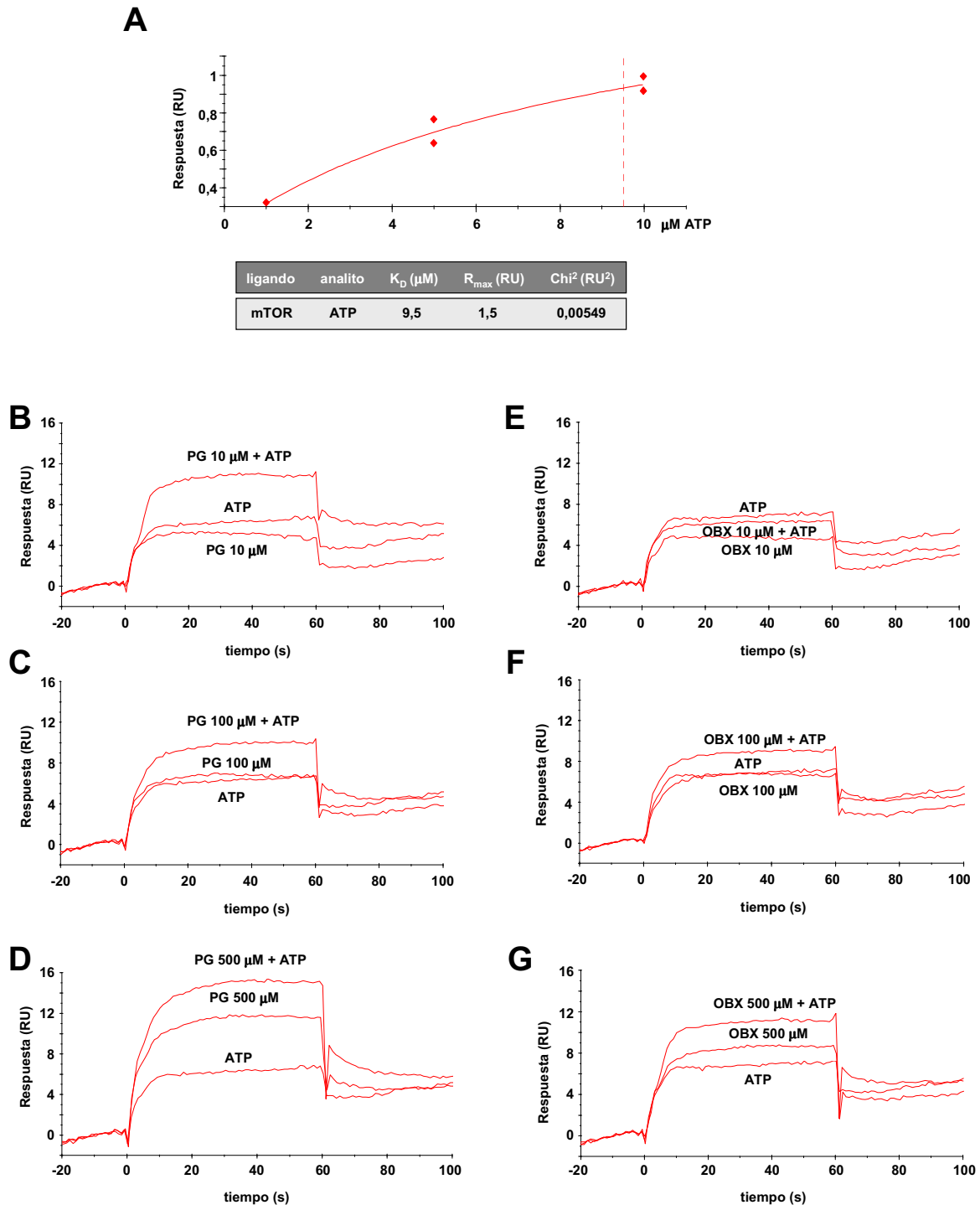
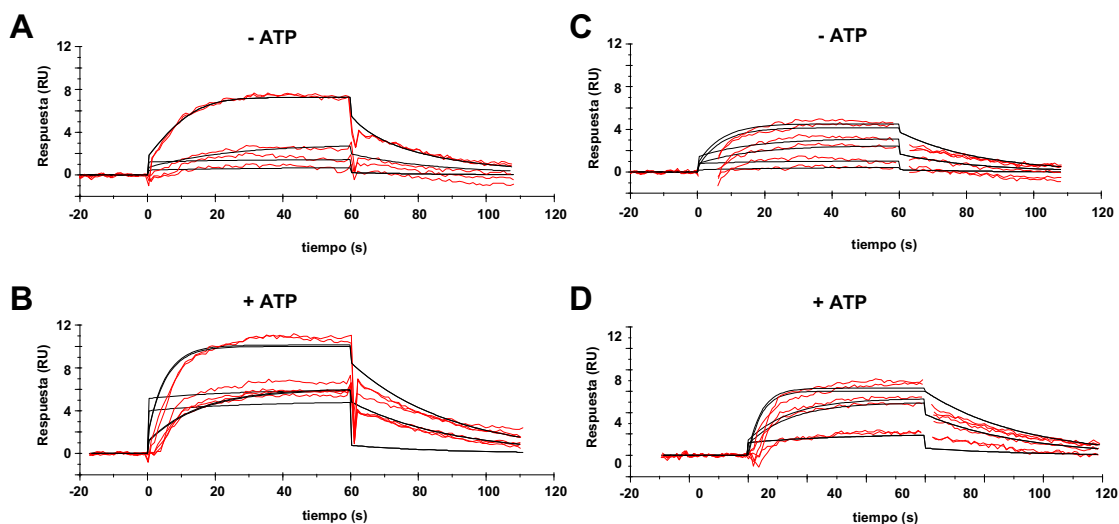


Figura R12.- Ensayos de competición entre PG u OBX y ATP por el centro activo de mTOR. (A) Curva de afinidad del ATP a mTOR. Sobre la superficie del biosensor se inyectó ATP a diferentes concentraciones (1, 5 y 10 μM). Su unión a mTOR (previamente inmovilizado sobre la superficie) se evaluó mediante el software que incorpora el sistema Biacore T-100 obteniéndose la constante de afinidad (K_D) de dicha interacción así como la respuesta máxima (R_{max}). **Curvas de asociación y disociación de las interacciones entre mTOR y PG (B-D) u OBX (E-G).** Los sensoogramas (no normalizados) muestran la monitorización a tiempo real de la asociación y disociación de PG u OBX (a concentraciones de 10, 100 y 500 μM) en presencia o no de ATP (10 μM) al centro activo de mTOR.

La evaluación cinética de estas interacciones reveló que la presencia de ATP en la solución de los analitos (PG u OBX), además de aumentar los niveles de respuesta (R_{max}), aumenta moderadamente las constantes de asociación a la vez que disminuye las de disociación, y en consecuencia, las constantes de afinidad (K_D) disminuyen, indicando un aumento de afinidad de las interacciones (**figura R13A-E**).



E

Ligando	Analito	$R_{max\ teo.}$ (RU)	K_a ($1/\mu M \cdot s$)	K_d (1/s)	K_D (μM)	R_{max} (RU)	χ^2 (RU ²)
mTOR	PG	23,3	$1,190e^{+11}$	0,04399	0,3698	8,6	0,495
mTOR	PG + ATP	24,8	$3,126e^{+11}$	0,03410	0,1091	10,4	1,71
mTOR	OBX	25,5	$2,0e^{+11}$	0,04134	0,2067	5,3	0,141
mTOR	OBX + ATP	27,0	$3,93e^{+11}$	0,03033	0,0771	6,9	0,264

F

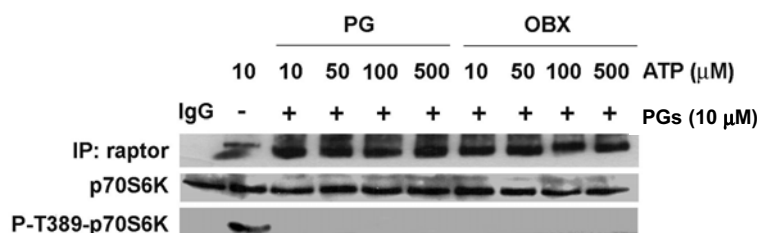


Figura R13.- Evaluación cinética de las interacciones entre PG u OBX y mTOR en presencia o no de ATP. Cinética de la interacción entre PG u OBX y mTOR en ausencia (A y C, respectivamente) o presencia (B y D, respectivamente) de ATP. Sobre la superficie del biosensor se inyectó una solución de PG u OBX a concentraciones crecientes (10, 100 y 500 µM) en presencia o no de ATP (10 µM). La cinética de las interacciones se evaluó mediante el software que incorpora el sistema Biacore T-100 obteniéndose los diferentes parámetros cinéticos. (E) Parámetros de cinética y afinidad de dichas interacciones. (F) **Inhibición de mTORC1 a concentraciones saturantes de ATP.** El complejo mTORC1 fue inmunoprecipitado usando un anticuerpo anti-raptor a partir de lisado obtenido de células SK-MEL-5. El inmunoprecipitado fue incubado en presencia de p70S6K, PGs (10 µM) y concentraciones de ATP crecientes (10-500 µM). Los niveles de fósforo incorporados a p70S6K se visualizaron mediante inmunoblot.

Confirmamos que las PGs no actúan como inhibidores ATP-miméticos mediante ensayos de actividad quinasa *in vitro* a concentraciones saturantes de ATP. Para ello, se inmunoprecipitó el complejo endógeno mTORC1 y se incubó con su sustrato p70S6K1 en presencia de ATP-Mg²⁺. La mezcla de reacción se incubó con una concentración fija de PG u OBX (10 μM) variando la concentración de ATP (en un rango de 10 a 500 μM) (**figura R13F**). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en ensayos SPR y demuestran que ambas PGs inhiben la actividad catalítica de mTOR sin competir con el ATP.

En su conjunto, estos resultados sugieren que las PGs no son ATP-miméticos, ya que no compiten con el ATP por su unión al centro activo de mTOR. Sin embargo, podrían estar interaccionando cerca del *ATP-binding site*. Estos resultados podrían explicarse por el pequeño tamaño de estas moléculas (siendo de 507 Da el ATP, de 323 Da PG y 354 Da OBX), de manera que podrían compartir el mismo *groove* sin desplazarse entre ellas.

2.5.3.- Modelo *in silico* de la interacción de prodigininas al centro activo de mTOR.

Estudios de *modelling*, llevados a cabo en colaboración con el Dr Víctor Guallar (*Supercomputing Center*, Barcelona), nos aportaron una primera aproximación *in silico* de los principales lugares de unión ocupados por las PGs. Los valores de afinidad obtenidos con el sistema Glide indicaron que las PGs se unen con gran afinidad al centro activo de mTOR (**figura R14A**). Este modelo sugiere que las PGs se unen cerca del *ATP-binding site* y que, por tanto, no compiten con el ATP por su lugar de unión. Por un lado, los residuos Ile 2500, Ile2559 y Val2504 serían claves en la unión de PG a través de su cadena pentil y, por otro, His2340 y S2342 a través de los nitrógenos contenidos en sus anillos pirrol (**figura R14B**). En la unión de OBX a este dominio hidrofóbico, la S2342 también jugaría un papel clave (**figura R14C**). La importancia de este residuo en la interacción se evaluó mediante mutaciones *in silico* cambiando esta serina por una glicina. Esta variación en los algoritmos redujo de manera significativa los valores de afinidad

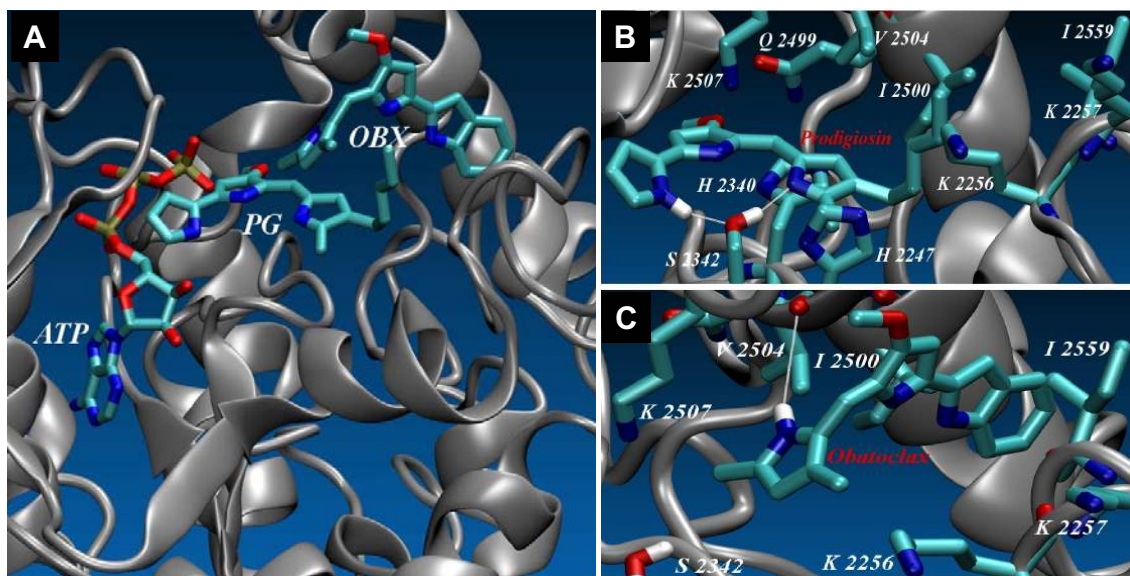


Figura R14.- Modelo *in silico* de las interacciones de PG y OBX al centro activo de mTOR.

Estos datos resultan interesantes de cara a ampliar la caracterización de la unión de las PGs a mTOR, y además nos aportaron nuevos datos para el estudio de la relación entre actividad y estructura de estas moléculas.

2.5.4.- Estudios SAR (*Structure-Activity Relationship*).

En colaboración con el Dr Roberto Quesada (Departamento de Química, Universidad de Burgos) se diseñaron nuevos derivados sintéticos de las PGs con modificaciones estructurales, con el objetivo de identificar los residuos o grupos funcionales que les confieren sus propiedades citotóxicas. Para ello, se modificó la posición y naturaleza de los sustituyentes de los anillos pirrólicos. Como resultado del bloqueo de los grupos amino mediante la adición de F₂B en la estructura de OBX (**figura R15A**) se obtuvo una molécula prácticamente inactiva [Diaz de Greñu B et al., 2011 (Anexo I)]. El modelo *in silico* obtenido muestra que OBX-F₂B, debido al impedimento estérico que le confiere el grupo aniónico F₂B, no sería capaz de alcanzar la misma región que OBX dentro del centro activo de mTOR (**figura R15B**). OBX-F₂B quedaría unido en una región más alejada, cerca de los márgenes del hueco que conforma el centro activo. Esta hipótesis explicaría la pérdida de actividad citotóxica de este derivado.

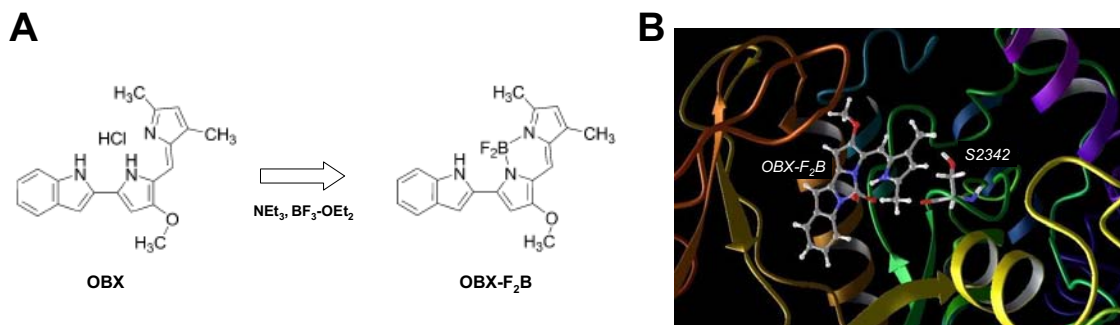


Figura R15.- (A) Síntesis química del derivado de obatoclax OBX-F₂B. Modelo *in silico* de la interacción de OBX-F₂B al centro activo de mTOR. La presencia del grupo aniónico F₂B, por su tamaño, altera la estructura lineal de OBX, dificultando la entrada de OBX-F₂B al centro activo de mTOR.

Con el objetivo de corroborar la inactividad de OBX-F₂B en nuestro modelo, por un lado, evaluamos la actividad citotóxica de este nuevo derivado sintético en células de melanoma SK-MEL-28 (**figura R16A**) y SK-MEL-5 (**figura R16B**). Las células se trataron con OBX-F₂B a 24 ó 48 h a concentraciones crecientes. Debido al pobre efecto citotóxico mediado por OBX-F₂B, resultó imposible calcular la IC₅₀ de esta molécula ya que la viabilidad celular no llegó a reducirse a la mitad ni tras 48 h de tratamiento a la dosis máxima utilizada (8 μM).

Por otro lado, mediante ensayos de actividad evaluamos si la presencia de este grupo F₂B revertía la capacidad de OBX de inhibir mTOR, lo que explicaría la pérdida de citotoxicidad. Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 2.5.2. La proteína recombinante mTOR (aa 1360-2549) se incubó en presencia de su sustrato AKT, ATP-Mg²⁺ y las diferentes PGs a una concentración de 10 μM (**figura R16C**). Los resultados confirmaron que OBX-F₂B no inhibe mTOR, resultado consistente con la inactividad de ésta molécula comparado con OBX.

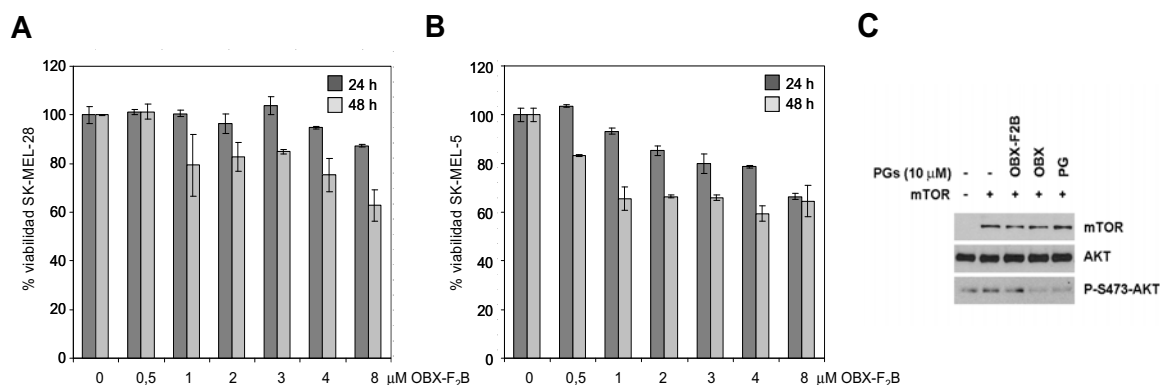


Figura R16.- Efecto citotóxico inducido por OBX-F₂B en células SK-MEL-28 y SK-MEL-5. Las células SK-MEL-28 (**A**) y SK-MEL-5 (**B**) fueron tratadas a 24 y 48 h con OBX-F₂B en un rango de concentraciones de 0 a 8 μM. La viabilidad celular fue determinada mediante ensayos MTT. El porcentaje de las células viables se calculó a partir del ratio de A₅₇₀ entre células tratadas y control (DMSO). Los valores se muestran como la media ± S.D. (desviación estándar) de tres experimentos independientes llevados a cabo en triplicados. (**C**) **Ensayo de actividad quinasa de mTOR en presencia de OBX-F₂B.** Incubamos la proteína recombinante mTOR (aa 1360-2549) en presencia de AKT. La mezcla de reacción se incubó en presencia de 10 μM de PG, OBX y OBX-F₂B. Los niveles de fosfo-AKT se analizaron mediante inmunoblot.

Por último, monitorizamos la interacción a tiempo real entre OBX-F₂B y mTOR mediante ensayos SPR. Los resultados indicaron que esta modificación en la estructura de OBX no interfiere en la formación de una unión estable con mTOR. Sin embargo, en comparación con la K_D obtenida para OBX (0,67 μM), la elevada K_D (2,4 μM) obtenida de las constantes de afinidad y cinética de la interacción entre OBX-F₂B y mTOR, reveló la baja afinidad de esta interacción (**figura R17A y B**). En este aspecto, el modelo *in silico* explicaría cómo es posible que OBX-F₂B, aún interaccionando con mTOR, no sea capaz de inhibir su actividad.

La especificidad de unión de OBX-F₂B al centro activo de mTOR se comparó frente a la posible unión de esta molécula a AKT. De nuevo, la falta de coincidencia entre los parámetros de cinética y afinidad y la baja respuesta obtenida (> 3 RU) son reflejo de la inespecificidad de la interacción entre OBX-F₂B y AKT.

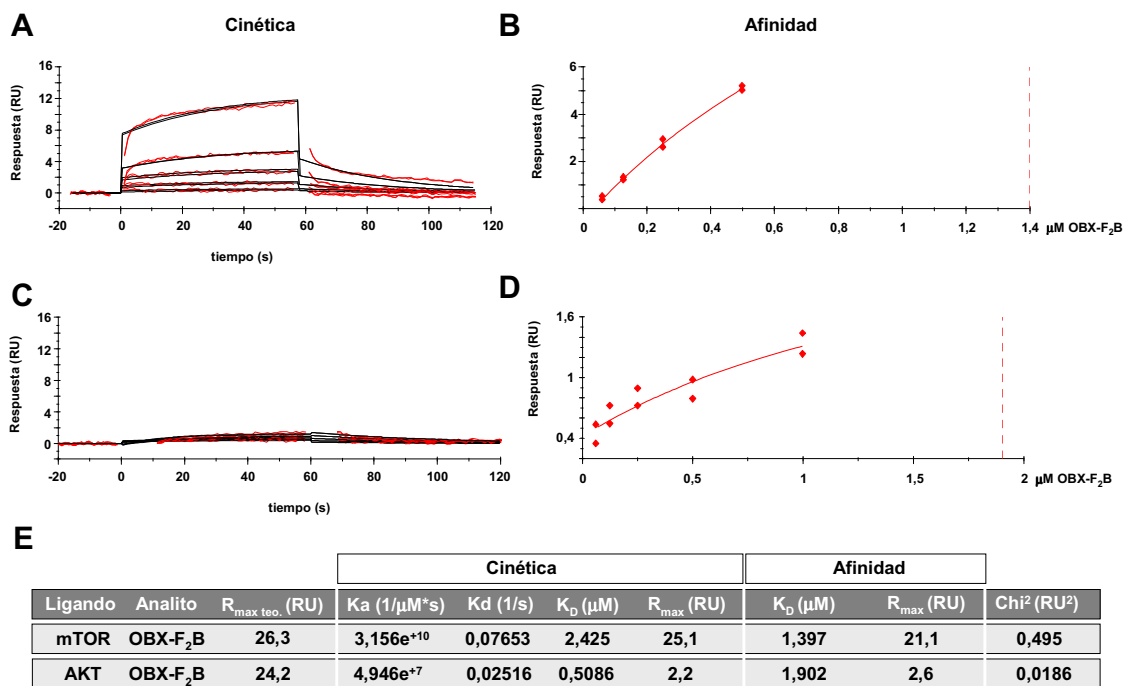


Figura R17.- Caracterización cinética de la unión de OBX-F₂B al centro activo de mTOR. Se inyectó el analito OBX-F₂B (en un rango de 0,06 - 1 μM) sobre la superficie del biosensor donde previamente se inmovilizó la proteína recombinante mTOR (aa 1360-2549). Después de cada ciclo (de 30 $\mu L/min$ durante 2 min cada uno) se regeneró la superficie con una solución de NaOH (25 mM). Tanto la cinética (**A**) como la afinidad (**B**) de la interacción entre OBX-F₂B y el ligando mTOR se analizaron mediante *Biacore T100 Evaluation Software* (versión 1.1). RU, unidades de resonancia. **Caracterización cinética de la unión de OBX-F₂B a AKT.** La proteína recombinante AKT se inmovilizó sobre la superficie del biosensor. Sobre esta superficie se inyectaron a diferentes concentraciones OBX-F₂B (0.06 - 1 μM) en ciclos de 30 $\mu L/min$ durante 2 min cada uno. Después de cada ciclo se regeneró la superficie con una solución de NaOH (25 mM). Tanto la cinética (**C**) como la afinidad (**D**) de la interacción se analizaron mediante *Biacore T100 Evaluation Software* (versión 1.1). RU, unidades de resonancia. (**E**) Parámetros de cinética y afinidad de ambas interacciones.

Los ensayos de especificidad de la unión de OBX-F₂B por el ATP-binding site se llevaron a cabo siguiendo el mismo procedimiento que el utilizado al usar PG u OBX como analitos (**figura R18**).

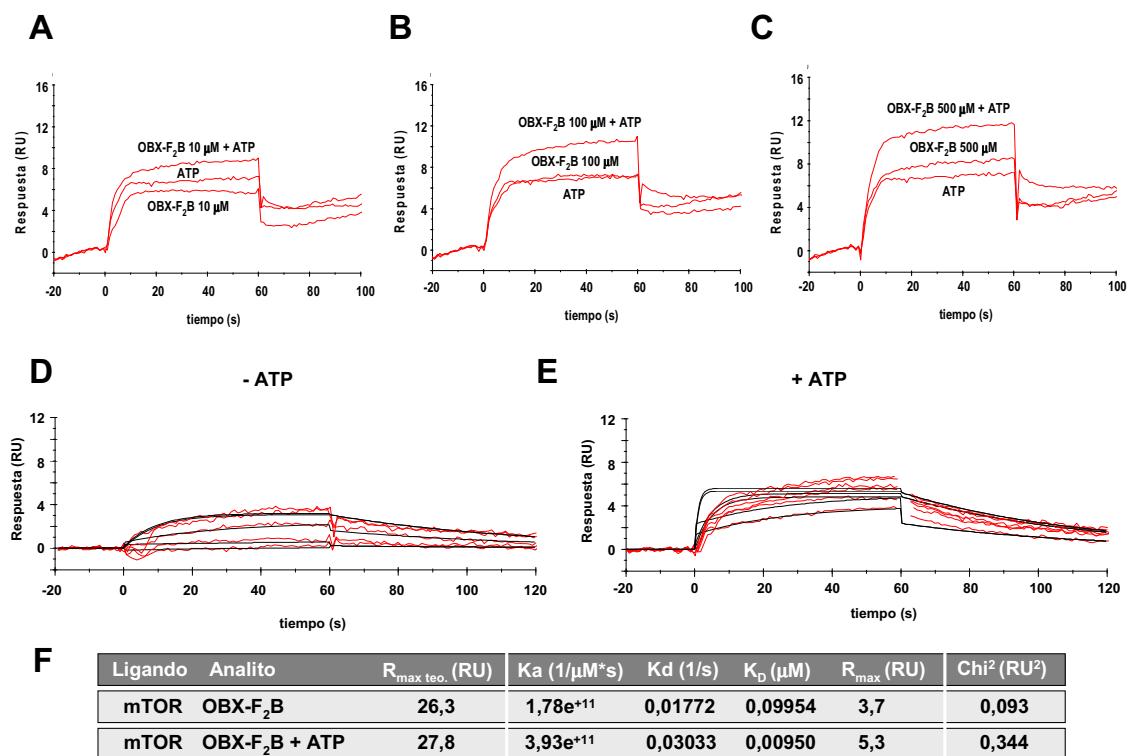


Figura R18.- Ensayos de competición entre OBX-F₂B y ATP por el centro activo de mTOR. (A-C) Curvas de asociación y disociación de las interacciones entre OBX-F₂B y mTOR. Los sensogramas (no normalizados) muestran la monitorización a tiempo real de la asociación y disociación de OBX-F₂B (a concentraciones de 10, 100 y 500 μM) en presencia o no de ATP (10 μM) al centro activo de mTOR. **Evaluación cinética de las interacciones entre OBX-F₂B y mTOR en presencia o no de ATP.** Cinética de la interacción entre OBX-F₂B y mTOR en ausencia (D) o presencia (E) de ATP. Sobre la superficie del biosensor se inyectó una solución de PG u OBX a concentraciones crecientes (10, 100 y 500 μM) en presencia o no de ATP (10 μM). (F) La cinética de las interacciones se evaluó mediante el software que incorpora el sistema Biacore T-100 obteniéndose los diferentes parámetros cinéticos.

Aunque en este caso la respuesta obtenida fue inferior a la esperada usando concentraciones saturantes de OBX-F₂B, la presencia de ATP, de nuevo, aumentó la respuesta en los sensogramas y disminuyó los valores de K_D, aumentando por tanto la afinidad de las interacciones.

En conclusión, al igual que OBX, su derivado sintético aún pudiendo unirse de manera estable en el centro activo de mTOR, no interaccionaría en el lugar de unión del ATP. Además, existen evidencias de que el grupo aniónico F₂B podría ser la causa de

impedimentos estéricos haciendo de la interacción entre OBX-F₂B y mTOR una unión de baja afinidad.

2.6.- Tratamientos combinados con inhibidores de MAPK y PI3K.

El efecto sinérgico que se obtiene combinando inhibidores de mTOR con otro tipo de inhibidores como de MAPK, PI3K o multi-quinasas en general, es tenido en cuenta en el diseño de nuevas estrategias más potentes que aumenten el efecto citotóxico de las terapias actuales contra el cáncer [Berrocal A et al., 2009].

Evaluamos el efecto citotóxico de PG en combinación con diversos inhibidores convencionales que tienen como diana las vías PI3K/mTOR y MAPK (**figura R19**). Las células de melanoma fueron co-tratadas con PG (IC₅₀), 100 nM de rapamicina (inhibidor de mTORC1), 10 µM de wortmanina (inhibidor de PI3K) o 100 nM U0126 (inhibidor de MAPK).

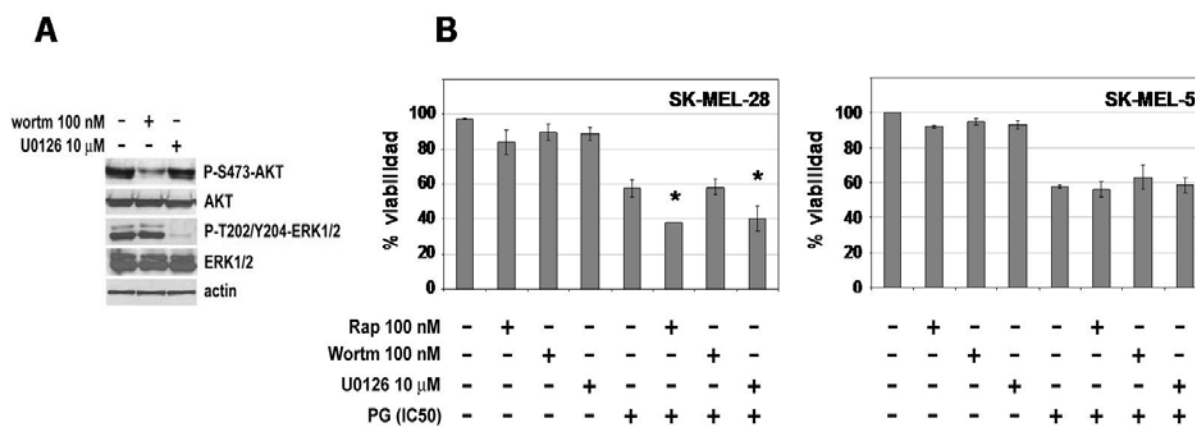


Figura R19.- Tratamientos con PG, en combinación con inhibidores convencionales de PI3K, MAPK o mTOR, no inducen marcados efectos sinérgicos. (A) Inhibición de las vías PI3K y MAPK mediada por Wortmanina y U0126 en células de melanoma. Células SK-MEL-28 fueron tratadas con wortmanina o U0126 durante 30 min a las concentraciones indicadas. Los extractos celulares fueron analizados mediante inmunoblot usando actina como control de carga. **(B) Efecto citotóxico inducido por los tratamientos combinados.** Células SK-MEL-28 y SK-MEL-5 (4×10^4) fueron pre-incubadas durante 30 min con rapamicina, wortmanina o U0126 antes de ser tratadas con PG a una concentración IC₅₀ a 24 h. La viabilidad celular fue determinada mediante ensayos MTT. El porcentaje de células viables fue obtenido del ratio entre los valores de A₅₇₀ obtenidos de células tratadas y control. Los valores se muestran como la media \pm S.D. de dos experimentos independientes realizados en triplicados. La significancia estadística de los valores, respecto el tratamiento con PG, se muestra como *, P<0.01.

Sólo en células SK-MEL-28, observamos un efecto citotóxico significativamente sinérgico mediante el tratamiento combinado de PG con rapamicina o con U0126. Sin

embargo, el potente efecto inhibitorio de PG sobre la vía PI3K/AKT explicaría la ausencia de un mayor efecto citotóxico en presencia de wortmanina.

2.7.- El papel de las fosfatasas PP1/PP2A en el efecto citotóxico de prodigininas.

Un mayor conocimiento sobre la función y regulación de las fosfatasas en cáncer, ha llevado a considerarlas nuevas y potenciales dianas terapéuticas. Las fosfatasas, juegan un papel importante en la regulación de las vías involucradas en la progresión del cáncer. La desregulación de PTEN, PHLPP, PP1 y PP2A se ha descrito en diferentes tipos tumorales [Carracedo A y Pandolfi PP, 2008]. Estas fosfatasas promueven la desfosforilación de las proteínas quinasas PI3K, AKT y ERK1/2, sin embargo, alteraciones en su actividad favorecen la sobre-activación de las vías PI3K y MAPK en cáncer. Por otro lado, la expresión de algunas de estas fosfatasas estaría regulada de una manera mTOR-dependiente. Recientemente, se describió que el silenciamiento de mTOR induce una disminución de la expresión de PHLPP en células SW-480, demostrando que la expresión de PHLPP es dependiente de la vía PI3K/mTOR [Liu J et al., 2011].

Con el objetivo de ampliar estos estudios y analizar de qué manera se ve afectada la expresión de serín/treonín fosfatasas tras la inhibición de PGs, visualizamos mediante inmunoblot los niveles de expresión de PP1 en células modificadas estables control, sh-mTOR o sh-raptor SW-480 (**figura R20A**). Los resultados mostraron una ligera disminución en los niveles de PP1 únicamente en células en las cuáles raptor se encuentra deplecionado. Tras el tratamiento con PGs a diferentes tiempos (1 y 6 h), no se observaron cambios en la expresión de PP1. Tampoco se observaron cambios significativos ni en la expresión, ni en la localización subcelular de PP1 en células de melanoma (**figura R20B y C**).

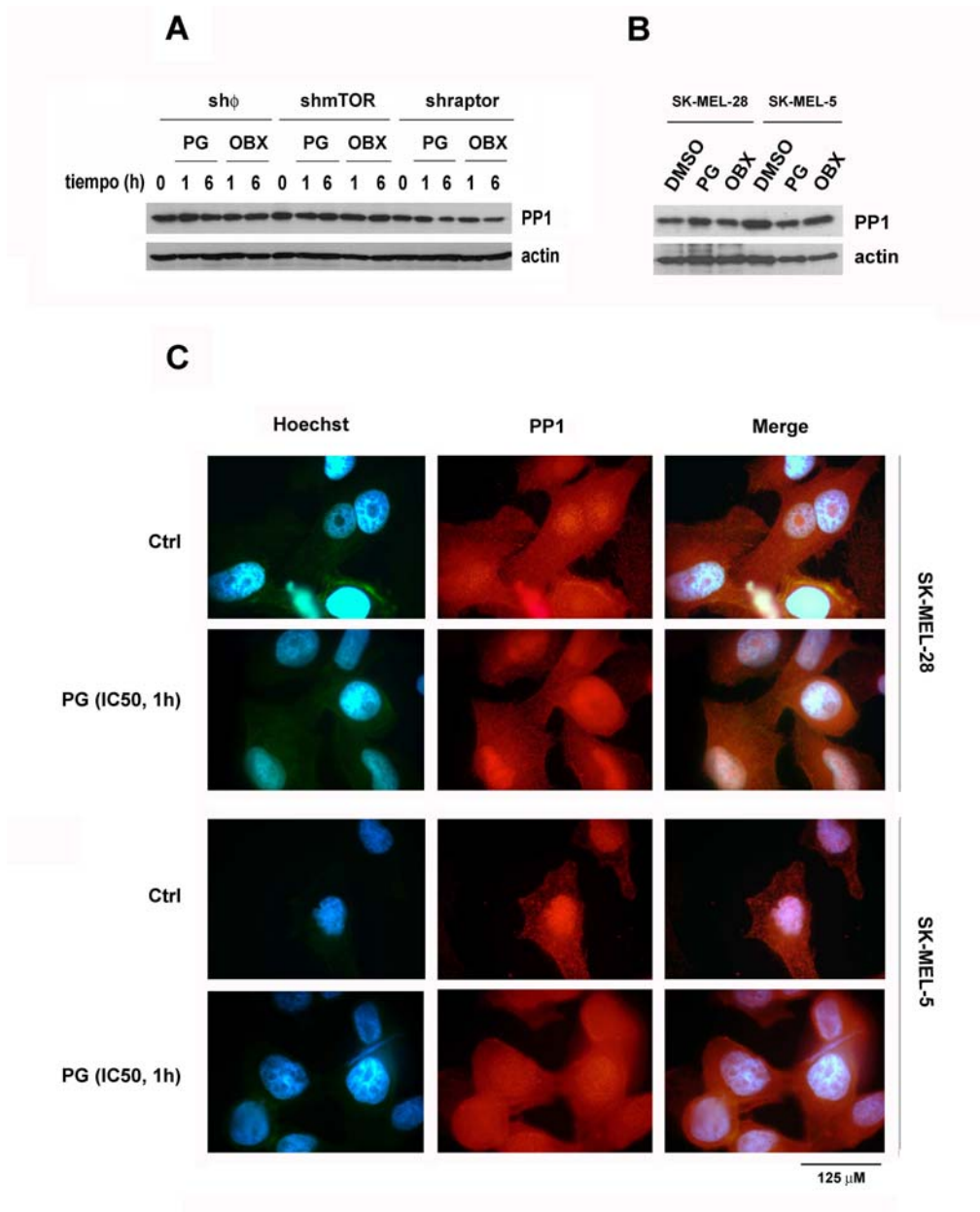


Figura R20.- Efectos en la expresión y localización subcelular de PP1 mediados por PGs. (A) Expresión de PP1 en células modificadas estables sh- ϕ , sh-mTOR y sh-raptor. Las células fueron tratadas con PG u OBX a una concentración de 4 μ M a 1 y 6 h. Los niveles de expresión de PP1 fueron analizados mediante inmunoblot. **(B y C) Expresión y localización subcelular de PP1 en células de melanoma.** Las células SK-MEL-28 y SK-MEL-5 se trataron con DMSO (control), PG (IC₅₀) u OBX (10 μ M) durante 1 h. La expresión y localización de PP1 se detectó mediante técnicas de inmunodetección utilizando un anticuerpo anti-PP1.

Con el fin de descartar PP1 como diana molecular de PGs, analizamos mediante ensayos de *binding*, la capacidad de unión de las PGs a PP1. Siguiendo el mismo procedimiento Biacore T-100, inmovilizamos PP1 α sobre la superficie del sensor a través de uniones amina. El ajuste (*fitting*) de los parámetros de cinética y afinidad sólo fue posible en la evaluación de la unión de OBX y OBX-F₂B a PP1, pero no de PG (**figura 21**). Por tanto, descartamos una posible interacción de PG a PP1. Por otro lado,

la baja respuesta obtenida con OBX (3 RU) sugiere una interacción poco específica. Sorprendentemente, los valores de la constante de unión de OBX-F₂B a PP1 reflejan elevada afinidad y estabilidad en la unión.

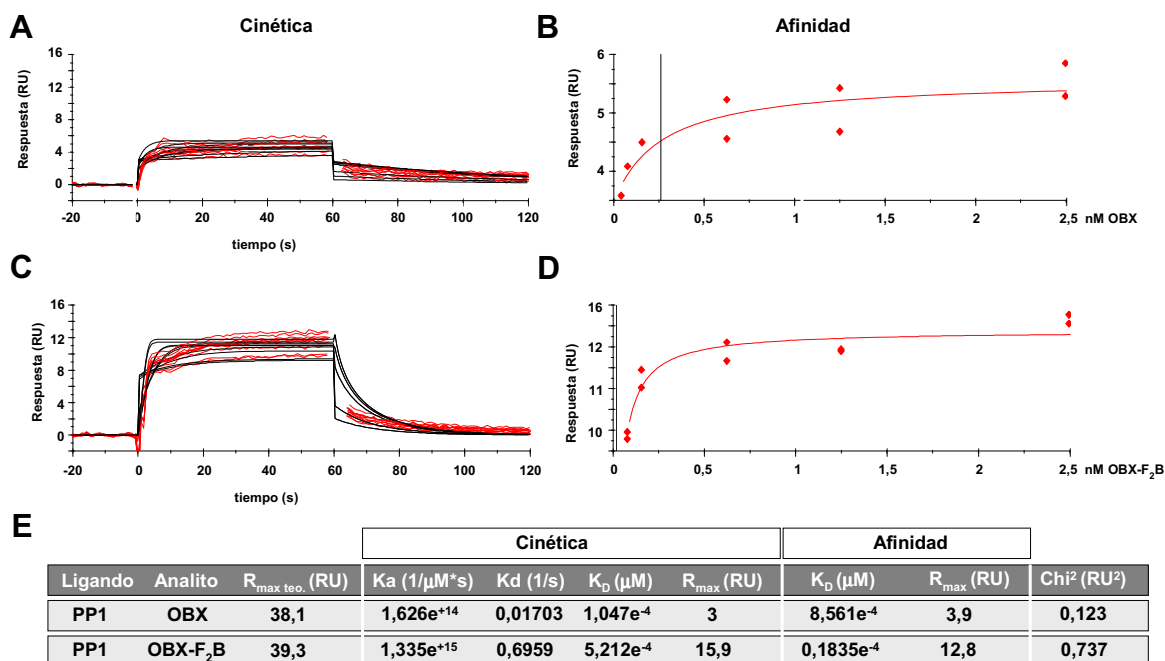
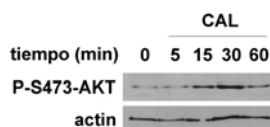


Figura R21.-Caracterización cinética de la unión de OBX y su derivado OBX-F₂B a PP1α. Se inyectaron los analitos en un rango de 0,07 a 2,5 nM sobre la superficie del biosensor donde previamente se inmobilizó la proteína recombinante PP1α. Después de cada ciclo (de 30 μL/min durante 2 min cada uno) se regeneró la superficie con una solución de NaOH (25 mM). Tanto la cinética (**A** y **C**) como la afinidad (**B** y **D**) de la interacción entre OBX ó OBX-F₂B a PP1 se analizaron mediante *Biacore T100 Evaluation Software* (versión 1.1). RU, unidades de resonancia. (**E**) Paámetros de cinética y afinidad de ambas interacciones.

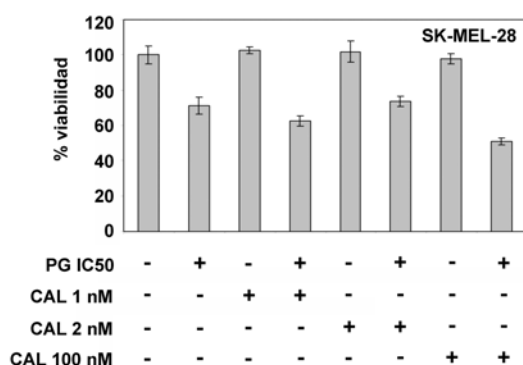
Por último, ampliamos el estudio mediante la utilización de un inhibidor específico de serin/treonin fosfatasas en células de melanoma. La caliculina inhibe fosfatasas de manera selectiva en función de la concentración utilizada. Inhibe PP1 a 1 nM, inhibe de manera dual PP1/PP2A a 2-10 nM o bien inhibe de manera inespecífica otras fosfatasas de la misma familia a una concentración igual o superior a 100 nM [Ishihara H et al., 1989]. Visualizamos el efecto inhibitor de caliculina sobre los niveles de fosforilación de AKT, la cuál es sustrato directo de PP1. Para ello, las células de melanoma fueron tratadas hasta 1 h con 2 nM de caliculina (**figura R22A**). La inhibición de fosfatasas inducida por caliculina promueve un rápido aumento en los niveles de fosforilación de AKT. Con el fin de evaluar si la inhibición de serin/treonin fosfatasas revierte el efecto citotóxico de PG en células de melanoma, co-tratamos durante 24 h las

células con PG (IC_{50}) en presencia de caliculina (a 1, 2 y 100 nM) (**figura R22B y C**). Los resultados en la viabilidad celular mostraron que bajo ninguna de las condiciones de tratamiento se revierte el efecto citotóxico de PG, y por tanto, sugieren que, en general, las serin/treonin fosfatasa no son críticas en la mediación del efecto citotóxico de PG.

A



B



C

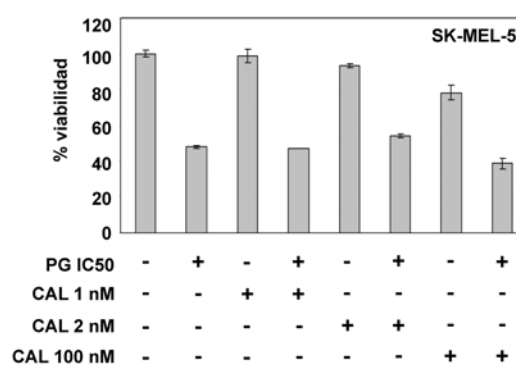


Figura R22.- La inhibición de Ser/Thr fosfatasa no revierte los efectos citotóxicos de PG. (A) Time course a una concentración 2 nM de caliculina en células SK-MEL-5. **Efecto citotóxico inducido por los tratamientos combinados.** Células SK-MEL-28 (**B**) y SK-MEL-5 (**C**) (4×10^4) fueron pre-incubadas durante 30 min con caliculina a las dosis indicadas previamente a la adición de PG. Las células se co-trataron durante 24 h. La viabilidad celular fue determinada mediante ensayos MTT. El porcentaje de células viables fue obtenido del ratio entre los valores de A_{570} obtenidos de células tratadas y control. Los valores se muestran como la media \pm S.D. de tres experimentos independientes realizados en triplicados. El análisis estadístico de los valores se realizó respecto el tratamiento con PG. La significancia estadística se muestra como *, $P < 0.01$.

3.- Caracterización de las propiedades antimetastásicas de prodigininas.

Estudios previos con PG demostraron el potencial antimetastásico de esta molécula al verse inhibida la migración e invasividad de células de carcinoma pulmonar metastático 95-D. Ensayos *in vivo* corroboraron que PG impide la metástasis de melanoma a pulmón [Zhang J et al., 2005]. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en este proceso todavía no han sido estudiados en profundidad.

3.1.- Estudio de los mecanismos moleculares involucrados en los efectos antimetastásicos.

En el proceso de migración, la vía de mTOR juega un papel crítico. A través del complejo ILK/riCTOR, el complejo mTORC2 regula la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de contactos focales imprescindibles para la adhesión y desadhesión que se dan durante el movimiento celular [McDonald PC et al., 2008]. Este proceso es regulado a través de la vía de las integrinas, en la cuál convergen las vías de supervivencia MAPK y PI3K/mTOR. Dentro de esta vía, la familia de las PAKs, sustratos *downstream* de ILK y FAK, y efectores de las GTPasas cdc42 y rac1, regulan la movilidad y la supervivencia celular [Bokoch GM et al., 2003]. Durante el movimiento celular, los diferentes miembros de la familia PAK, una vez activados, se localizan en el frente de avance de las células, es decir en los lamilopodios, regulando la dinámica del citoesqueleto [Dan C et al., 2001].

Una vez demostrado que mTOR es diana molecular de PGs, estudiamos los efectos de estas moléculas sobre la adhesión y migración celular. Mediante ensayos de inmunofluorescencia comprobamos que el tratamiento de PG (IC₅₀) a 3 h induce la desorganización del citoesqueleto en células de melanoma (**figura R23A**). Con el fin de determinar si estos efectos eran mediados a través del complejo ILK/riCTOR, en primer lugar analizamos los niveles de fosforilación de rictor tras el tratamiento con PG a 1 y 3 h. Los resultados muestran una marcada desfosforilación de rictor (**figura R23B**), acompañada de la desfosforilación de PAK6 a partir de las 3 h de tratamiento (**figura R23C**). Con el fin de analizar el efecto de PGs sobre la estabilidad del complejo ILK/riCTOR, realizamos ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos celulares

previamente tratados con las diferentes PGs. En comparación con el control (DMSO), los tres tratamientos, disminuyen los niveles de rictor co-inmunoprecipitado junto con ILK (**figura R23D**). Aunque estos resultados no son concluyentes, sugieren que PGs podrían desestabilizar el complejo ILK/rictor. En cualquier caso, debido a la desfosforilación de rictor, la señalización mediada por mTORC2 a través de este complejo quedaría bloqueada. Prueba de ello es la inhibición de la vía que reflejan los niveles de desfosforilación de PAK6 en presencia de PG.

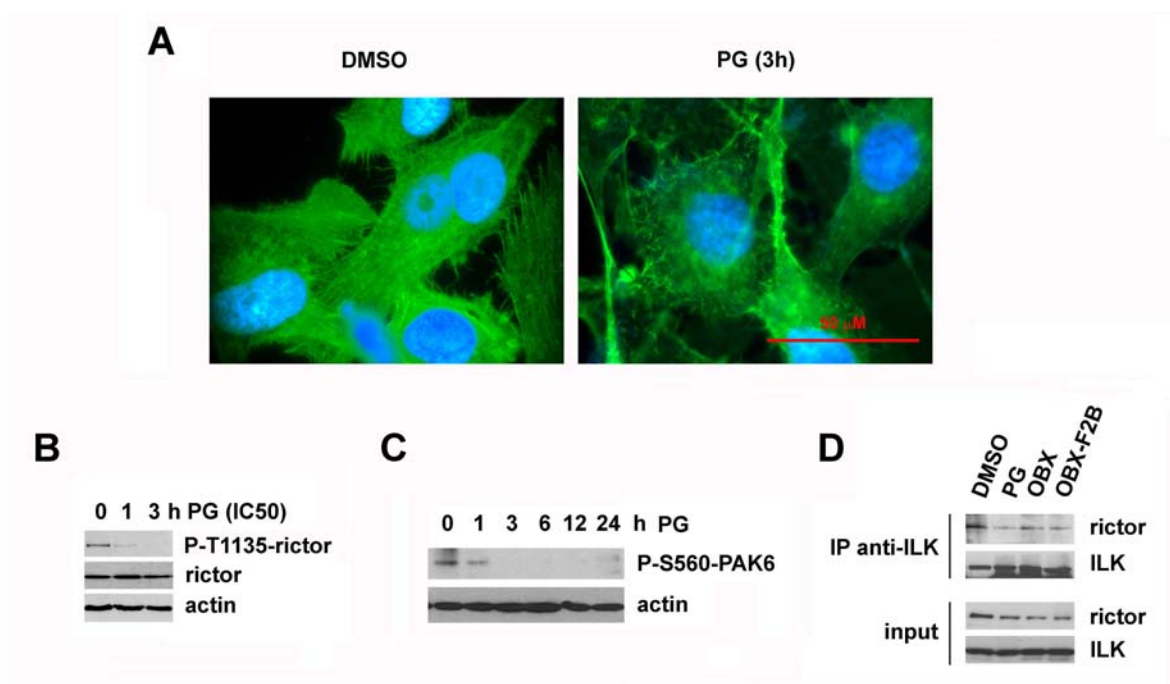
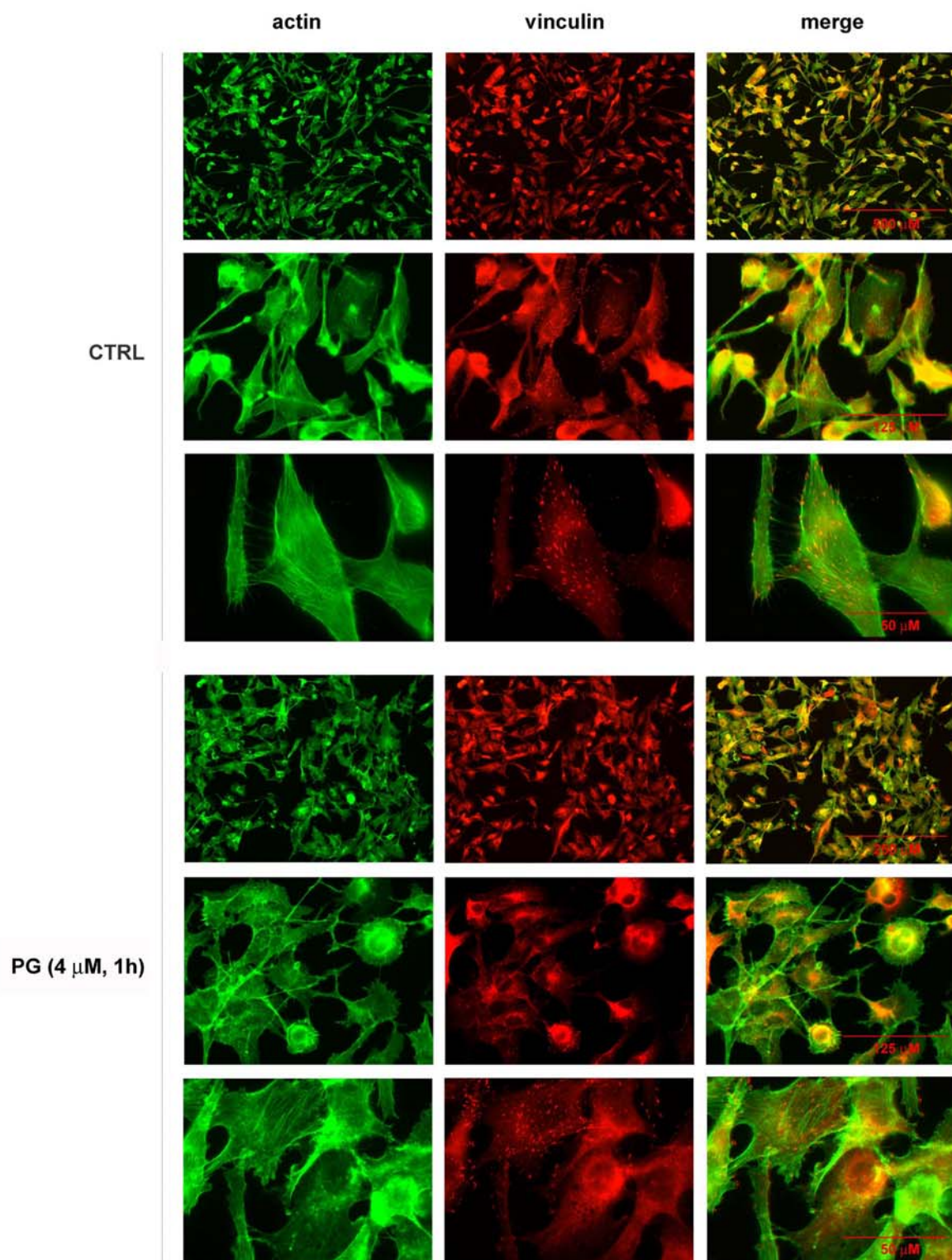


Figura R23.- Efecto de PGs sobre los principales efectores y sustratos de la vía de las integrinas. (A) PG promueve la desorganización del citoesqueleto de actina. Las células SK-MEL-5 fueron tratadas con PG a una concentración de 1 μ M (IC₅₀) durante 3h. Tras el tratamiento, las células control (DMSO) y tratadas fueron sometidas a una doble tinción usando como tinción nuclear Hoechst 33342 y como tinción de los filamentos de actina Phalloidin. **(B) PG induce la desfosforilación de rictor.** Los niveles de expresión y fosforilación de rictor en células SK-MEL-5 fueron analizados mediante inmunoblot. Como control de carga se utilizó actina. **(C) PG induce la inhibición de la vía de las integrinas.** Las células SK-MEL-5 fueron tratadas a una concentración IC₅₀ a los tiempos indicados. Los niveles de fosforilación de PAK4/PAK5/PAK6 fueron analizados mediante inmunoblot, visualizándose únicamente los niveles de P-PAK6. **(D) Efecto de PGs sobre la estabilidad del complejo ILK/rictor.** A partir de extractos celulares previamente tratados con DMSO (control), PG (1 μ M), OBX (10 μ M) u OBX-F₂B (10 μ M) durante 3 h, se co-inmunoprecipitó el complejo ILK/rictor utilizando anticuerpo anti-ILK. Los niveles de rictor unido a ILK se analizaron mediante inmunoblot. Los niveles totales de ILK y rictor presentes en el extracto celular se muestran en el input.

Las células se adhieren al sustrato a través de los contactos focales que establecen con éste. Mediante ensayos de inmunofluorescencia, usando la vinculina como marcador de contactos focales, analizamos la capacidad de PGs de inducir la pérdida de estos contactos y, con ello, la desadhesión celular. Para ello, tratamos las células SK-MEL-28 con PG (1 μ M) durante 1 y 3 h (**figura R24A y B**). Los resultados muestran una disminución drástica de los contactos focales a las 3 h de tratamiento. Resultado que coincide con la inhibición de PAK6. Efectos similares, se obtuvieron con OBX a una concentración 10 μ M, mientras que, con OBX-F₂B la disminución de contactos focales no resultó tan marcado (**figura R24B**). Como cabía esperar, el número de contactos focales en células SK-MEL-5 también se vio reducida de manera significativa tras el tratamiento con PG u OBX (**figura R24C**). Acorde con la disminución en el número de contactos focales, el número de células adheridas también se vio reducido (**figura R24D y E**).

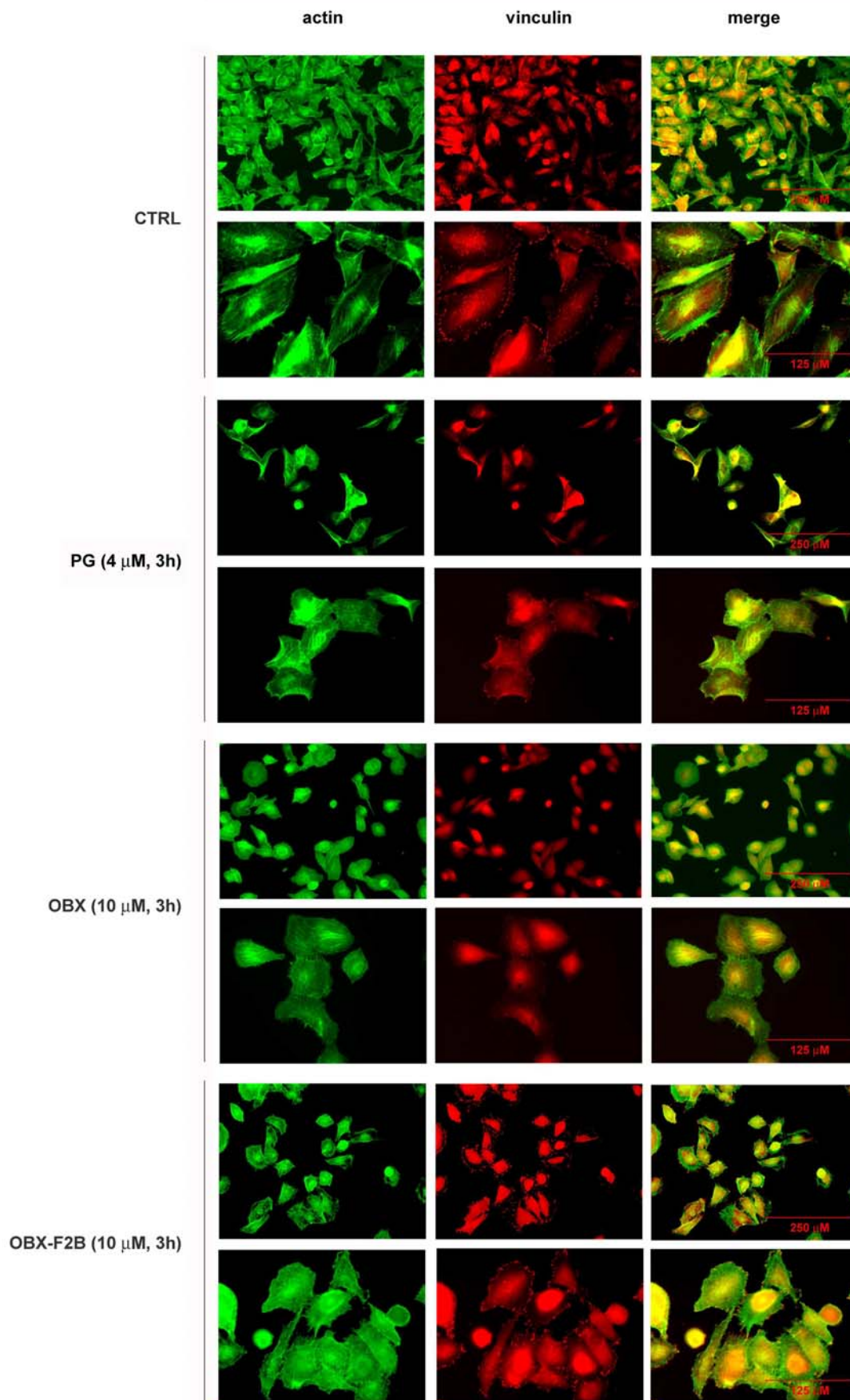
A

SK-MEL-28



B

SK-MEL-28



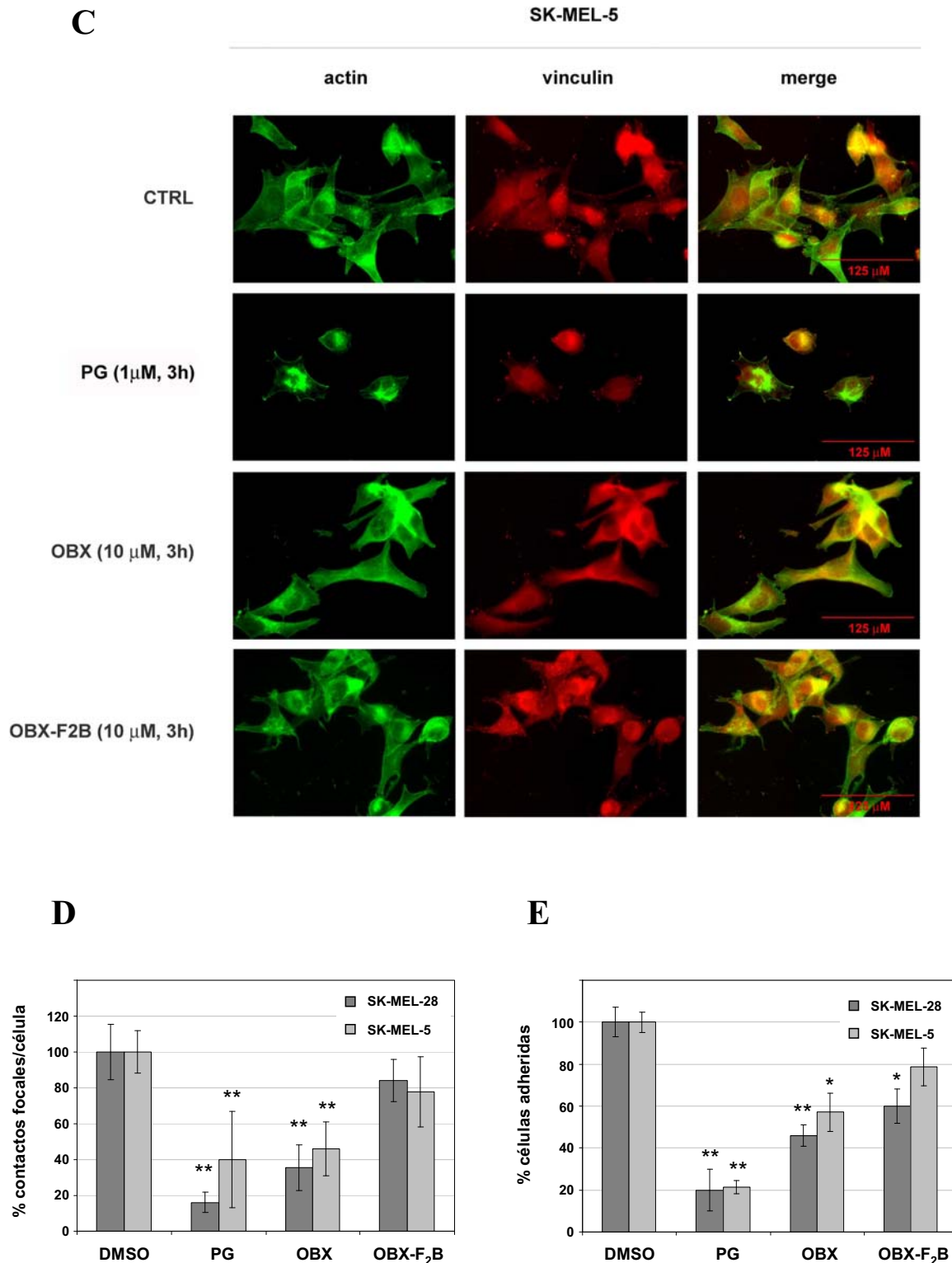


Figura R24.- Desaparición de los contactos focales inducido por PGs. Las células SK-MEL-28 (A y B) y SK-MEL-5 (C) fueron tratadas con PG (IC_{50}), OBX (10 μ M) u OBX-F2B (10 μ M) a diferentes tiempos. Los contactos focales y filamentos de actina fueron detectados mediante inmunofluorescencia usando anticuerpo anti-vinculina, o bien, mediante tinción Phalloidin, respectivamente. Las imágenes se tomaron mediante un microscopio de epifluorescencia Nikon E800. Los valores muestran el porcentaje de contactos focales/célula (D) y porcentaje de células adheridas (E) tras cada tratamiento a 3h. La significancia estadística de los valores se muestra como *, $P < 0.05$ y **, $P < 0.01$.

3.2.- Inhibición de la migración y adhesión celular mediados por prodigininas.

El movimiento celular se da gracias a la formación de lamelipodios (proyecciones laminares) que permiten la polarización y avance celular. También se caracteriza por la formación de prolongaciones mucho más finas y largas, llamadas filopodios, que les permiten “tantear el terreno”. Monitorizamos el efecto de DMSO (**figura R25A**) o PG (**figura R25B**) a 90 min de tratamiento en células de melanoma, donde a baja confluencia, estas estructuras son claramente visibles. Observamos una rápida retracción de los filopodios en presencia de PG. A los 10 minutos de tratamiento el 50 % de filopodios se habían retraído, mientras que a los 70 minutos la desaparición es completa. A los 90 minutos el 51 % de células habían perdido su morfología y capacidad de adhesión. Este efecto tan acusado no se observó tras el tratamiento con OBX ni su derivado, donde aproximadamente el 80 % de células mantienen su morfología polarizada (**figura R25C**).

Con el fin de evaluar el efecto de estos tratamientos sobre la migración celular a 24 h, redujimos las concentraciones a 100 nM (no citotóxicas) en un modelo celular que crece formando monocapa, las células de carcinoma escamoso de piso de cavidad bucal HN4. El ensayo de herida (*wound healing*) se realizó bajo tres condiciones diferentes: con suero (**figura R26A**), privando de suero (**figura R26B**), y añadiendo mitomicina c (inhibidor de proliferación) a células previamente privadas (**figura R26C**). Estas tres condiciones nos permitieron verificar el efecto anti-migratorio de PGs, descartando que el cierre de la herida en las condiciones control fuera debido a la proliferación celular. Los resultados mostraron una inhibición de la migración celular del 90 % tras el tratamiento con PG y del 64 % con OBX, dejando patente el potencial antimetastásico tanto de PG como de OBX. Mientras que el derivado OBX-F₂B mostró una actividad anti-migratoria nula (**figura R26D**).

En su conjunto, estos resultados nos permiten establecer una relación directa entre la capacidad de estas moléculas de inhibir la vía mTOR y la capacidad de inhibir la migración celular.

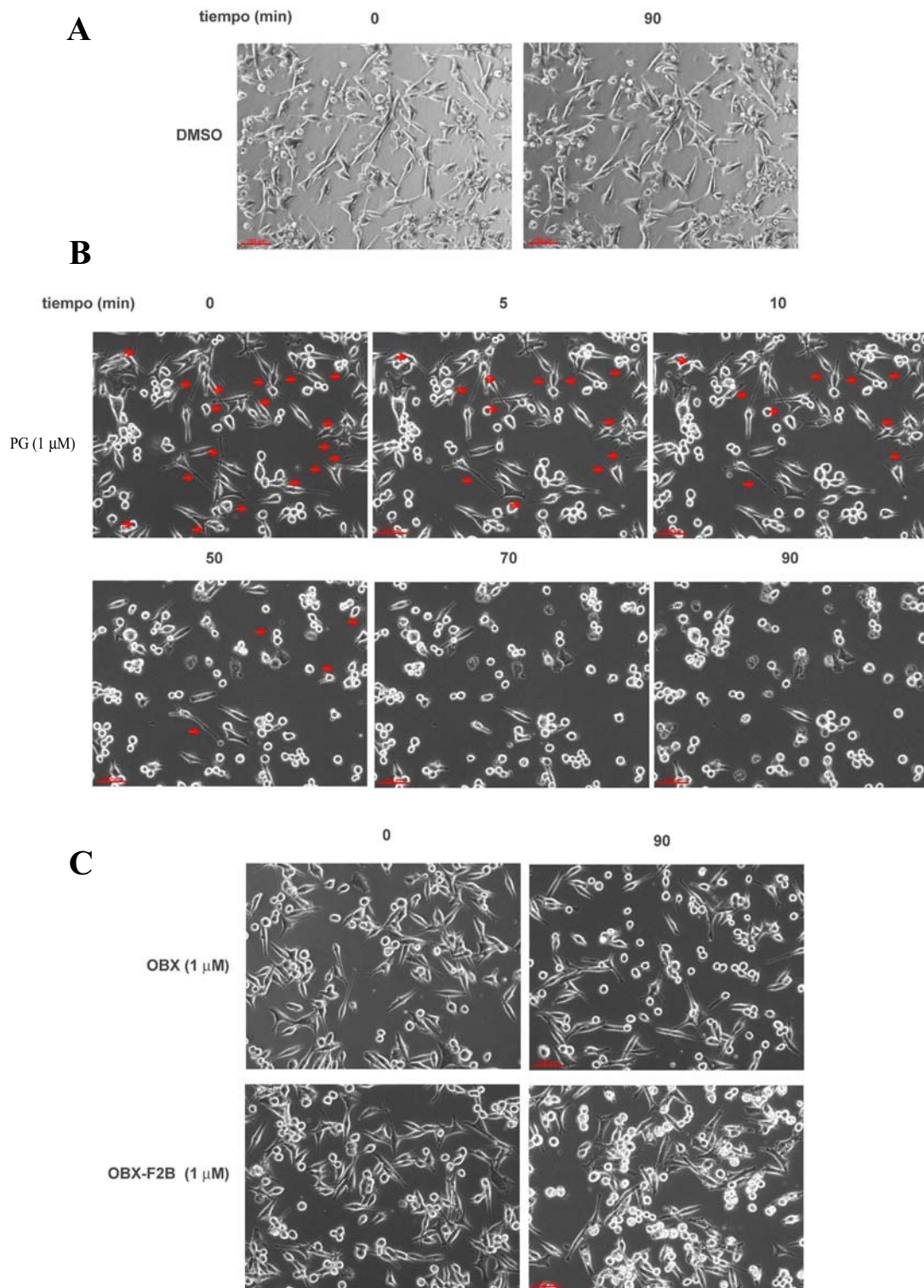


Figura R25.- Monitorización de los cambios morfológicos inducidos por PGs en células de melanoma. Las células SK-MEL-5 fueron tratadas con DMSO (A), PG (B), OBX u OBX-F₂B (C) a 1 μ M hasta 90 min de tratamiento. La monitorización se realizó mediante el microscopio invertido ZEISS AXIO-Observer con control de temperatura y CO₂.

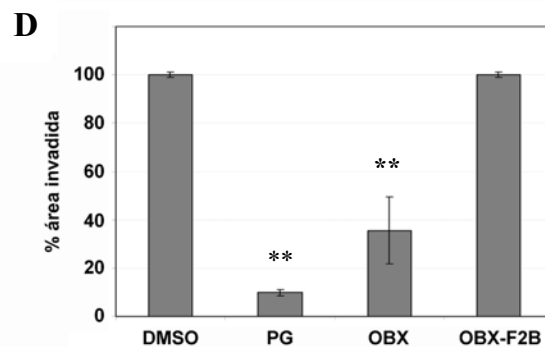
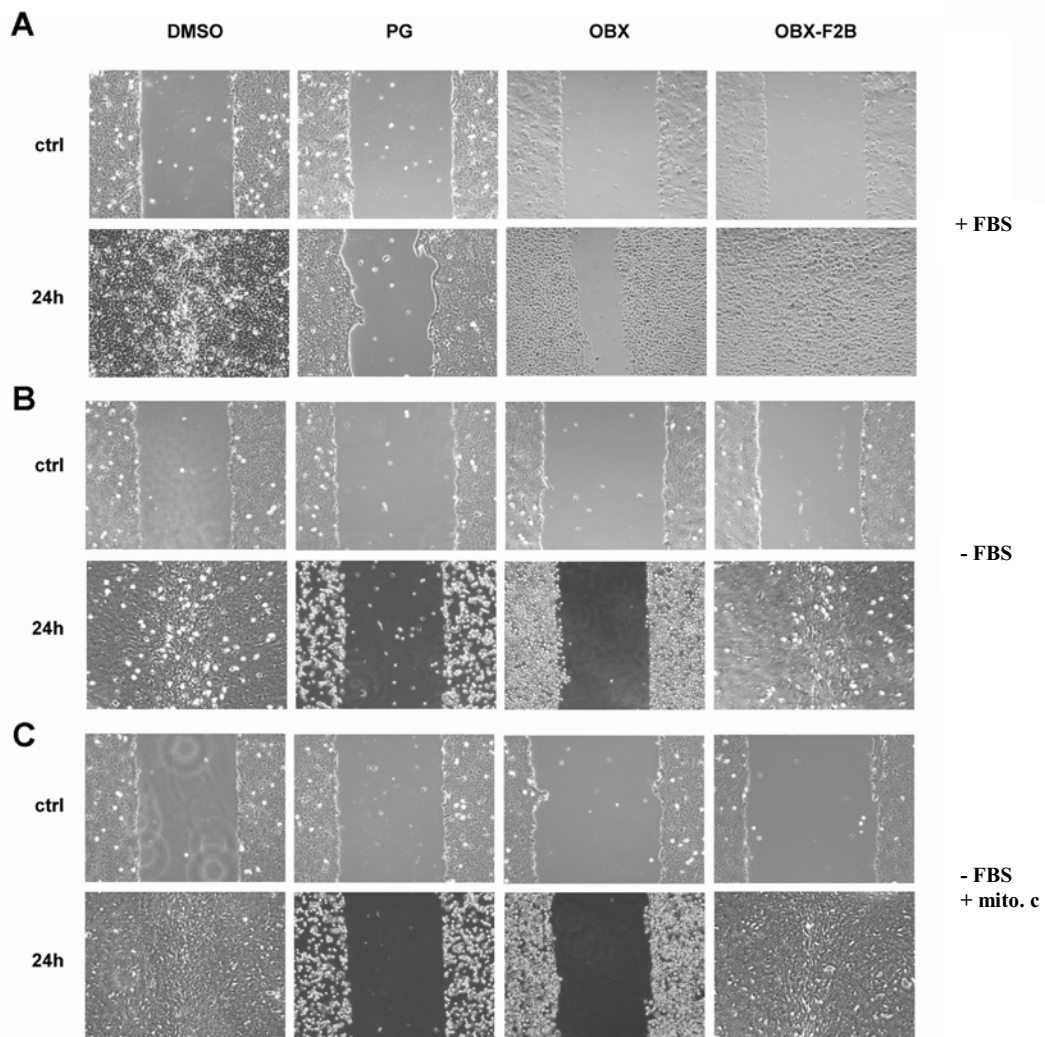


Figura R26.- Inhibición de la migración celular inducida por PGs. (A) Las células HN4 fueron tratadas con PG, OBX u OBX-F₂B a 100 nM durante 24 h tras realizar la herida sobre la monocapa de células. (B) Un experimento análogo se realizó previa deprivación de suero durante 16 h y (C) adición de 2 μg/ml de mitomicina c (C). Las imágenes se tomaron mediante un microscopio invertido Leica DM IRB con una cámara acoplada Olympus DP70. (D) Los valores muestran el porcentaje del área de la herida invadida obtenida de dos experimentos independientes en presencia de suero. La significancia estadística de los valores se muestra como *, P<0.01.

Discusión

1.- Potencial quimioterapéutico de las prodigininas.

El melanoma es un modelo de cáncer que presenta gran resistencia a tratamientos quimioterapéuticos. La pobre pronóstico de los pacientes de melanoma avanzado y la falta de tratamientos efectivos contra este tipo de cáncer hace necesario, por una parte, un mayor conocimiento sobre los mecanismos que bloquean la efectividad de la quimioterapia, y por otra, el desarrollo de nuevos y más eficientes agentes quimioterapéuticos capaces de evitar la progresión e invasividad del melanoma [Berrocal A et al., 2009].

La vía PI3K/mTOR, junto con la vía mediada por mitógenos MAPKs, son críticas para el crecimiento, proliferación y metabolismo energético celular. En melanoma ambas vías se encuentran desreguladas, asociándose su sobreactivación, no sólo a la progresión del melanoma, sino también a la resistencia que ofrecen frente a determinados agentes quimioterapéuticos [Miller AJ et al., 2006]. La resistencia a apoptosis se ha relacionado con la inactivación y/o una pobre expresión de proteínas proapoptóticas como BAD y caspasa-9, y la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como MCL-1 asociadas a la sobreexpresión de AKT [Jazirehi AR et al., 2012]. Además, la mayoría de los principales efectores de estas vías están involucrados en diversos mecanismos compensatorios que las células cancerígenas activan para evadir los controles de muerte celular. Las actuales terapias moleculares propuestas se centran en la inhibición de estos mecanismos de resistencia. En melanoma, la inducción de apoptosis por sí sola como estrategia terapéutica es insuficiente. Sin embargo, tratamientos más eficaces se han obtenido con moléculas que, a su vez, son capaces de inducir un segundo mecanismo de muerte, autofagia [Tormo D et al., 2009]. En este aspecto, el tratamiento con prodigininas (PGs) puede ser beneficioso en el tratamiento del melanoma. Este es el caso de obatoclax (OBX), una molécula sintética derivada de PGs naturales, actualmente en fase III de estudios clínicos [Paik PK et al., 2011], capaz de activar simultáneamente apoptosis y autofagia [Pan J et al., 2010].

Numerosos estudios avalan el potencial antitumoral de diferentes PGs naturales, incluyendo prodigiosina (PG), cicloprodigiosina (cPG) o undecilprodigiosina (UP), como agentes proapoptóticos *in vivo* e *in vitro* [Pérez-Tomás R et al., 2010]. La activación de la vía intrínseca y extrínseca de apoptosis se ha observado en diferentes

líneas cancerígenas tras el tratamiento con diversas PGs y derivados sintéticos [Liu R et al., 2005; Huang S et al., 2009]. Entre ellos, PG y OBX han adquirido mayor relevancia a raíz del potente efecto citotóxico inducido en diferentes líneas cancerígenas [Williamson NR et al., 2007]. PG fue evaluado por el *National Cancer Institute* en diferentes líneas celulares mostrando una IC_{50} media de 2,1 μ M. Aunque, el efecto citotóxico de PG se ha atribuido a su actividad nucleasa, y es clasificado como inhibidor de topoisomerasas, otros mecanismos adicionales también fueron propuestos, entre ellos, la regulación de proteínas quinasas [Pérez-Tomás et al., 2003]. Más recientemente, el papel de OBX como molécula BH3 mimética también ha sido descrito evidenciando su potencial farmacológico en el tratamiento contra el cáncer [Trudel S et al., 2007]. En este aspecto, identificar mTOR, uno de los principales efectores de la ruta proliferativa PI3K/AKT y regulador de autofagia, como nueva diana molecular ayuda a una mejor comprensión de los mecanismos de acción y potencial terapéutico de PGs.

La identificación de las dianas moleculares no sólo es importante de cara a profundizar en los mecanismos de acción de PGs. Estudios con una visión más global también son necesarios con el fin de identificar los mecanismos de evasión que estas moléculas consiguen bloquear. Conocer estos datos es imprescindible de cara al diseño de nuevas estrategias quimioterapéuticas más eficaces. En los siguientes apartados trataremos cada uno de estos puntos con más detenimiento.

1.1.- Efecto citotóxico de las prodigininas en células de melanoma.

En melanoma, los estudios previos con PGs son escasos y han mostrado resultados sólo modestos tras el tratamiento individual con OBX [Nguyen M et al., 2007]. En células de melanoma en fase de crecimiento radial (SK-MEL-28), OBX mostró un 20% de células apoptóticas a una concentración de 1 μ M tras 48 h de tratamiento, mientras que en melanocitos resultó de aproximadamente la mitad [Jiang CC et al., 2009]. En este aspecto, nuestros resultados muestran una mayor eficacia de PG respecto OBX como agente individual. Es así que PG, a bajas concentraciones micromolares, muestra un marcado efecto citotóxico ya a las 24 h de tratamiento en células SK-MEL-28 y SK-MEL-5. Las diferencias estructurales entre ambas PGs explicarían la mayor efectividad de PG como agente citotóxico respecto OBX. Como se ha descrito anteriormente la presencia de la cadena alquil en PG, ausente en OBX, podría jugar un papel importante en la actividad citotóxica de PG [Pérez-Tomás R et al.,

2010]. Sin embargo, los resultados con OBX muestran que esta importancia es relativa. La presencia de la cadena alquil favorecería la actividad citotóxica de PGs, pero su presencia no es necesaria para inducirla. En el apartado 1.3 nos centraremos en los estudios SAR (*structure-activity relationship*) realizados que aportan nuevos datos que correlacionan la estructura de estas moléculas con su actividad citotóxica.

La sobre-activación de las vías de supervivencia se ha correlacionado con la quimioresistencia [Miller AJ et al., 2006]. Respecto las células SK-MEL-5, las SK-MEL-28 muestran una mayor resistencia a los tratamientos con PG u OBX, coincidiendo con una mayor activación de las vías de supervivencia PI3K y MAPK. Este dato explicaría la resistencia a la activación de los mecanismos de muerte tras el tratamiento con PGs en células SK-MEL-28.

1.2.- Tipos de muerte celular inducidos por prodigininas.

Aunque PGs han sido descritas como agentes pro-apoptóticos, otros mecanismos involucrados en muerte celular como es la autofagia también se han relacionado con su efecto citotóxico [Pan J et al., 2010]. Nuestros resultados corroboran la activación simultánea de autofagia y apoptosis en células de melanoma tras el tratamiento con PG y OBX. La activación de las caspasas-3 y -9 (marcadores pro-apoptóticos), seguida por la aparición de cuerpos apoptóticos, así como la aparición de LC3-II (marcador de autofagia) así lo demuestran.

La autofagia puede tener un papel dual, como supresor de tumores previniendo la acumulación de proteínas u orgánulos aberrantes o dañados, y por otro lado, como mecanismo de supervivencia celular. En este caso, la célula obtendría energía adicional de la degradación y reciclaje de proteínas y orgánulos, confiriéndole cierta resistencia a la activación de la apoptosis bajo condiciones de estrés. De manera que la activación de la autofagia podría entenderse como un mecanismo citotóxico o por el contrario, como un mecanismo citoprotector [Yang ZJ et al., 2011]. Aunque todavía existe controversia acerca del tema, en melanoma se ha observado que la activación simultánea de autofagia y apoptosis potencia el efecto citotóxico del tratamiento [Tormo D et al., 2011]. De aquí el interés por identificar moléculas capaces de activar ambos mecanismos de muerte como nueva estrategia terapéutica contra el melanoma.

En células de melanoma, debido a la rápida proliferación, la demanda metabólica se encuentra aumentada por lo que no sorprende encontrar ciertos niveles de LC3-II en células no tratadas. Tras el tratamiento con OBX, la activación de autofagia resulta citotóxica, tal y como lo demuestran estudios previos [Wei Y et al., 2010; Tang Y et al., 2012]. Prueba de ello es la marcada reducción del efecto citotóxico de OBX en presencia de 3-MA o clorquina (inhibidores de autofagia). En otros estudios observaron que el efecto proapoptótico mediado por OBX, en presencia de tunicamicina (inductor de estrés del retículo endoplasmático), se vio aumentado sugiriendo, además, que la activación de autofagia potencia la apoptosis [Jiang CC et al., 2009]. Otros estudios llevan a sugerir que la activación de la apoptosis inducida por OBX, puede ser, incluso, consecuencia de la activación de la autofagia [Pan J et al., 2010].

A nivel molecular, apoptosis y autofagia están estrechamente relacionados, ya que ambos mecanismos comparten mediadores como BCL-2 y BCL-X_L [Levine B et al., 2008]. De manera que, del mismo modo que moléculas BH3 miméticas impiden la interacción entre BCL-2 y BAX, podrían también impedir la interacción entre BCL-2 y beclin-1. Según la línea celular se ha observado que la activación de autofagia inducida por OBX puede ser mediado a través de mecanismos dependientes o independientes a beclin-1 y BAX/BAK [McCoy F et al., 2010]. Por ejemplo, mientras en células de cáncer de mama (MCF-7) el efecto citotóxico de OBX es beclin-dependiente, en células de cáncer de cérvix (HeLa) no lo es. Por tanto, la activación de autofagia no siempre sería necesaria en la inducción del efecto citotóxico de PGs. Estos resultados evidenciaron la existencia de otras dianas moleculares involucradas en la regulación de autofagia a parte de proteínas BCL-2.

1.3.- Relación estructura-actividad de las prodigininas.

La actividad de estas moléculas está estrechamente relacionada con su estructura tripirrólica y con la presencia de sus grupos funcionales [D'Alessio R et al., 2000]. PG está clasificada como agente intercalante del ADN, y su capacidad de romper la doble cadena de ADN depende del anillo A pirrólico (que influye en las propiedades redox) y de la cadena alquil del anillo C (que promueve daños en la hélice del ADN). PG se intercala en el surco menor del ADN gracias a las interacciones electrostáticas que se crean entre esta molécula, de naturaleza catiónica a pH neutro, y las cargas negativas de los grupos fosfato de las hélices del ADN. Además, el grupo metoxi y los átomos de

nitrógeno que contienen los anillos pirrólicos, permiten la formación de puentes de hidrógeno facilitando su unión al ADN. Una vez intercalado, PG forma un complejo cromóforo pirrolilpirrometano con el cobre presente en el núcleo de las células. Este complejo, con propiedades redox, es capaz de romper los enlaces fosfodiéster que mantienen la estructura de la doble cadena del ADN [Montaner B et al., 2005].

Hemos llevado a cabo estudios que correlacionan la accesibilidad de estos grupos funcionales con la actividad citotóxica de PGs. Mediante estudios SAR, realizados en colaboración con el Dr. Roberto Quesada (Departamento de Química, Universidad de Burgos), se diseñaron y sintetizaron diversos derivados de OBX con modificaciones estructurales alterando o bloqueando diferentes grupos funcionales. De entre todas las modificaciones, el bloqueo de los nitrógenos pirrólicos mediante la adición del grupo aniónico F₂B, provocó una marcada pérdida de actividad de OBX [Díaz de Greñu B et al., 2011]. De acuerdo con estos resultados previos, la actividad citotóxica de esta molécula resultó prácticamente nula, incluso a 48 h de tratamiento, en células de melanoma. La pérdida de citotoxicidad se ha correlacionado con la pérdida de inhibición de mTOR (apartado 2.2.1), resultados que sugieren la importancia de la accesibilidad de los átomos de nitrógeno en la interacción de la nueva diana molecular descrita. Estos estudios, en su conjunto, podrían ser relevantes de cara al diseño de nuevas y mejoradas moléculas, más eficaces, estables y solubles.

2.- Dianas moleculares de las prodigininas.

2.1.- Prodigininas, moléculas BH3 miméticas.

Las moléculas BH3-miméticas están siendo evaluadas como agentes anticancerígenos. Su potencial radica en su capacidad de antagonizar proteínas de la familia BCL-2, evitando que las células cancerígenas consigan evadir los mecanismos de muerte celular proapoptóticos [Hartman ML et al., 2012].

Diferentes estudios demuestran la capacidad de OBX de unirse a un amplio espectro de proteínas BCL-2 [Azmi AS et al., 2011]. La interacción de OBX a proteínas como BCL-2 o MCL-1, se da a través del surco hidrofóbico contenido en el dominio BH3. Esta interacción promueve la disociación de BAX y BAK de BCL-2 y MCL-1, respectivamente. BAK y BAX, una vez libres, se unen conformando poros en la membrana mitocondrial externa a través de los cuáles se da la salida del citocromo c a

citosol y posterior activación secuencial de las caspasas que conlleva a la muerte celular por apoptosis [Nguyen M et al.,2007].

En melanoma, MCL-1 se encuentra sobreexpresada, jugando un papel clave en la resistencia de este modelo a agentes quimioterapéuticos [Miller AJ et al., 2006]. Nuestros resultados demuestran que PG, al igual que OBX, se comportan como antagonistas de MCL-1. A un nivel molecular, los ensayos de co-inmunoprecipitación demuestran la rotura de la interacción entre MCL-1 y BAK tras el tratamiento con PG. En consecuencia, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación análogos, detectamos la formación de los complejos BAK/BAX. Estos resultados fueron corroborados detectando la salida del citocromo c desde las fracciones mitocondriales a la fracción citosólica.

Modelos *in silico* obtenidos en colaboración con el Dr. Víctor Guallar (*Supercomputing Center*, Barcelona) permitieron obtener una descripción detallada de la interacción de PG en el dominio BH3 de MCL-1, BCL-X_L y BCL-2. Estos modelos sugieren que PG interacciona con estas tres proteínas de la familia BCL-2, siendo la unión a MCL-1 la que presentó una mayor afinidad en un rango nanomolar. Estos datos coinciden en afinidad con las dos moléculas BH3 miméticas por excelencia, OBX y ABT-737.

Hasta 2009, la molécula BH3 mimética mejor caracterizada era ABT-737 (generada por Abbott Lab) [Cragg MS et al., 2009]. El nivel de expresión de proteínas de la familia BCL-2 resultaron determinantes en la respuesta de ABT-737, lo que sugirió que estas moléculas debían ser específicas según el tipo celular. En células que sobreexpresan BCL-2 como son las células de cáncer de pulmón SCLCs (*small-cell lung carcinoma*) y cáncer hematopoyético como CLL (*chronic lymphocytic leukaemia*), ABT-737 mostró su potencial como agente individual. En otros tipos tumorales, donde su eficacia era notablemente inferior, la combinación con OKIs (*oncogenic kinase inhibitors*) como HDACI (*histone deacetylase inhibitors*), bortezomib (inhibidor del proteasoma) o PD0325901 (inhibidor de MEK) resultó eficaz y bien tolerada. Estos resultados sentaron las bases de las terapias combinadas en presencia de nuevas y mejoradas moléculas derivadas de ésta. Es el caso de ABT-263, sin embargo, esta molécula, inhibidora de BCL-2, BCL-X_L y BCL-W, es ineficaz en células que presentan

una expresión aumentada de MCL-1. En este sentido, tratamientos con OBX deberían ser efectivos donde ABT-263 no lo son.

2.2.- mTOR como diana molecular de prodigininas.

Estudios previos sugerían que PG y OBX median sus efectos citotóxicos a través de otros mecanismos a parte de unirse e inhibir las proteínas de la familia BCL-2. Entre ellos, la regulación de diversas vías de supervivencia. El efecto proapoptótico de PG se definió como GSK3 β -dependiente en estudios realizados en células de cáncer de mama [Soto-Cerrato V et al., 2007]. La vía PI3K/AKT/mTOR, además, se encuentra directamente involucrada en la regulación de la autofagia [Yang ZJ et al., 2011]. El complejo mTORC1 es el principal regulador de la autofagia, y es su inhibición lo que promueve la formación de los autofagosomas. Datos que en su conjunto, apuntaban a una o varias posibles dianas moleculares dentro de esta vía.

Los estudios de actividad quinasa *in vitro* realizados por *The National Centre for Protein Kinase Profiling* (MRC Protein Phosphorylation Unit, Dundee, UK) confirman la actividad de PG como inhibidor multiquinasa. Los resultados obtenidos muestran una inhibición significativa (> 70%) de AKT1, RSK-2, MSK-1, SGK-1, CaMK-1 y Btk. Excepto la última, todas ellas pertenecen a la familia de proteínas quinasas AGC. Todos los positivos del panel se encuentran involucradas tanto en la vía PI3K como en la vía MAPK. Que PG muestre mayor afinidad hacia proteínas AGC podría explicarse de demostrarse la interacción de PG en alguno de los dominios conservados de esta familia. Las proteínas de la familia AGC son serín/treonín quinasas que presentan un dominio catalítico altamente conservado, por lo que a concentraciones > 10 μ M, PG podría inhibir otras proteínas AGC como PDK-1 y PKC. Otras proteínas de nuestro interés, como mTOR, no fueron evaluados en este *screening*. Sin embargo, en células de melanoma, la caracterización del efecto de PG y OBX sobre algunos de los principales efectores, reguladores y sustratos de la vía de señalización de mTOR, como son los complejos mTORC1 y mTORC2, AKT, PRAS40, p70 S6K y 4E-BP1, demostraron la inhibición de esta vía. Ensayos de actividad quinasa corroboraron la inhibición de ambos complejos de mTOR endógenos en presencia de PG u OBX. La relevancia de mTOR como diana molecular de PGs quedó patente tras revertirse su efecto citotóxico mediante el silenciamiento de mTOR y raptor mediante técnicas de interferencia.

De la misma manera que lo hacen los inhibidores de mTOR de segunda generación, PG y OBX también bloquean el feedback S6K/IRS-1 manteniendo desfosforilado AKT en su residuo S473. La inhibición dual de los complejos mTORC1 y mTORC2 supone una ventaja respecto a los inhibidores de mTOR convencionales (rapálogos) capaces de inhibir únicamente mTORC1 [Wan X et al., 2007]. Los rapálogos actúan como inhibidores alostéricos actuando, principalmente, sobre el complejo mTORC1. Sin embargo, la inhibición de mTORC1, por sí sola, no es eficaz como estrategia terapéutica ya que conlleva la activación de AKT a través del feedback negativo S6K/IRS1 y, en consecuencia, una baja actividad citotóxica. Es por ello que, en un principio, la utilización de rapálogos como agentes quimioterapéuticos, debido a su baja citotoxicidad, resultó decepcionante [Huang S et al., 2003]. Sin embargo, esta clase de moléculas derivó en el desarrollo de una segunda generación de inhibidores de mTOR más potentes y eficaces. La eficacia de estos nuevos inhibidores radica en su capacidad de interaccionar dentro del centro activo de mTOR a través de su dominio de unión al ATP. Estos inhibidores se clasificaron como ATP-competitivos, y son capaces de desplazar el ATP inhibiendo la actividad catalítica de ambos complejos de mTOR. Esta inhibición dual permite bloquear el feedback S6K/IRS1, manteniendo completamente inhibida la vía mTOR. Estos compuestos, capaces de suprimir la actividad de 4E-BP1 y S6K1, presentan un potente efecto citotóxico y antiproliferativo en comparación con los inhibidores convencionales como rapamicina [Vilar E et al., 2011]. Las similitudes funcionales entre PGs e inhibidores de mTOR ATP miméticos nos llevaron a plantearnos las PGs como inhibidores ATP-competitivos.

2.2.1.- Prodigininas, inhibidores ATP-no competitivos.

Mediante técnicas de resonancia de plasmón superficial (SPR, *surface plasmon resonance*), monitorizamos a tiempo real la interacción entre PG u OBX al centro activo de mTOR. El análisis cinético y de afinidad de dichas interacciones mostró que ambas moléculas forman complejos estables y de alta afinidad con mTOR. Este tipo de técnicas, además, nos permitió realizar ensayos de competición en presencia de ATP a concentraciones saturantes. Los sensogramas reflejaron una cinética ATP-no competitiva. Resultados que fueron confirmados mediante ensayos de actividad quinasa. En su conjunto, estos ensayos demostraron que PGs interaccionan e inhiben la actividad catalítica de mTOR a concentraciones nanomolares.

El modelo *in silico* del centro activo de mTOR generado mediante aproximaciones computacionales, nos permitió obtener una descripción detallada de los residuos involucrados en la interacción de PG y OBX a éste. Aunque todavía no se ha conseguido obtener la estructura cristalizada de mTOR debido al gran tamaño, complejidad estructural y funcional de los dos complejos, la utilización de modelos *in silico* basados en dominios homólogos de la familia PIKK (PI3K-related kinases), han sido usados para generar aproximaciones 3D de la estructura de mTOR. En estudios previos, estos modelos han sido utilizados para estudios de *docking* de otros compuestos como PP242, NVPBEZ235 y Ku0063794 [Sturgill, TW et al., 2009; Knutson, BA., 2010]. Nuestro modelo, obtenido de forma análoga, basándose en la estructura cristalizada de PI3KC γ , pone de manifiesto la importancia del grupo metoxi y los dos nitrógenos pirrólicos extremos de PGs al residuo Ser2342 de mTOR. Este modelo sugiere que estas moléculas no ocupan los mismos residuos de unión que el ATP, es decir, no son análogos al ATP. Estos datos apoyan los resultados previos que muestran una inhibición ATP-no competitiva, además, este modelo nos permitió comparar el grado de afinidad de estas interacciones con el que presenta PP242, mostrando similar grado de afinidad. PP242 es un inhibidor de mTOR de segunda generación con claras similitudes estructurales y funcionales con las PGs [Feldman ME et al., 2009]. PP242 es una molécula pequeña de estructura pirazolopirimidínica capaz de unirse al centro activo de mTOR a concentraciones nanomolares.

El dominio quinasa de los diferentes miembros de la familia PIKK se encuentra altamente conservado. Debido a la homología del centro activo, inhibidores ATP-miméticos (pe., PI-130, PP242 o PP30) son también capaces de inhibir otras quinasas como PI3K [Liu Q et al., 2009; Lipka D et al., 2008]. Sin embargo, el grado de especificidad varía según la molécula. Mientras que PI-103 inhibe de manera dual PI3K/mTOR a concentraciones nanomolares [Raynaud FI et al., 2009], PP242 es mucho más selectivo para mTOR, requiriendo concentraciones micromolares para inhibir PI3K [Feldman ME et al., 2009]. Ahora, a pesar de las similitudes entre PGs y PP242, la especificidad de PGs por mTOR y/o PI3K debe demostrarse. Una primera evidencia de la especificidad de PGs por mTOR, la encontramos en que, al igual que PP242, PG induce una marcada desfosforilación de AKT en su residuo S473, respecto en T308.

En vista de los resultados obtenidos nos cuestionamos la relevancia de estos grupos funcionales en la actividad citotóxica de PGs mediada por mTOR. En nuestro modelo, la presencia de F₂B en la estructura de OBX promueve la pérdida de su actividad como inhibidor de mTOR. Este resultado, podría explicarse teniendo en cuenta el impedimento estérico que debe ejercer el grupo F₂B en la interacción al centro activo de mTOR. Esta teoría fue apoyada tanto por los resultados obtenidos mediante técnicas SPR, las cuáles muestran una clara pérdida de afinidad de la interacción, como por ensayos *in silico* análogos a los realizados anteriormente. Este modelo permitió obtener una descripción detallada de los residuos involucrados en la interacción de OBX-F₂B al centro activo de mTOR. Debido al gran tamaño del grupo F₂B, la molécula derivada de OBX no conseguiría introducirse en el dominio hidrofóbico del centro activo, sino que interaccionaría en los márgenes de éste.

En su conjunto, estos estudios comparativos aportan nuevas evidencias sobre el potencial de PGs como agentes terapéuticos. El beneficio que PGs pueden aportar es, al igual que aportan los inhibidores de mTOR ATP-miméticos, la inhibición simultánea de diversas dianas moleculares en un rango nanomolar o submicromolar, disminuyendo la necesidad de usar tratamientos múltiples con el fin de potenciar sus efectos, y por tanto, disminuyendo los posibles efectos adversos.

2.3.- Fosfatasas como dianas moleculares de prodigininas.

En el 25-50% de melanomas no familiares se dan mutaciones de los genes supresores de tumores que codifican para las fosfatasas PTEN, PP1/PP2A o PHLPP [Miller AJ et al., 2006]. En condiciones normales, las fosfatasas regulan negativamente diferentes vías, entre ellas la vía PI3K. Cada fosfatasa regula diversos sustratos involucrados en diferentes funciones celulares. Por esta razón, las fosfatasas en si, no son consideradas potenciales dianas terapéuticas debido a la disparidad de efectos que puede conllevar su activación [Cohen PTW., 2002]. Sin embargo, las fosfatasas se unen de manera específica a cada uno de sus sustratos. Es por ello que nuevas estrategias basadas en moléculas capaces de impedir estas interacciones de manera selectiva están siendo probadas. En glioblastoma y cáncer de próstata, la utilización de trichostatin A promueve la desfosforilación de AKT mediante la rotura de la interacción entre PP1-HDAC6 [Chen CS et al., 2005; Zhu QY et al., 2011]. HDAC6 es una histona deacetilasa que actúa como supresor transcripcional. Al romperse el complejo, PP1

queda libre para inhibir la vía PI3K/AKT e inducir la muerte celular. Las implicaciones terapéuticas de esta nueva estrategia deben ser evaluadas con mayor detenimiento.

Nuestro grupo de investigación lleva años colaborando con el grupo de la Dra. Margarida Fardilha (Universidad de Aveiro, Portugal), siendo el objetivo común, el estudio del efecto de PGs sobre la actividad de las serin/treonin fosfatasas PP1/PP2A. Resultados preliminares sugerían aumentos en la expresión de PP1 tras el tratamiento de PG en células de cáncer de mama, sin embargo, en células de melanoma, ni los tratamientos con PG ni OBX mostraron variaciones significativas de la expresión ni localización subcelular de PP1. Además, tampoco la inhibición masiva de serin/treonin fosfatasas (incluyendo PP1 y PP2A) mediante el inhibidor caliculina revertieron el efecto citotóxico de PG. Estos resultados sugieren que las serin/treonin fosfatasas no son críticas, al menos, en la mediación de los efectos citotóxicos de PG en células de melanoma.

Esta hipótesis coincide con los resultados obtenidos mediante ensayos SPR que descartaron la formación de complejos PG-PP1 estables. Por otro lado, la interacción entre OBX y PP1 no puede considerarse específica debido a la falta de coincidencia entre los parámetros cinéticos y de afinidad. Sin embargo, sorprende la respuesta específica obtenida al monitorizar la interacción entre el derivado sintético de OBX, OBX-F₂B, y PP1. Mediante ensayos SPR más complejos pretendemos detectar si la interacción de OBX-F₂B a PP1 es capaz de impedir la interacción de PP1 a alguno de sus sustratos. Estos ensayos formaran parte de un nuevo proyecto multidisciplinar que, en colaboración con diferentes grupos de investigación europeos, pretende identificar los complejos PP1/PIPs (*phosphatases interacting proteins*) en diferentes tejidos, así como el estudio y diseño de nuevas moléculas que tengan como diana estos complejos.

2.4.- Otras dianas moleculares.

Otro de los mecanismos de acción propuestos para las PGs fue la de reguladores del pH intracelular [Pérez-Tomás R et al., 2003]. Recientes estudios han demostrado la eficacia de PGs como transportadores de aniones como cloruro, bicarbonato y nitrato a través de bicapas lipídicas. La actividad de PGs como transportadores de aniones se ha correlacionado con su actividad citotóxica en células cancerígenas [Diaz de Greñu B et al., 2011]. PGs forman puentes de hidrógeno a través de sus átomos de nitrógeno con

los diferentes iones. El bloqueo de estos átomos de nitrógeno, como es el caso de OBX-F₂B, promueve la pérdida de actividad ionófora de OBX al mismo tiempo que disminuye su actividad citotóxica. Esto es debido a que PGs son capaces de promover un desajuste de los gradientes de pH intracelular crítico para el mantenimiento de la homeostasis y buen funcionamiento de procesos tan vitales como es la regulación del ciclo celular. Estos resultados sugieren que el efecto citotóxico de PGs se ve potenciado a diferentes niveles.

3.- Mecanismos antimetastásicos de las prodigininas.

Las propiedades antimetastásicas de PG fueron demostradas tanto *in vitro* como *in vivo* [Zhang J et al., 2005]. PG inhibe la migración e invasividad de células de carcinoma pulmonar metastásico 95-D e impide la metástasis de melanoma a pulmón en modelos murinos. Para que las células tumorales sean capaces de metastatizar, es importante que mantengan la capacidad de adhesión celular a componentes de la matriz extracelular [Glinsky GV et al., 1996; Flaherty KT et al., 2011]. PG inhibe la adhesión celular de una manera Rho A-dependiente. Sin embargo, hasta la fecha no se conocía ninguna diana molecular de PG que pudiera mediar las propiedades antimetastásicas descritas. La identificación de mTOR como diana de PG y OBX, ha supuesto un avance en la comprensión de estos mecanismos, puesto que la vía mTOR regula migración, transición epitelio-mesénquima y metástasis a través del complejo ILK/riCTOR [McDonald PC et al., 2008; Li H et al., 2012; Serrano I et al., 2012].

Nuestros resultados sugieren que OBX podría presentar similares propiedades antimetastásicas. Ambas moléculas interrumpirían la conexión entre la vía mTOR y la vía de las integrinas que se da a través de la interacción entre rictor e ILK. Ello explicaría que, la inhibición de mTORC2 mediada por PGs, venga acompañada de desorganización del citoesqueleto de actina y la pérdida de contactos focales en células de melanoma. Ello conlleva a la retracción de filopodios y lamilopodios, pérdida de adhesión y, en consecuencia, pérdida de la capacidad de migrar de estas células.

Estos resultados son prometedores de cara al tratamiento del melanoma metastático usando PGs como agentes quimioterapéuticos. Estudios previos ya probaron la eficacia de otros inhibidores de mTOR como agentes antimetastásicos obteniendo

resultados similares. Entre ellos, la rapamicina que mostró su capacidad de inhibir el crecimiento tumoral, angiogénesis y metástasis de células de melanoma a pulmón a través de la regulación negativa de la vía de las integrinas y activación de la apoptosis [Yang Z et al., 2010]. Además, mediante el co-tratamiento con PI-103 se consiguió un efecto sinérgico más potente en *in vitro* e *in vivo* [Werzowa J et al., 2011].

La inhibición farmacológica de la vía PI3K/AKT/mTOR, tanto a través de tratamientos individuales como en combinación con otros agentes, han mostrado una significativa disminución de la proliferación, tumorigénesis, crecimiento y supervivencia celular de varios tipos de tumores en ensayos clínicos en fase I y II. Es el caso de temsirolimus (CCI-779, Wyeth), everolimus (RAD001, Novartis Pharma AG), AP23573 (Ariad Pharmaceuticals), AZD-8055 (AstraZeneca), el derivado de PP242, INK-128 (Intellikine), OSI-027 (OSI pharmaceuticals) o los derivados de PI-103, PI-540 y PI-620, así como NVPBEZ235 (Novartis) [Benjamin D et al., 2011]. Un mayor conocimiento de los mecanismos que conllevan las propiedades antimetastásicas de estas moléculas será necesario para entender estos efectos. Por otro lado, de demostrarse los efectos antimetastásicos de OBX en modelos *in vivo*, la utilización de PGs como quimioterapéuticos podría ser ventajosa respecto inhibidores convencionales de mTOR.

4.- Expectativas futuras de las prodigininas como agentes quimioterapéuticos.

La elevada mortalidad asociada con cáncer es debida a su capacidad invasiva. De hecho la metástasis es la causa del 90% de los casos de mortalidad en pacientes de cáncer [Hanahan D et al., 2000]. Ni la radioterapia ni el uso de agentes quimioterapéuticos resultan efectivos, lo que hace necesarias nuevas estrategias terapéuticas para afrontar el melanoma avanzado. Hasta la fecha, la estrategia terapéutica más efectiva ha sido la utilización combinada de agentes quimioterapéuticos como dacarbazina, temozolomida, cisplatino o paclitaxel. Aunque los estudios han mostrado una elevada tasa de respuesta, incluso en metástasis cerebrales, estos tratamientos no compensan por su toxicidad, que se ve aumentada respecto las monoterapias [Berrocal A et al., 2009].

4.1.- Estrategia terapéutica: terapia molecular combinada.

Las células cancerígenas como las de melanoma, que presentan una alta resistencia a fármacos, consiguen compensar los efectos inhibitorios de una determinada vía de señalización mediante la activación de otras vías de supervivencia a través de la compleja red de mecanismos de regulación e intercomunicación que existe entre ellas. Es por ello que la terapia molecular individual no ha tenido el éxito que, e un principio, se esperaba. Actualmente, nuevas estrategias terapéuticas se centran en la combinación de diferentes inhibidores que tienen como diana molecular los principales efectores y sustratos de diversas vías de señalización.

4.1.1.- Inhibición dual de la vía PI3K y MAPK.

Nuevas estrategias basadas en la inhibición dual de la vía PI3K/mTOR y MAPK se están evaluando con el fin de potenciar el efecto quimioterapéutico de las terapias individuales [Vilar E et al 2010; Mazzoletti M et al., 2011]. Es el caso de rapamicina en combinación con BAY43-9006 (inhibidor de BRAF) en células de melanoma [Molhoek KR et al., 2005], o bien, NVPBEZ235 (inhibidor PI3K/mTOR) en combinación con AZD6244 (inhibidor de MEK) [Aziz S et al., 2010]. Además, se ha observado que las células de melanoma son más sensibles al tratamiento con cisplatino y temozolomide (agentes alquilantes) al mantenerse inhibida la vía PI3K/AKT/mTOR [Sinnberg T et al., 2009]. Este efecto fue asociado con la supresión de MCL-1, sugiriendo que la inhibición de la vía PI3K aumenta la sensibilidad a quimioterapéuticos. Desde 2007, obatoclax, en combinación con docetaxel, topotecan o bortezomib, está siendo evaluado como inhibidor pan-BCL-2 para el tratamiento del melanoma [Jiang CC et al., 2009].

4.1.2.- Inhibición dual de las vías de supervivencia y proteínas BCL-2.

Actualmente, está siendo evaluada la eficacia de inhibidores BH3 miméticos en presencia de inhibidores de mTOR. Por el momento, son alentadores los resultados obtenidos con otras moléculas BH3 miméticas como ABT-737 en presencia de inhibidores duales de mTOR/PI3K como PP242 o PI-103 [Spender LC et al., 2012]. El uso de PI-103 como agente individual no resultaba efectivo ya que promueve un aumento de la expresión de BIM/MCL-1 y pérdida de la expresión de C-MYC. Este efecto es mediado por la vía PI3K/AKT/mTOR y podría contribuir a la supervivencia y resistencia celular. Esta resistencia se consiguió superar en presencia de ABT-737, combinación que resultó en una activación sinérgica de la vía apoptótica en células de

linfoma de Burkitt. Resultados que proponen el uso combinado de moléculas BH3 miméticas con inhibidores de mTORC1/2 selectivos como nueva aproximación terapéutica para el tratamiento de modelos quimioresistentes.

Estudios previos probaron que la combinación de OKIs con moléculas BH3-miméticas impide la vascularización tumoral a través de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [Cragg MS et al., 2009]. De manera que, la terapia combinada resulta citotóxica para las células endoteliales privando a las células cancerígenas de los nutrientes esenciales para mantener activa la señalización pro-supervivencia. Una aproximación alternativa que se propuso, en vista de los resultados obtenidos, fue la utilización de inhibidores multiquinasas como ZD6474 (Vandetanib), que inhibe EGFR y VEGFR2, sunitinib (Sutent, Pfizer) y sorafenib (Nexavar, Bayer) que inhiben VEGFR2, BRAF, PDGFRB (platelet-derived growth factor receptor B), KIT, etc., cuya combinación con moléculas BH3 miméticas podría ser beneficiosa.

Por otro lado, en diversos tipos tumorales, se han correlacionado elevados niveles de fosforilación de BCL-2 con resistencia a tratamientos con OBX [Konopleva M et al., 2008]. Konopleva y colaboradores observaron que estos tratamientos con OBX inducían la rotura de la interacción BCL-2/BIM y MCL-1/BAK en células de leucemia linfocítica crónica (CLL) previa a la inducción de la vía apoptótica mitocondrial. Sin embargo, en combinación con inhibidores de ERK se observó una disminución de niveles de fosforilación de BCL-2 que se correlacionaba con un aumento de la sensibilidad de este tipo celular al tratamiento con OBX. Estos resultados proponen que los elevados niveles de fosforilación de proteínas BCL-2 son un mecanismo de resistencia al tratamiento con OBX. Es por ello, que nuevas estrategias para el tratamiento de cánceres especialmente resistentes, incluyendo leucemia y melanoma, se centran en el tratamiento combinado de inhibidores BH3 miméticos con inhibidores de AKT, mTOR o ERK. Además, la inhibición de la vía mTOR se ha relacionado en diferentes líneas celulares con una activación de la vía MAPK, compensando así la inhibición de una vía de supervivencia con la activación de otra [Carracedo A et al., 2008]. Razón de más para combinar ambos tipos de inhibidores.

En células SK-MEL-28, tras el tratamiento con PG en combinación con inhibidores de MEK (U0126), PI3K (wortmanina) y mTOR (rapamicina), se observó un

ligero efecto sinérgico de PG en presencia de U0126 o rapamicina, lo que sugiere que tanto el bloqueo del *cross-talk* con la vía MAPK, como el refuerzo de la inhibición de mTORC1 podría dar lugar a tratamientos más eficaces. Un efecto sinérgico mayor podría observarse usando inhibidores de la vía MAPK diferentes a U0126 como sorafenib. Estudios previos en células de melanoma demostraron que la inhibición dual de BRAF mediante sorafenib y la vía PI3K cooperan en la inducción de apoptosis a través de un mecanismo MEK independiente, por lo que co-tratamientos combinando PGs con sorafenib podrían resultar más efectivos [Sánchez-Hernández I et al., 2011]. Por otro lado, es interesante no observarse un efecto sinérgico de PG en presencia de wortmanina. Este dato sugiere la inhibición dual de mTOR/PI3K mediada por PG tras 24h de tratamiento.

4.2.- Pros y contras de las prodigininas como quimioterapéuticos.

Aunque los estudios preclínicos y clínicos prueban el potencial quimioterapéutico de PGs, todavía son necesarios más estudios que aporten nuevos datos sobre la farmacodinámica y farmacocinética de PGs: dosis máximas toleradas, dosis óptimas, toxicidad, actividad (vida media) y aplicabilidad/disponibilidad biológica. En 2011 se presentaron los resultados de los ensayos clínicos con OBX en fase II [Paik PK et al., 2011]. OBX, en presencia de topotecan (inhibidor de topoisomerasas), fue bien tolerado en pacientes de cáncer de pulmón. Aunque la dosis óptima para llegar a la inhibición intratumoral con OBX no pudo ser bien definida debido al bajo número de pacientes analizados, estos resultados describen efectos adversos incluyendo desajustes del sistema nervioso central (somnolencia y euforia), diarrea y anorexia, pero siempre de manera leve y reversible al interrumpir el tratamiento. Por otro lado, las razones por las que PG no avanza a estudios clínicos no están claras. Es posible que, por sus propias características químicas como son su inestabilidad y su hidrofobicidad, dificulten la caracterización tanto de su farmacocinética como farmacodinámica.

A pesar de los prometedores resultados de PGs, éstos deben ser tomados con cierta cautela, ya que sería de esperar más efectos adversos de los descritos. Empezando por las propiedades inmunosupresoras de estas moléculas [Pérez-Tomás et al., 2003]. Estos efectos inmunosupresores son generalizados en la mayoría de moléculas anticancerígenas, incluyendo inhibidores de mTOR de segunda generación como OSI-

027 [Gibbons et al, 1999; Clackson et al, 2003]. Sin embargo, controlando las dosis y administrándolas de manera intermitente, PGs serían efectivas revirtiendo el crecimiento tumoral sin causar efectos inmunosupresores prolongados.

Finalmente, la severidad y frecuencia de la toxicidad de PGs debe seguir evaluándose en futuros ensayos clínicos, ya que, a pesar de las similitudes estructurales y propiedades químicas entre PG y OBX, la actividad antitumoral es diferente para cada molécula. Es por esto que a estos estudios deben incorporarse marcadores farmacodinámicos en diferentes tejidos con el fin de confirmar la inhibición de mTOR mediante el análisis de marcadores *downstream* como la S6K. La disminución de la fosforilación de S6K corroboraría la inhibición de mTOR así como de sus dianas *downstream* [Peralba JM et al, 2003]. Por otro lado, en vista de los resultados obtenidos con otros inhibidores de mTOR, debe tenerse en cuenta que los niveles de inhibición de mTOR no siempre se han relacionados directamente con la dosis o con la respuesta tumoral [Dancey JE, 2006; Zhang Y et al., 2012].

El futuro de la oncología está encaminado hacia el avance de las terapias moleculares y cada vez más personalizadas para cada paciente. En este sentido, las nuevas líneas de investigación se centran en el desarrollo, síntesis e incorporación de nuevos fármacos y en nuevas estrategias basadas en la combinación de agentes quimioterapéuticos dirigidos contra diversas dianas moleculares específicas para cada tipo de cáncer. Estos estudios pasan por la identificación de marcadores que ayuden en la predicción de la sensibilidad o resistencia a estos compuestos según el tipo tumoral y desarrollar nuevas terapias combinacionales. En esta misma línea, nuevos estudios se centran en el diseño de moléculas derivadas de PGs cada vez más selectivas y específicas con una mayor ventana terapéutica que las hagan más efectivas contra las células de melanoma. De hecho, actualmente se está evaluando un nuevo compuesto derivado de OBX, SC-2001, con mejoradas propiedades antitumorales [Chen KF et al., 2012]. Esto supondría una ventaja respecto a las actuales terapias combinadas en uso clínico, ya que estos nuevos derivados sintéticos, usados como agentes individuales, minimizarían los efectos adversos.

Conclusiones

Las propiedades anticancerosas de las PGs han sido demostradas en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, los mecanismos de acción inducidos por PGs que median estos efectos, todavía son parcialmente desconocidos. Los resultados aportados en esta tesis, no sólo ayudan a una mayor comprensión sobre estos mecanismos, sino que aportan nuevas evidencias sobre el potencial de estas moléculas en la terapia contra el melanoma. La identificación de nuevas dianas moleculares, involucradas directamente en la progresión del cáncer, podría ser relevante para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas capaces de superar los mecanismos de resistencia del melanoma.

Como conclusiones del estudio realizado cabe remarcar los siguientes puntos:

- ☑ PG y OBX muestran una potente actividad citotóxica en células de melanoma, un modelo especialmente resistente a la quimioterapia actual.
- ☑ PG actúa como molécula BH3 mimética antagonizando MCL-1 y, en consecuencia, induciendo la activación de la vía mitocondrial apoptótica.
- ☑ Tanto PG como OBX activan, de manera simultánea a la apoptosis, un segundo mecanismo de muerte celular: la autofagia.
- ☑ Identificamos mTOR como diana molecular de PG y OBX. Ambas moléculas median sus efectos citotóxicos a través de la inhibición dual de ambos complejos mTORC1 y mTORC2. La inhibición de ambos complejos conlleva el bloqueo del *feedback loop* S6K/IRS-1, uno de los principales mecanismos que confieren resistencia a las células cancerígenas frente al tratamiento con quimioterapéuticos.
- ☑ PG y OBX, al igual que la segunda generación de inhibidores de mTOR, se unen con una elevada afinidad al centro activo de mTOR inhibiendo su actividad catalítica. Sin embargo, ambas PGs no son inhibidores ATP miméticos.
- ☑ Descartamos un posible papel de la serín/treonín fosfatasa PP1 como mediador en el efecto citotóxico de PG.
- ☑ Los estudios de relación estructura-actividad (SAR) nos han permitido correlacionar la capacidad de PGs de interactuar e inhibir mTOR, con su potencial anticanceroso y antimetastásico. El bloqueo de los grupos amino de los anillos pirrólicos de OBX ha resultado en una molécula prácticamente inactiva tanto en su efecto citotóxico como en su capacidad de inhibir mTOR.

- ☑ PG y OBX inhiben la señalización mediada por integrinas a través del complejo ILK/riCTOR. Tras la desorganización del citoesqueleto y desaparición de los contactos focales inducida por PG y OBX, las células de melanoma pierden la capacidad de migración y adhesión.

Bibliografía

-A-

Abrahantes-Pérez MC, Reyes-González J, Véliz Ríos G, Bequet-Romero M, Gómez Riera R, Anais Gasmury C, Huerta V, González LJ, Canino C, Garcia J, Váldez J, Reyes B, Váldez R, Martínez E. Cytotoxic proteins combined with prodigiosin obtained from *Serratia marcescens* have both broad and selective cytotoxic activity on tumor cells. *J Chemother.* 2006 Apr;18(2):172-81.

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N *et al.* Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *Embo J* 1996;15:6541-51.

Ali SM, Sabatini DM. Structure of S6 kinase 1 determines whether raptor-mTOR or rictor-mTOR phosphorylates its hydrophobic motif site. *J Biol Chem* 2005;280:19445-8.

Aziz SA, Jilaveanu LB, Zito C, Camp RL, Rimm DL, Conrad P, Kluger HM. Vertical targeting of the phosphatidylinositol-3 kinase pathway as a strategy for treating melanoma. *Clin Cancer Res.* 2010 Dec 15;16(24):6029-39.

Azmi AS, Wang Z, Philip PA, Mohammad RM, Sarkar FH. Emerging Bcl-2 inhibitors for the treatment of cancer. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2011 Mar;16(1):59-70. Review.

-B-

Bajwa N, Liao C, Nikolovska-Coleska Z. Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2012 Jan;22(1):37-55.

Ballif BA, Roux PP, Gerber SA, MacKeigan JP, Blenis J, Gygi SP. Quantitative phosphorylation profiling of the ERK/p90 ribosomal S6 kinase-signaling cassette and its targets, the tuberous sclerosis tumor suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jan 18;102(3):667-72.

Bamburg JR, Wiggan OP. ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol.* 2002 Dec;12(12):598-605.

Bayascas JR, Alessi DR. Regulation of Akt/PKB Ser473 phosphorylation. *Mol Cell.* 2005 Apr 15;18(2):143-5.

Bayés M, Rabasseda X, Prous JR. Gateways to clinical trials. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2007 Jul-Aug;29(6):427-37.

Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Oct 31;10(11):868-80.

Bennett JW and Bentley R. Seeing red: the story of prodigiosin. *Adv Appl Microbiol.* 2000;47:1-32.

Berrocal A, Camps C, González JL, Guillem V, Martín S. Tratado actualizado del melanoma. Editorial Glosa, S.L. ISBN: 978-84-7429-411-8 Depósito legal: B-30.122-2009.

Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene.* 2003 Sep 29;22(42):6524-36. Review.

Bokoch GM. Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:743-81.

Bracho-Valdés I, Moreno-Álvarez P, Valencia-Martínez I, Robles-Molina E, Chávez-Vargas L, Vázquez-Prado J. mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. *IUBMB Life.* 2011 Oct;63(10):880-98.

-C-

Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L *et al.* Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 2008;118:3065-74.

Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*. 2008 Sep 18;27(41):5527-41.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Sep;72(9):3666-70.

Castillo-Avila W, Abal M, Robine S, Pérez-Tomás R. Non-apoptotic concentrations of prodigiosin (H⁺/Cl⁻ symporter) inhibit the acidification of lysosomes and induce cell cycle blockage in colon cancer cells. *Life Sci*. 2005 Nov 26;78(2):121-7.

Chen CS, Weng SC, Tseng PH, Lin HP, Chen CS. Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on Akt through the reshuffling of protein phosphatase 1 complexes. *J Biol Chem*. 2005 Nov 18;280(46):38879-87.

Chen KF, Su JC, Liu CY, Huang JW, Chen KC, Chen WL, Tai WT, Shiau CW A novel obatoclax derivative, SC-2001, induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through SHP-1-dependent STAT3 inactivation. *Cancer Lett*. 2012 Aug 1;321(1):27-35.

Choi J, Chen J, Schreiber SL, Clardy J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science*. 1996 Jul 12;273(5272):239-42.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst*. 1989 Dec 20;81(24):1893-904.

Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D IV, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984;15: 1147-65.

Cohen, P. T. W. (2002). "Protein phosphatase 1 - targeted in many directions." *J Cell Sci* **115**(2): 241-246.
Cragg MS, Harris C, Strasser A y Scott CL. Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through BH3 mimetics. *Nature Reviews Cancer* 2009 9, 321-326.

Crowson AN, Magro C, Miller A, Mihm MC Jr. The molecular basis of melanomagenesis and the metastatic phenotype. *Semin Oncol*. 2007 Dec;34(6):476-90. Review.

-D-

Dalby KN, Morrice N, Caudwell FB, Avruch J, Cohen P. Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *J Biol Chem* 1998;273:1496-505.

D'Alessio R, Bargiotti A, Carlini O, Colotta F, Ferrari M, Gnocchi P, Isetta A, Mongelli N, Motta P, Rossi A, Rossi M, Tibolla M, Vanotti E. Synthesis and immunosuppressive activity of novel prodigiosin derivatives. *J Med Chem*. 2000 Jun 29;43(13):2557-65.

Dan C, Kelly A, Bernard O, Minden A. Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J Biol Chem*. 2001 Aug 24;276(34):32115-21.

Dancey JE. Therapeutic targets: MTOR and related pathways. *Cancer Biol Ther*. 2006 Sep;5(9):1065-73.

Díaz de Greñu B, Iglesias Hernández P, Espona M, Quiñonero D, Light ME, Torroba T, Pérez-Tomás R, Quesada R. Synthetic prodiginine obatoclax (GX15-070) and related analogues: anion binding, transmembrane transport, and cytotoxicity properties. *Chemistry*. 2011 Dec 9;17(50):14074-83.

Dibble CC, Asara JM, Manning BD. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol Cell Biol*. 2009 Nov;29(21):5657-70.

-F-

Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggiero D, Shokat KM. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol*. 2009 Feb 10;7(2):e38.

Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 2002;16:1472-87.

Flaherty KT. Targeting metastatic melanoma. *Annu Rev Med*. 2012;63:171-83.

Fullan, N. P., Lynch, D. L., and Ostrow, D. H. Effects of bacterial extracts on Chinese hamster cells and rat neoplasms. *Microbiol 1977. Lett*. 5, 157-161.

-G-

Gale PA, Light ME, McNally B, Navakhun K, Sliwinski KE, Smith BD. Co-transport of H⁺/Cl⁻ by a synthetic prodiginosin mimic. *Chem Commun (Camb)*. 2005 Aug 14;(30):3773-5.

Gaughran ER. From superstition to science: the history of a bacterium. *Trans N Y Acad Sci*. 1969 Jan;31(1):3-24.

Glinsky GV, Glinsky VV. Apoptosis and metastasis: a superior resistance of metastatic cancer cells to programmed cell death. *Cancer Lett* 1996;101:43-51.

Guertin DA, Sabatini DM An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med*. 2005 aug;11(8):353-61.

Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*. 2007 Jul;12(1):9-22. Review.

Guertin DA, Sabatini DM. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal* 2009;2:pe24.

Gulhati P, Bowen KA, Liu J, Stevens PD, Rychahou PG, Chen M, Lee EY, Weiss HL, O'Connor KL, Gao T, Evers BM mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways. *Cancer Res*. 2011 May 1;71(9):3246-56.

-H-

Hainsworth JD, Infante JR, Spigel DR, Peyton JD, Thompson DS, Lane CM, Clark BL, Rubin MS, Trent DF, Burris HA 3rd Bevacizumab and everolimus in the treatment of patients with metastatic melanoma: a phase 2 trial of the Sarah Cannon Oncology Research Consortium. *Cancer*. 2010 Sep 1;116(17):4122-9.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70. Review

Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 2004;1697:3-16.

Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N *et al.* Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 2002;110:177-89.

Harrington, L.S., G.M. Findlay, A. Gray, T. Tolkmacheva, S. Wigfield, H. Rebholz, J. Barnett, N.R. Leslie, S. Cheng, P.R. Shepherd, et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol* 2004. 166:213-223.

Hartman ML, Czyz M. Pro-apoptotic Activity of BH3-only Proteins and BH3 Mimetics: from Theory to Potential Cancer Therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2012 Jan 19.

Hauge C, Antal TL, Hirschberg D, Doehn U, Thorup K, Idrissova L, Hansen K, Jensen ON, Jørgensen TJ, Biondi RM, Frödin M Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation. *EMBO J.* 2007 May 2;26(9):2251-61.

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004 Aug 15;18(16):1926-45. Review

Høyer-Hansen M, Jäättelä M. Autophagy: an emerging target for cancer therapy. *Autophagy.* 2008 Jul;4(5):574-80.

Hsieh AC, Costa M, Zollo O, Davis C, Feldman ME, Testa JR, Meyuhas O, Shokat KM, Ruggero D Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E. *Cancer Cell.* 2010 Mar 16;17(3):249-61.

Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol.* 2008 Jun;28(12):4104-15.

Huang S, Bjornsti MA, Houghton PJ. Rapamycins: mechanism of action and cellular resistance. *Cancer Biol Ther.* 2003 May-Jun;2(3):222-32. Review

Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:371-7.

Huang S, Okumura K, Sinicrope FA. BH3 mimetic obatoclox enhances TRAIL-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2009;15:150-159.

Hwang JJ, Kuruvilla J, Mendelson D, Pishvaian MJ, Deeken JF, Siu LL, Berger MS, Viallet J, Marshall JL. Phase I dose finding studies of obatoclox (GX15-070), a small molecule pan-BCL-2 family antagonist, in patients with advanced solid tumors or lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2010 Aug 1;16(15):4038-45.

Hynes RO, Lively JC, McCarty JH, Taverna D, Francis SE, Hodivala-Dilke K, Xiao Q. The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2002;67:143-53. Review.

-I-

Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X, Guan KL. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J.* 2008 Jul 23;27(14):1919-31.

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* 2002 Sep;4(9):648-57

Inuzuka H, Fukushima H, Shaik S, Liu P, Lau AW, Wei W. Mcl-1 ubiquitination and destruction. *Oncotarget.* 2011 Mar;2(3):239-44

Ishihara, H., *et al.* "Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity." *Biochem. Biophys. Res. Comm* 1989. 159: 871-877.

Ishitsuka K, Kunami N, Katsuya H, Nogami R, Ishikawa C, Yotsumoto F, Tanji H, Mori N, Takeshita M, Miyamoto S, Tamura K. Targeting Bcl-2 family proteins in adult T-cell leukemia/lymphoma: In vitro and in vivo effects of the novel Bcl-2 family inhibitor ABT-737. *Cancer Lett.* 2011 Dec 2.

Ito A, Koma YI, Watabe K. A mutation in protein phosphatase type 2A as a cause of melanoma progression. *Histol Histopathol.* 2003 Oct;18(4):1313-9. Review.

-J-

Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell.* 2006 Oct 6;127(1):125-37.

Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004 Nov;6(11):1122-8

Jazirehi AR, Wenn PB, Damavand M Therapeutic implications of targeting the PI3Kinase/AKT/mTOR signaling module in melanoma therapy. *Am J Cancer Res.* 2012;2(2):178-91.

Jiang CC, Wroblewski D, Yang F, Hersey P, Zhang XD. Human melanoma cells under endoplasmic reticulum stress are more susceptible to apoptosis induced by the BH3 mimetic obatoclox. *Neoplasia.* 2009 Sep;11(9):945-55.

Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 1999;18:345-57.

Julien LA, Carriere A, Moreau J, Roux PP mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol.* 2010 Feb;30(4):908-21.

Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* 2009;20:1992–2003.

-K-

Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2009 Feb 15;15(4):1126-32.

Katzel JA, Fanucchi MP, Li Z. Recent advances of novel targeted therapy in non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol.* 2009 Jan 21;2:2. Review.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57. Review

Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR *et al.* mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;110:163-75.

Kim EK, Yun SJ, Ha JM, Kim YW, Jin IH, Yun J, Shin HK, Song SH, Kim JH, Lee JS, Kim CD, Bae SS Selective activation of Akt1 by mammalian target of rapamycin complex 2 regulates cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Oncogene.* 2011 Jun 30;30(26):2954-63.

Knutson, B. A. Insights into the domain and repeat architecture of target of rapamycin. *J. Struct. Biol* 2010. **170**, 354–363.

Konno H, Matsuya H, Okamoto M, Sato T, Tanaka Y, Yokoyama K, Kataoka T, Nagai K, Wasserman HH, Ohkuma S. Prodigiosins uncouple mitochondrial and bacterial F-ATPases: evidence for their H⁺/Cl⁻ transport activity. *J Biochem.* 1998 Sep;124(3):547-56.

Konopleva M, Watt J, Contractor R, Tsao T, Harris D, Estrov Z, Bornmann W, Kantarjian H, Viallet J, Samudio I, Andreeff M. Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclax). *Cancer Res.* 2008 May 1;68(9):3413-20.

-L-

Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 2008;4:600-6.

Li H, Lin J, Wang X, Yao G, Wang L, Zheng H, Yang C, Jia C, Liu A, Bai X. Targeting of mTORC2 prevents cell migration and promotes apoptosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Apr 4.

Li J, Viallet J, Haura EB. A small molecule pan-Bcl2 family inhibitor, GX15-070, induces apoptosis and enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small cell. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008 Mar;61(3):525-34.

Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):375-9.

Lipka DB, Hoffmann LS, Heidel F, Markova B, Blum MC, Breitenbuecher F, Kasper S, Kindler T, Levine RL, Huber C, Fischer T LS104, a non-ATP-competitive small-molecule inhibitor of JAK2, is potently inducing apoptosis in JAK2V617F-positive cells. *Mol Cancer Ther.* 2008 May;7(5):1176-84.

Liu J, Stevens PD, Gao T. mTOR-dependent regulation of PHLPP expression controls the rapamycin sensitivity in cancer cells. *J Biol Chem* 2011;286(8):6510-20.

Liu Q, Kirubakaran S, Hur W, Niepel M, Westover K, Thoreen CC, Wang J, Ni J, Patricelli MP, Vogel K, Riddle S, Waller DL, Traynor R, Sanda T, Zhao Z, Kang SA, Zhao J, Look AT, Sorger PK, Sabatini DM, Gray NS. Kinome-wide selectivity profiling of ATP-competitive mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitors and characterization of their binding kinetics. *J Biol Chem.* 2012 Mar 23;287(13):9742-52.

Liu Q, Thoreen C, Wang J, Sabatini D, Gray NS. mTOR mediated anti-cancer drug discovery. *Drug Discov Today Ther Strateg* 2009;6:47-55.

Liu R, Cui CB, Duan L, Gu QQ, Zhu WM. Potent in vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov. *Arch Pharm Res.* 2005 Dec;28(12):1341-4.

López-Fauqued M, Gil R, Grueso J, Hernandez-Losa J, Pujol A, Moliné T, Recio JA. The dual PI3K/mTOR inhibitor PI-103 promotes immunosuppression, in vivo tumor growth and increases survival of sorafenib-treated melanoma cells. *Int J Cancer.* 2010 Apr 1;126(7):1549-61.

-M-

MacKie RM. Risk factors for the development of primary cutaneous malignant melanoma. *Dermatol Clin* 2002;20: 597-600.

Manning et al, 2002 Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261-74.

Manning, B.D., and L.C. Cantley. 2003. Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem. Sci* 28:573-576.

Marone R, Erhart D, Mertz AC, Bohnacker T, Schnell C, Cmiljanovic V, Stauffer F, Garcia-Echeverria C, Giese B, Maira SM, Wymann MP. Targeting melanoma with dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitors. *Mol Cancer Res*. 2009 Apr;7(4):601-13

Mazzoletti M, Bortolin F, Brunelli L, Pastorelli R, Di Giandomenico S, Erba E, Ubezio P, Brogginini M. Combination of PI3K/mTOR inhibitors: antitumor activity and molecular correlates. *Cancer Res*. 2011 Jul 1;71(13):4573-84.

McCoy F, Hurwitz J, McTavish N, Paul I, Barnes C, O'Hagan B, Odrzywol K, Murray J, Longley D, McKerr G, Fennell DA. Obatoclax induces Atg7-dependent autophagy independent of beclin-1 and BAX/BAK. *Cell Death Dis*. 2010 Dec 16;1:e108.

McDonald PC, Oloumi A, Mills J, Dobрева I, Maidan M, Gray V, Wederell ED, Bally MB, Foster LJ, Dedhar S. Rictor and integrin-linked kinase interact and regulate Akt phosphorylation and cancer cell survival. *Cancer Res*. 2008 Mar 15;68(6):1618-24.

Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006 Jul 6;355(1):51-65. Review.

Mitchell C, Yacoub A, Hossein H, Martin AP, Bareford MD, Eulitt P, Yang C, Nephew KP, Dent P. Inhibition of MCL-1 in breast cancer cells promotes cell death in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*. 2010 Nov 23;10(9):903-17.

Molhoek KR, Brautigan DL, Slingluff CL Jr Synergistic inhibition of human melanoma proliferation by combination treatment with B-Raf inhibitor BAY43-9006 and mTOR inhibitor Rapamycin. *J Transl Med*. 2005 Oct 28;3:39.

Montaner B, Castillo-Avila W, Martinell M, Ollinger R, Aymami J, Giralt E, Pérez-Tomás R. DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin. *Toxicol Sci*. 2005 Jun;85(2):870-9.

Montaner B, Pérez-Tomás R. The cytotoxic prodigiosin induces phosphorylation of p38-MAPK but not of SAPK/JNK. *Toxicol Lett*. 2002 Mar 24;129(1-2):93-8.

Mortellaro A, Songia S, Gnocchi P, Ferrari M, Fornasiero C, D'Alessio R, Isetta A, Colotta F, Golay J. New immunosuppressive drug PNU156804 blocks IL-2-dependent proliferation and NF-kappa B and AP-1 activation. *J Immunol*. 1999 Jun 15;162(12):7102-9.

-N-

Nascimento EB, Snel M, Guigas B, van der Zon GC, Kriek J, Maassen JA, Jazet IM, Diamant M, Ouwens DM. Phosphorylation of PRAS40 on Thr246 by PKB/AKT facilitates efficient phosphorylation of Ser183 by mTORC1. *Cell Signal*. 2010 Jun;22(6):961-7.

Neufeld TP. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr;22(2):157-68. Review.

Nguyen M, Marcellus RC, Roulston A, Watson M, Serfass L, Murthy Madiraju SR, Goulet D, Viallet J, Bélec L, Billot X, Acoca S, Purisima E, Wiegmanns A, Cluse L, Johnstone RW, Beuparlant P, Shore GC. Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 4;104(49):19512-7.

Nobes, C.D., and A. Hall. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995; 81:53-62.

Nordin H, Jungnelius M, Karlsson R, Karlsson OP. Kinetic studies of small molecule interactions with protein kinases using biosensor technology. *Anal Biochem* 2005;340:359-68.

-O-

O'Brien SM, Claxton DF, Crump M, Faderl S, Kipps T, Keating MJ, Viallet J, Cheson BD. Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009 Jan 8;113(2):299-305.

-P-

Paik PK, Rudin CM, Brown A, Rizvi NA, Takebe N, Travis W, James L, Ginsberg MS, Juergens R, Markus S, Tyson L, Subzwari S, Kris MG, Krug LM. A phase I study of obatoclax mesylate, a Bcl-2 antagonist, plus topotecan in solid tumor malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010 Nov;66(6):1079-85.

Paik PK, Rudin CM, Pietanza MC, Brown A, Rizvi NA, Takebe N, Travis W, James L, Ginsberg MS, Juergens R, Markus S, Tyson L, Subzwari S, Kris MG, Krug LM. A phase II study of obatoclax mesylate, a Bcl-2 antagonist, plus topotecan in relapsed small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2011 Dec;74(3):481-5.

Palchaudhuri R, Hergenrother PJ. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Curr Opin Biotechnol*. 2007 Dec;18(6):497-503. Review.

Pan J, Cheng C, Verstovsek S, Chen Q, Jin Y, Cao Q. The BH3-mimetic GX15-070 induces autophagy, potentiates the cytotoxicity of carboplatin and 5-fluorouracil in esophageal carcinoma cells. *Cancer Lett*. 2010 Jul 28;293(2):167-74.

Pearce LR, Huang X, Boudeau J, Pawłowski R, Wullschlegel S, Deak M, Ibrahim AF, Gourlay R, Magnuson MA, Alessi DR. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J*. 2007 Aug 1;405(3):513-22.

Pearce LR, Komander D, Alessi DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010 Jan;11(1):9-22. Review.

Peralba JM, DeGraffenried L, Friedrichs W, Fulcher L, Grünwald V, Weiss G, Hidalgo M. Pharmacodynamic Evaluation of CCI-779, an Inhibitor of mTOR, in Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2003 Aug 1;9(8):2887-92.

Perez-Tomas R, Monatner B, Llagostera E, Soto-Cerrato V. "The prodiginosins, proapoptotic drugs with anticancer properties". *Biochemical Pharmacology* 66 (2003) 1447-1452. Review.

Pérez-Tomás R, Viñas M. New insights on the antitumoral properties of prodiginines. *Curr Med Chem*. 2010;17(21):2222-31. Review

-R-

Raynaud, F. I. *et al.* Biological properties of potent inhibitors of class I phosphatidylinositide 3-kinases: from PI-103 through PI-540, PI-620 to the oral agent GDC-0941. *Mol. Cancer Ther* 2009. 8, 1725–1738.

Roux PP, Blenis J ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004 Jun;68(2):320-44.

-S-

Samuels Y, Ericson K Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol*. 2006 Jan;18(1):77-82.

Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA *et al.* PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 2007;25:903-15.

Sánchez-Hernández I, Baquero P, Calleros L, Chiloeches A. Dual inhibition of (V600E)BRAF and the PI3K/AKT/mTOR pathway cooperates to induce apoptosis in melanoma cells through a MEK-independent mechanism. *Cancer Lett.* 2012 Jan 28;314(2):244-55.

Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell.* 2006 Apr 21;22(2):159-68.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005 Feb 18;307(5712):1098-101

Schimmer AD, O'Brien S, Kantarjian H, Brandwein J, Cheson BD, Minden MD, Yee K, Ravandi F, Giles F, Schuh A, Gupta V, Andreeff M, Koller C, Chang H, Kamel-Reid S, Berger M, Viallet J, Borthakur G. A phase I study of the pan bcl-2 family inhibitor obatoclax mesylate in patients with advance hematologic malignancies. *Clin Cancer Res.* 2008 Dec 15;14(24):8295-301.

Schmitt CA, Rosenthal CT, Lowe SW. Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas. *Nat Med.* 2000 Sep;6(9):1029-35.

Serrano I, McDonald PC, Lock FE, Dedhar S. Role of the integrin-linked kinase (ILK)/Rictor complex in TGF β -1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Oncogene.* 2012 Feb 6.

Shah OJ, Hunter T. Tuberous sclerosis and insulin resistance. Unlikely bedfellows reveal a TORrid affair. *Cell Cycle.* 2005 Jan;4(1):46-51. Epub 2005 Jan 3. Review

Sinnberg T, Lasithiotakis K, Niessner H, Schittek B, Flaherty KT, Kulms D, Maczey E, Campos M, Gogel J, Garbe C, Meier F Inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling sensitizes melanoma cells to cisplatin and temozolomide. *J Invest Dermatol.* 2009 Jun;129(6):1500-15.

Soosairajah J, Maiti S, Wiggan O, Sarmiere P, Moussi N, Sarcevic B, Sampath R, Bamburg JR, Bernard O. Interplay between components of a novel LIM kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *EMBO J.* 2005 Feb 9;24(3):473-86. Epub 2005 Jan 20

Soto-Cerrato V, Viñals F, Lambert JR, Kelly JA, Perez-Tomas R. Prodigiosin induces the proapoptotic gene NAG-1 via glycogen synthase kinase-3b activity in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6(1).

Soto-Cerrato V, Viñals F, Lambert JR, Pérez-Tomás R. The anticancer agent prodigiosin induces p21WAF1/CIP1 expression via transforming growth factor-beta receptor pathway. *Biochem Pharmacol.* 2007 Nov 1;74(9):1340-9.

Spender LC e Inman GJ. Phosphoinositide 3-kinase/AKT/mTORC1/2 signaling determines sensitivity of Burkitt's Lymphoma cells to BH3 mimetics. *Mol Cancer Res* 2012;10:347-359.

Sturgill, T. W. & Hall, M. N. Activating mutations in TOR are in similar structures as oncogenic mutations in PI3K α . *ACS Chem. Biol.* **4**, 999–1015 (2009).

-T-

Taberner J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, Martinelli E, Ramon y Cajal S, Jones S, Vidal L, Shand N, Macarulla T, Ramos FJ, Dimitrijevic S, Zoellner U, Tang P, Stumm M, Lane HA, Lebwohl D, Baselga J. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2008 Apr 1;26(10):1603-10.

Tang Y, Hamed HA, Cruickshanks N, Fisher PB, Grant S, Dent P. Obatoclax and lapatinib interact to induce toxic autophagy through NOXA. *Mol Pharmacol.* 2012 Apr;81(4):527-40.

Tormo D, Checińska A, Alonso-Curbelo D, Pérez-Guijarro E, Cañón E, Riveiro-Falkenbach E, Calvo TG, Larribere L, Megias D, Mulero F, Piris MA, Dash R, Barral PM, Rodríguez-Peralto JL, Ortiz-Romero P, Tüting T, Fisher PB, Soengas MS Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell*. 2009 Aug 4;16(2):103-14.

Trudel S, Li ZH, Rauw J, Tiedemann RE, Wen XY, Stewart AK. Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5430-8.

Tse, C. *et al.* ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res*. 68, 3421–3428 (2008)

-V-

Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol*. 2007 Mar;9(3):316-23.

Vilar E, Perez-Garcia J, Tabernero J. Pushing the envelope in the mTOR pathway: the second generation of inhibitors. *Mol Cancer Ther*. 2011 Mar;10(3):395-403. Review.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jul;2(7):489-501.

-W-

Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*. 2004 Apr 12;23(16):2838-49.

Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene* 2007;26:1932-40.

Wei Y, Kadia T, Tong W, Zhang M, Jia Y, Yang H, Hu Y, Viallet J, O'Brien S, Garcia-Manero G. The combination of a histone deacetylase inhibitor with the BH3-mimetic GX15-070 has synergistic antileukemia activity by activating both apoptosis and autophagy. *Autophagy*. 2010 Oct;6(7):976-8.

Wertzowa J, Koehrer S, Strommer S, Cejka D, Fuehrer T, Zebedin E, Wacheck V Vertical inhibition of the mTORC1/mTORC2/PI3K pathway shows synergistic effects against melanoma in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol*. 2011 Feb;131(2):495-503.

Williamson NR, Fineran PC, Gristwood T, Chawrai SR, Leeper FJ, Salmond GP. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines. *Future Microbiol*. 2007 Dec;2(6):605-18.

Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*. 2007 Feb 9;315(5813):856-9.

Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006;124:471-84.

-X-

Xie J, Ponuwei GA, Moore CE, Willars GB, Tee AR, Herbert TP. cAMP inhibits mammalian target of rapamycin complex-1 and -2 (mTORC1 and 2) by promoting complex dissociation and inhibiting mTOR kinase activity. *Cell Signal*. 2011 Dec;23(12):1927-35.

-Y-

Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Yamanoshita O, Iida M, Ohgami N, Tamura H, Kawamoto Y, Kato M. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. *Dermatol Res Pract.* 2012;2012:354191.

Yang Q, Inoki K, Kim E, Guan KL TSC1/TSC2 and Rheb have different effects on TORC1 and TORC2 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 May 2;103(18):6811-6.

Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther.* 2011 Sep;10(9):1533-41. Review.

Yu, VL. *Serratia marcescens*: Historical perspective and clinical review. *N Engl J Med.* 1979 Apr 19;300(16):887-93.

-Z-

Zhai D, Jin C, Satterthwait AC, Reed JC. Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cell Death Differ.* 2006;13(8):1419-21.

Zhang J, Shen Y, Liu J, Wei D. Antimetastatic effect of prodigiosin through inhibition of tumor invasion. *Biochem Pharmacol.* 2005 Feb 1;69(3):407-14.

Zhang Y, Zheng XF. mTOR-independent 4E-BP1 phosphorylation is associated with cancer resistance to mTOR kinase inhibitors. *Cell Cycle.* 2012 Feb 1;11(3):594-603.

Zhou L, Chang DC. Dynamics and structure of the Bax-Bak complex responsible for releasing mitochondrial proteins during apoptosis. *J Cell Sci.* 2008 Jul 1;121(Pt 13):2186-96.

Zhu QY, Wang Z, Ji C, Cheng L, Yang YL, Ren J, Jin YH, Wang QJ, Gu XJ, Bi ZG, Hu G, Yang Y. C6-ceramide synergistically potentiates the anti-tumor effects of histone deacetylase inhibitors via AKT dephosphorylation and α -tubulin hyperacetylation both in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* 2011 Jan 27;2:e117.

Anexo I

Synthetic Prodiginine Obatoclax (GX15-070) and Related Analogues: Anion Binding, Transmembrane Transport, and Cytotoxicity Properties

Borja Díaz de Greñu,^[a] Paulina Iglesias Hernández,^[b] Margarita Espona,^[b] David Quiñonero,^[c] Mark E. Light,^[d] Tomás Torroba,^[a] Ricardo Pérez-Tomás,^[b] and Roberto Quesada*^[a]

Abstract: Synthetic prodiginine obatoclax shows promise as a potential anticancer drug. This compound promotes apoptosis of cancer cells, although the mechanism of action is unclear. To date, only the inhibition of BCL-2 proteins has been proposed as a mechanism of action. To gain insight into other possible modes of action, we have studied the anion-binding properties of obatoclax and related analogues in solution, in the solid state, and by means of density functional theory cal-

culations. These compounds are well suited to interact with anions such as chloride and bicarbonate. The anion-transport properties of the compounds synthesized were assayed in model phospholipid liposomes by using a chloride-selective-electrode technique and ¹³C NMR spectroscopy. The results

demonstrated that these compounds are efficient anion exchangers that promote chloride, bicarbonate, and nitrate transport through lipid bilayers at very low concentrations. In vitro studies on small-cell lung carcinoma cell line GLC4 showed that active ionophores are able to discharge pH gradients in living cells and the cytotoxicity of these compounds correlates well with ionophoric activity.

Keywords: antitumor agents · cytotoxicity · ionophores · liposomes · supramolecular chemistry

Introduction

Recently, development of synthetic anion transporters has attracted intense interest due the potential applications of these systems in medicinal chemistry, sensing applications, and biomembrane research.^[1] The control of anion transport is crucial for cell survival, therefore, molecules and synthetic transport systems that facilitate transmembrane anion transport could display biological activity. Despite this, there are only a few studies that concern the effect of anion transporters in living cells.^[2] Prodigiosin stands out as the best-studied naturally occurring small-molecule anionophore

(Scheme 1).^[3] This alkaloid named a family of red pigments (the prodiginines), characterized by a 4-methoxy-2,2'-bipyrrrolpyrromethene core, produced by several bacteria strains.^[4] The physiological functions of the prodiginines in the producing organisms are not clear, nevertheless, they display a broad range of potentially useful biological activities. The antimicrobial, antimalarial, immunosuppressive, and cytotoxic activity of these compounds are well documented.^[5] Multiple mechanisms/cellular targets have been related to the biological activity of prodiginines, ionophoric activity included.^[6] Prodiginines can interfere with signal-transduction pathways and affect mitogen-activated protein kinases (MAPKs), facilitate double-strand DNA cleavage in the presence of Cu^{II}, induce cell-cycle arrest, and disrupt intracellular pH gradients. Recently, the prodiginines have emerged as a novel group of agents with proapoptotic anticancer properties.^[7] In this regard, the synthetic prodiginine obatoclax (GX15-070, **1a**) is of singular relevance because it shows promise as an anticancer drug.^[8] This compound, commercially developed by the pharmaceutical company Gemin X (recently acquired by Cephalon), has shown promising activity in both preclinical and clinical trials across multiple cancer indications and encouraging results in phase II clinical trials, in combination with carboplatin and etoposide, in front-line extensive-stage small-cell lung cancer (SCLC). A number of studies have appeared in the literature that link the proapoptotic activity of **1a** to BCL-2 inhibition (BCL-2 are a family of proteins that control the commitment to apoptotic cell death in mammals), whereas other modes of action of this compound remain largely un-

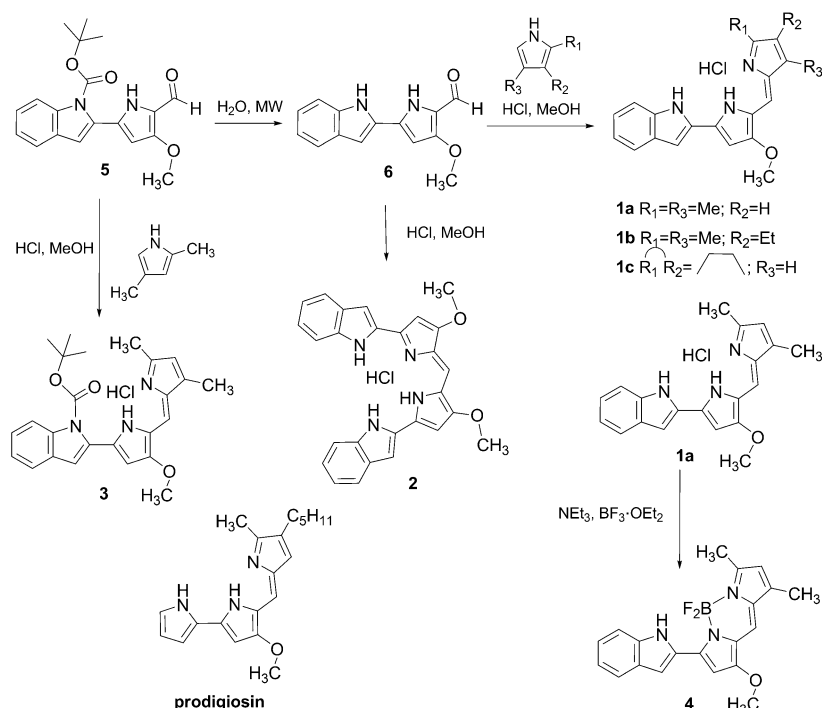
[a] B. Díaz de Greñu, Prof. T. Torroba, Dr. R. Quesada
Departamento de Química, Facultad de Ciencias
Universidad de Burgos
09001 Burgos (Spain)
Fax: (+34)-947-258-013
E-mail: rquesada@ubu.es

[b] P. I. Hernández, M. Espona, Prof. R. Pérez-Tomás
Department of Pathology and Experimental Therapeutics
Universidad de Barcelona, Barcelona (Spain)

[c] Dr. D. Quiñonero
Departament de Química
Universitat de les Illes Balears
07122 Palma de Mallorca (Spain)

[d] Dr. M. E. Light
School of Chemistry
University of Southampton
SO17 1BJ, Southampton (UK)

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201101547>.



Scheme 1. Synthesis of compounds **1–4** (MW = microwave irradiation).

explored.^[9] In this regard, it is essential to gain insight into the mode of action of these compounds to develop derivatives with improved pharmacological properties. In this work, we set out to study the anion-binding and transport properties of **1a** and related analogues, and to explore the implications of these activities on the cytotoxicity exhibited by these compounds.

Results and Discussion

Synthesis and anion-binding studies: Compounds **1a–c** were synthesized by using variations on reported procedures (Scheme 1).^[10] Briefly, acid-catalyzed condensation of indole–pyrrole aldehyde **6** with assorted pyrroles gave **1a** and analogues **1b** and **1c** in good yields. Small amounts of a symmetrical derivative **2** were also detected in the reaction mixtures. Prompted by this result, we investigated the treatment of aldehyde **6** under acidic conditions and observed formation of the tetraheterocyclic derivative **2** in good yield. Presumably, under these conditions, partial deformylation then condensation occurred, which led to the formation of the symmetrical coupling derivative **2**. It should be noted that the analogous dipyrrolyldipyrromethene derived from prodiginine precursors has been described in bacterial extracts.^[11] To evaluate the impact of the anion coordination and transport properties of the obatoclax analogues in the biological activity of these compounds we decided to prepare two new derivatives by the introduction of modifications on the NH groups. We reasoned that such variations could impact the anion binding and transport properties of

these compounds, yet retain structural similarity with **1a**. First, the *N*-Boc-protected (Boc = *tert*-butoxycarbonyl) derivative **3** was synthesized from *N*-Boc-protected aldehyde **5**. Compound **3** represents an obatoclax analogue with the NH group of the indole ring unavailable for anion coordination. Finally, boron-dipyrromethene (BODIPY) derivative **4** was prepared from **1a**. Compound **4** is a neutral derivative with no protonable groups. In this case, the dipyrromethene unit is not available for anion binding.

The first evidence of the ability of these compounds to interact with anions came from structural studies. Solid-state structures of **1a** (as the mesylate and chloride salts), **3**·HCl, and **4** were determined by single-crystal X-ray diffraction (Figure 1).

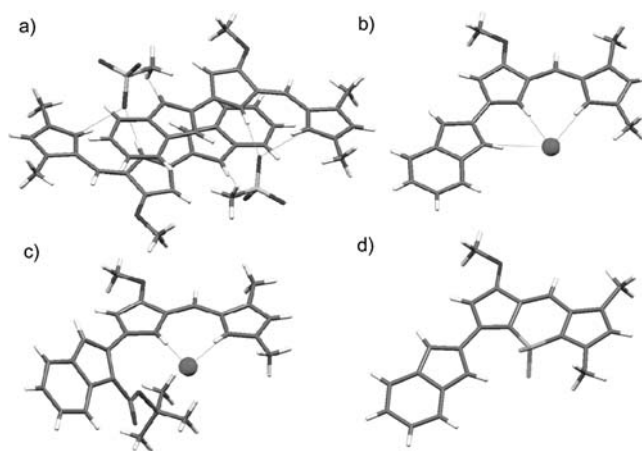


Figure 1. Representations of solid-state structures. a) **1a**·MeSO₃H, b) **1a**·HCl, c) **3**·HCl, d) **4**.

In the solid state, compound **1a**·MeSO₃H forms 2:2 stacked dimers (Figure 1 a). Each mesylate anion is coordinated to two molecules of **1a** through hydrogen bonds. One of the oxygen atoms was found to interact with the two NH groups of the dipyrromethene unit and other was coordinated to the indole NH group of the second molecule of **1a** (N–H···O distances = 2.86–2.94 Å). The tris-heterocyclic skeleton of **1a** is essentially flat and adopts a β conformation (the two pyrrole rings are in a relative *cis* disposition around the methine linkage) with the indole ring rotated

180°. The distance between the planes that contain the two receptors is 3.37 Å. The solid-state structure of **1a**·HCl (Figure 1b) consisted of 1:1 complexes. The tris-heterocyclic skeleton of **1a** is, again, essentially flat and adopts a β conformation, with the three NH groups oriented in the same direction and engaged in hydrogen bonds with the chloride anion (N–H···Cl distances = 3.17–3.18 Å). In compound **3**·HCl the chloride anion was also found to interact with the dipyrromethene unit through hydrogen bonds (N–H···Cl distances = 3.11–3.12 Å). The presence of the *N*-Boc group forces the indole group out of the plane defined by the dipyrromethene unit with a torsion angle of 41.7°. In the solid state, compound **4** also showed an essentially flat indolyldipyrromethene core with the indole group facing the boraindacene moiety.

We next studied the anion-binding properties of **1a** in solution, as a model compound. For biological studies, **1a** is generally employed as the mesylate salt. We studied the lability of this anion and the first indication came from extraction experiments. Treatment of a solution of **1a**·MeSO₃H in CH₂Cl₂ with a dilute aqueous solution of HCl resulted in formation of **1a**·HCl, whereas treatment of a solution of **1a**·HCl in CH₂Cl₂ with a dilute aqueous solution of methanesulfonic acid resulted in no change, even after several treatments. A titration experiment, monitored by ¹H NMR spectroscopy, of **1a**·MeSO₃H with tetra-*n*-butylammonium chloride (TBACl) in CDCl₃ revealed that the mesylate anion is readily displaced by chloride. Upon addition of TBACl the NH signals became broader and drifted downfield, with little change noticeable beyond the addition of 1 equiv of TBACl (Figure 2). The spectrum is virtually equivalent to that of **1a**·HCl. From these data, an apparent stability constant of 6140 M⁻¹ was determined by using the EQNMR computer program.^[12] All of these results suggest that the mesylate anion is likely displaced in biological environments. Treatment of protonated **1a**, either as the chloride or mesylate salt, with tetraethylammonium bicarbonate (TEAHCO₃) in CDCl₃ resulted in severe broadening of the

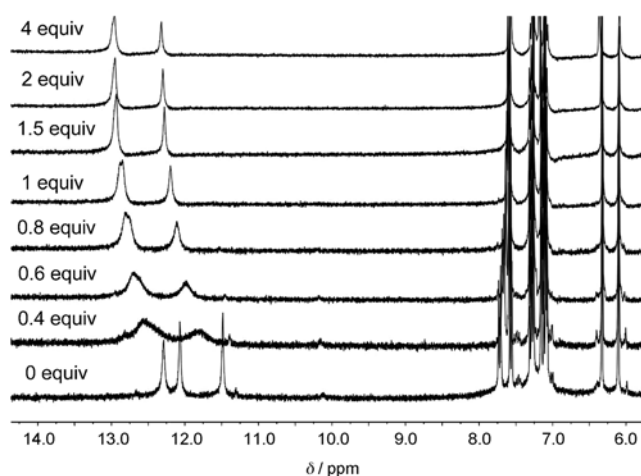


Figure 2. ¹H NMR spectra of **1a**·MeSO₃H in CDCl₃ (downfield region) upon addition of increasing amounts of TBACl.

peaks in the ¹H NMR spectrum, which precluded the calculation of an apparent stability constant. Moreover, formation of the neutral derivative **1a** by deprotonation of the compound was also observed. In the neutral form, **1a** can also interact with anions. Titration experiments of **1a** with TBACl and TEAHCO₃ in CD₃CN allowed the determination of stability constants of 42 and 96 M⁻¹ for chloride and bicarbonate, respectively. The affinity of **1a** for chloride is greatly reduced compared with the protonated form **1aH**⁺, which reflects the lack of attractive electrostatic interaction in the neutral receptor and the more competitive nature of the solvent used.

Further energetic and optimized geometric characteristics of the complexes were obtained by density functional theory (DFT) calculations (BP86/def2-QZVP). The binding energies were obtained by considering compound **1a** in its β conformation as our reference molecule. Therefore, all computed binding energies of complexes of **1a** with bicarbonate and chloride anions refer to its β conformation.^[3] Likewise, the binding energies of complexes of **1aH**⁺ with mesylate, bicarbonate, and chloride anions were computed by reference to **1aH**⁺ in its lowest-energy conformation, in accordance with Cole's DFT calculations on prodiginines.^[13] In other words, the conformation with the indole and terminal pyrrole rings rotated 180° relative to the central pyrrole ring (we dubbed this the γ conformation). At this time, we do not want to report a detailed conformational study of the receptors because the aim of this work is to study the formation of the complexes, regardless what the lowest-energy conformation of **1a** and **1aH**⁺ is. To our knowledge, these are the first theoretical calculations reported for complexes of prodiginines with anions.

We have systematically explored the formation of complexes of **1a** and **1aH**⁺ by consideration of different tautomers and conformers of the receptors that interact with the anions. We have computed four complexes of **1aH**⁺ (see the Supporting Information, Figure S17) and nine complexes of **1a** for every anion (see the Supporting Information, Figures S18 and S19). The largest interaction energies of these complexes are collected and presented in Table 1. First, we will analyze the complexes of **1aH**⁺ (Table 1, entries 1–3). It can be observed that the interaction energy of complex **1a**·HCl (Table 1, entry 2) is larger than that of complex **1a**·MeSO₃H (Table 1, entry 1), both in the gas phase and in

Table 1. Interaction energies in the gas phase (ΔE) and in aqueous solution (ΔE_{solv}) for several complexes of **1a** at the RI-BP86/def2-QZVP level of theory and stability constants (K_a) at 298 K with TBACl and TEAHCO₃ as the anion sources.

Entry	Compound	ΔE [kcal mol ⁻¹]	ΔE_{solv} [kcal mol ⁻¹]	K_a [M ⁻¹]
1	1a ·MeSO ₃ H	-102.2	-5.4	–
2	1a ·HCl	-113.1	-7.3	6140 ^[a]
3	1a ·H ₂ CO ₃	-113.3	-10.7	–
4	1a ·Cl ⁻	-27.5	+0.7 (-0.7) ^[b]	42 ^[b]
5	1a ·HCO ₃ ⁻	-26.9	-4.0 (-4.9) ^[b]	96 ^[b]

[a] CDCl₃ as the solvent. [b] CH₃CN as the solvent; see text for details.

water, in agreement with our titration experiment between **1a**·MeSO₃H and TBACl (Figure 2), in which MeSO₃[−] was displaced by Cl[−]. Both in the gas phase and aqueous solution, the β isomer is the most favored conformation for anion binding, with all three N–H bonds pointing at the anion (see Figure 3). This result is also in agreement with

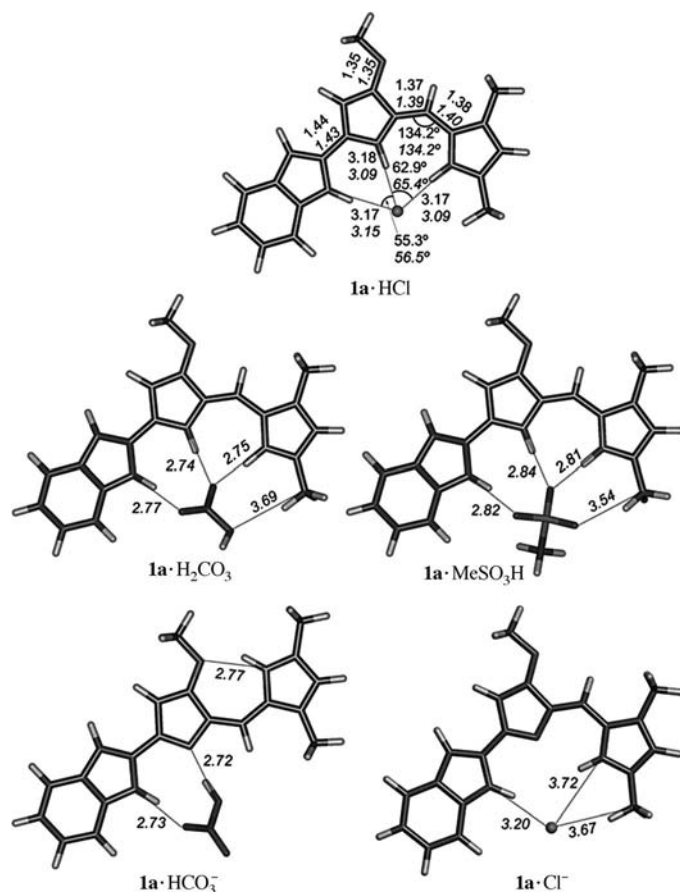


Figure 3. Top: Comparison of the **1a**·HCl optimized gas-phase geometry (italics) with the X-ray structure (plain). Rest: Optimized geometries of **1a** complexes with the largest interaction energies in water. Distances [Å], angles [°].

the correlations observed in the NOESY spectra of **1a**·HCl and **1a**·MeSO₃H in CD₃Cl (see the Supporting Information, Figures S5 and S6). The order of calculated interaction energies of protonated **1a** with anions was found to be HCO₃[−] > Cl[−] > MeSO₃[−]. Notably, proton abstraction to yield carbonic acid is not observed in solution for any of the calculated structures. A comparison of the optimized and experimental structures of complex **1a**·HCl supported the reliability of the theoretical level used in the analysis. In Figure 3 (top), we represent selected geometric features of the DFT solvent-free optimized complex **1a**·HCl and its crystal structure. From inspection of the results, first, we observe that both the bond lengths and angles in the optimized and experimental structures of **1a**·HCl are in excellent agreement. Second, the computed noncovalent distances between the

chloride anion and the receptor are marginally shorter than the experimental values. This result is unsurprising because, in general, the equilibrium distances of complexes are shorter in the gas phase than in the solid state due to packing forces. Particularly, the chloride anion participates in an additional noncovalent interaction with a hydrogen atom (2.521 Å) of a neighboring CH₂Cl₂ solvent molecule. We have chosen complex **1a**·HCl for comparison purposes rather than **1a**·MeSO₃H because the latter forms 2:2 stacked dimers in the solid state, which gives rise to a different geometrical array relative to the computed 1:1 structure (see Figures 1–3).

We also analyzed the complexes of **1a** with chloride and bicarbonate (Table 1, entries 4 and 5) and found the interaction energy for Cl[−] is slightly larger than that for HCO₃[−]. However, when water effects are taken into account the opposite is observed; in other words, the HCO₃[−] complex is much lower in energy (−4.0 kcal mol^{−1}) than the Cl[−] analogue. In fact, the interaction energy of **1a**·Cl[−] is slightly positive (+0.7 kcal mol^{−1}), which means that the formation of **1a**·Cl[−] complex is not favored in water. Nevertheless, because our experimental apparent-stability constants are measured in CD₃CN, we also carried out calculations for our complexes solvated in CH₃CN (Table 1, entries 4 and 5) for direct comparison with the experimental results. In this solvent, the interaction energies of complexes **1a**·Cl[−] and **1a**·HCO₃[−] are both favorable (−0.7 and −4.9 kcal mol^{−1}, respectively) and in good agreement with the experimental stability constants (42 and 96 M^{−1}, respectively). In aqueous solution, the so-called α isomer (with the terminal pyrrole ring rotated 180° relative to both the indole and central pyrrole fragments, see Figure 3 and the Supporting Information, Figure S18) is the most favored conformation for the **1a**·HCO₃[−] complex (−4.0 kcal mol^{−1}) by only 0.2 kcal mol^{−1} relative to its β counterpart, which leads to the assumption that both complexes are isoenergetic (in the gas phase the energy difference is approximately 10 kcal mol^{−1} in favor of the β conformer). The fact that **1a**·HCO₃[−] easily adopts the α conformation in water is most likely due to the formation of the intramolecular MeO⋯H–N hydrogen bond between the two pyrrole rings, which is stabilized by the polar aqueous media. Interestingly, formation of carbonic acid by proton abstraction is, again, not observed in aqueous solution.

Anion-transport studies: The anion-transport properties of **1–4** were assayed in 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) vesicles by using a chloride-selective electrode in accordance with previously reported procedures.^[14] Briefly, liposomes loaded with NaCl were suspended in an isotonic, chloride-free external medium. Chloride release promoted by **1–4** was monitored over time and at the end of the experiment the vesicles were lysed by the addition of detergent; the final electrode reading was used as 100% release of chloride. When the chloride-loaded vesicles were suspended in an external NaNO₃ solution almost quantitative chloride efflux was promoted by compounds **1a–c** at

very low concentrations (25 nM, 0.005 mol% carrier/lipid concentration, added as a solution in DMSO, see Figure 4). Under these conditions, lower activity was observed for **2** (less than 60% chloride efflux after 300 s) and **3** (less than 20% chloride efflux after 300 s). Compound **4** promoted no

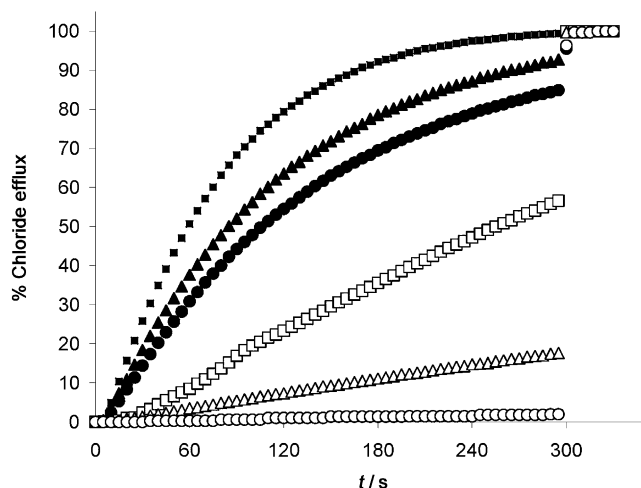


Figure 4. Chloride efflux promoted by **1–4** (25 nM, 0.005 mol% carrier/lipid concentration) in unilamellar POPC vesicles. Vesicles loaded with NaCl (476 mM) buffered at pH 7.2 dispersed in NaNO₃ (476 mM) buffered at pH 7.2 with phosphate (10 mM). Each trace represents the average of three trials. (▲**1a**, ■**1b**, ●**1c**, □**2**, △**3**, ○**4**).

significant chloride efflux. When the vesicles were suspended in an external medium composed of sodium sulfate, addition of **1–4** resulted in a very limited chloride efflux. Addition of an external pulse of NaHCO₃ in these assays resulted in a switch-on of the chloride release. The results obtained for carrier loadings of 250 nM (0.05 mol% carrier/lipid concentration, added as a solution in DMSO) are shown in Figure 5. Compound **1b** was the most active in this assay, whereas compound **4** promoted no significant chloride efflux. Because chloride and bicarbonate are the most abundant anions in physiological fluids, this result is more significant for biological applications. Hill analyses were performed for the chloride efflux observed under these conditions and the EC₅₀ values (concentration needed to obtain 50% of chloride release after 290 s) are summarized in Table 2 (see the Supporting Information, Figures S23–S27 for details).^[15] The results observed in the liposome assays are consistent with a dominant anion-exchange mechanism for the facilitated chloride efflux from the liposomes under these conditions. The nature of the external anion impacted dramatically the rate of chloride efflux promoted by these compounds. The relatively higher hydrophilicity of bicarbonate compared with nitrate resulted in lower chloride efflux at higher carrier loadings. In both cases the observed activity order is **1b** > **1a** > **1c** > **2** > **3** > **4**.

Direct evidence of bicarbonate transport mediated by these compounds was obtained from ¹³C NMR spectroscopy experiments (see Figure 6 and the Supporting Information).^[16] First, POPC liposomes filled with NaH¹³CO₃ were

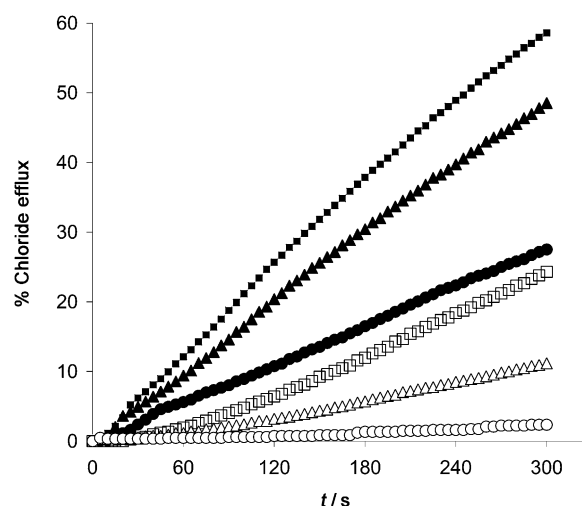


Figure 5. Chloride efflux promoted by **1–4** (250 nM, 0.05 mol% carrier/lipid concentration) in unilamellar POPC vesicles. Vesicles loaded with NaCl (451 mM) buffered at pH 7.2 with phosphate (20 mM) dispersed in Na₂SO₄ (150 mM) buffered at pH 7.2 upon addition of a NaHCO₃ pulse to make the extravesicular bicarbonate concentration 40 mM. Each trace represents the average of three trials. (▲**1a**, ■**1b**, ●**1c**, □**2**, △**3**, ○**4**).

Table 2. IC₅₀ values of compounds **1–3** obtained from MTT assay on the GLC4 cell line at 24, 48, and 72 h exposure time. Results depicted represent a mean of three independent experiments with standard deviation. EC₅₀ values (concentration needed to achieve 50% of chloride efflux after 290 s) of compounds **1–3** for the bicarbonate antiport process.

Compound	IC ₅₀ [μM]			EC ₅₀ [μM]
	24 h	48 h	72 h	
1a	1.61 ± 0.15	0.25 ± 0.54	0.13 ± 0.10	0.28 ± 0.01
1b	1.02 ± 0.21	0.29 ± 0.07	0.23 ± 0.06	0.18 ± 0.02
1c	0.96 ± 0.05	0.42 ± 0.19	0.32 ± 0.02	0.75 ± 0.04
2	0.97 ± 0.12	0.60 ± 0.05	0.61 ± 0.13	2.10 ± 0.25
3	–	2.01 ± 1.08	1.68 ± 0.11	18.90 ± 3.13

suspended in a solution of Na₂SO₄ in water. Two ¹³C NMR signals that corresponded to intravesicular and extravesicular H¹³CO₃[–] could be observed (Figure 6a). Bicarbonate efflux from the interior of the vesicles occurred after addition of an external pulse of NaCl, and a DMSO solution of the carrier in the case of active anionophore **1b**. This event is reflected by the disappearance of the broad signal that corresponds to encapsulated H¹³CO₃[–], with only a sharp signal for extravesicular H¹³CO₃[–] appearing in the ¹³C NMR spectrum (Figure 6b, left). Little change in the ¹³C NMR spectrum was observed when inactive carrier molecule **4** was added (Figure 6b, right). Addition of paramagnetic Mn²⁺ resulted in broadening of the extravesicular H¹³CO₃[–] signal, whereas the encapsulated bicarbonate signal was not affected because Mn²⁺ cannot cross the lipid bilayer. Thus, only the sharp signal is erased in the case of vesicles treated with **4** (Figure 6c, right) and the broad signal for the encapsulated H¹³CO₃[–] remained clearly visible. In the case of **1b** (Figure 6c, left) the signal is broadened to the baseline. The

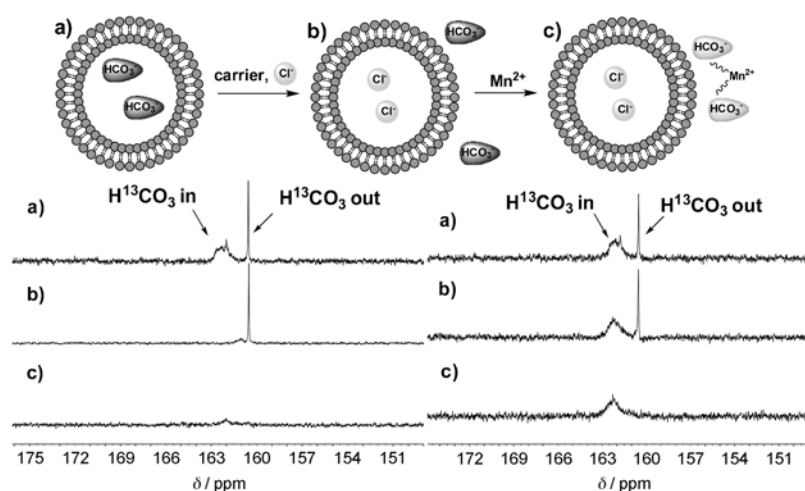


Figure 6. ^{13}C NMR spectra evidencing the facilitated bicarbonate/chloride exchange. a) POPC vesicles loaded with $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ (500 mM) dispersed in Na_2SO_4 (162 mM) buffered at pH 7.2 with phosphate (20 mM). b) After addition of NaCl (50 mM) and **1b** (left) or **4** (right) ($119\ \mu\text{M}$, 0.16 mol% carrier/lipid concentration). c) After addition of MnCl_2 (0.5 mM), a paramagnetic reagent affecting only extravesicular $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ anions.

assay described for compound **4** also served as a control experiment for the leakage of bicarbonate upon addition of a chloride pulse or for unspecific detergent effects. Similar results to those described in the case of **1b** were observed for **1a**, whereas addition of **3** resulted in moderate bicarbonate efflux under the same conditions, which reflected the poorer anion exchange activity displayed by this compound.

The anion-transport assays revealed that compounds **1a–c** are able to function as efficient anion carriers. Varying the number of hydrogen-bond donors, as in **2** and **3**, resulted in diminished transport activity. Compound **4** did not function as anion carrier.

In vitro studies: The *in vitro* ionophoric activity of compounds **1–4** on SCLC cell line GLC4 was studied by vital staining with acridine orange (AO). This cell-permeable dye accumulates in acidic compartments such as lysosomes and exhibits a characteristic orange fluorescence emission as a result of its protonation, or green fluorescence at higher pH.^[17] When GLC4 cells were stained with AO, granular orange fluorescence was observed in the cytoplasm (Figure 7a), suggestive of acidified lysosomes. The cells were treated with compounds **1–4** (800 nM concentrations) for 1 h and representative results are shown in Figure 7. Cells treated with compounds **1a** and **3** showed a complete disappearance of the orange emission (Figure 7b and c). Similar results were obtained with **1b**, **1c**, and **2**. On the other hand, cells treated with **4** showed no changes (Figure 7d). These results correlate well with the activity observed in the liposome assays. Only active anionophores induce an increase in the lysosomal pH, whereas the inactive carrier **4** did not affect intracellular pH. Based on the results obtained in the liposome assays, facilitated influx of bicarbonate to the interior of the lysosomes could be proposed as the mechanism responsible for the increase of the internal pH, although other mechanisms cannot be ruled out.

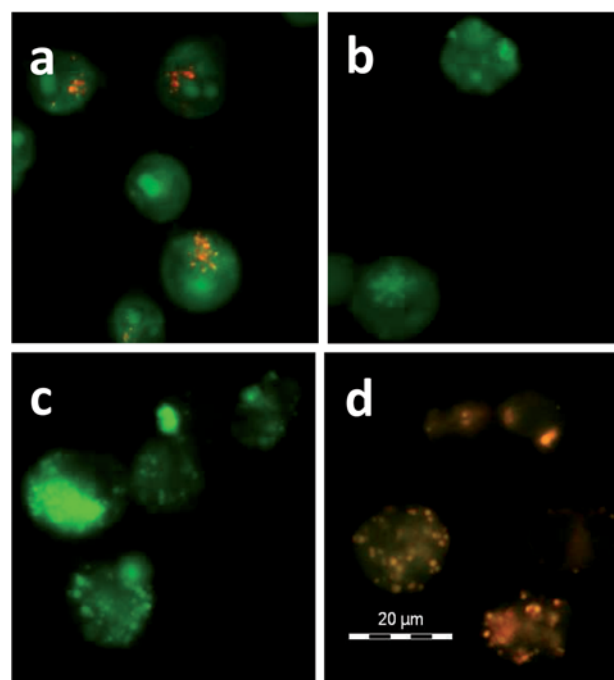


Figure 7. AO staining of the GLC4 cell line after 1 h exposure to the indicated compounds at 800 nM concentration. a) Untreated cells (control). b) Cells treated with **1a**. c) Cells treated with **3**. d) Cells treated with **4**. a), d) Cells showed granular orange fluorescence in the cytoplasm. b), c) Cells showed complete disappearance of orange fluorescence on the cytoplasm granules

$0.10\ \mu\text{M}$. Compound **3** displayed a significantly reduced toxicity relative to **1a–c**, with an IC_{50} value of $1.68 \pm 0.11\ \mu\text{M}$ at 72 h, and compound **4** is a non-cytotoxic derivative. These results correlate well with the activity as anion exchangers studied in liposomes (Table 2, EC_{50} values). The most active anionophores **1a–c** are the most potent derivatives, whereas cytotoxicity diminished in the case of **2** and **3**, as did activity

The *in vitro* cytotoxic activity of compounds **1–4** was tested on the GLC4 cell line. We used this cell line as a model due to the proven usefulness of **1a** in the treatment of this condition. Dose–response curves for compounds **1–4** in the 72 h viability assay in GLC4 cells are shown in Figure 8. IC_{50} values obtained from 24, 48, and 72 h viability assays are presented in Table 2. Hoechst staining revealed apoptosis as the cell-death mechanism, in agreement with the reported activity of these derivatives (see the Supporting Information). In the 72 h assay, the most active compound was **1a** with an IC_{50} value of $0.13 \pm$

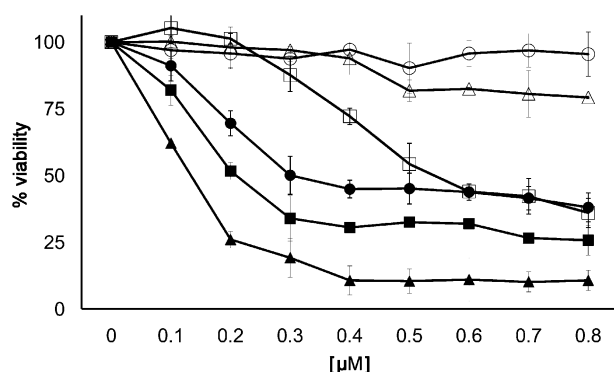


Figure 8. Dose–response curves for compounds **1–4** on the viability of GLC4 cell line. The results are the mean \pm SEM for three independent experiments and are expressed as % viability compared with control. Error bars represent the standard deviation. (\blacktriangle **1a**, \blacksquare **1b**, \bullet **1c**, \square **2**, \triangle **3**, \circ **4**).

in the anion-transport assays. Compound **4** was found to be inactive in these assays and displayed no cytotoxicity. The compounds studied showed no marked toxicity on nonmalignant HaCaT cells at IC_{50} concentrations.

Conclusion

In this study we have investigated the anion-binding properties of obatoclax (**1a**) by using DFT calculations, as well as solution and structural studies. This compound is well suited to interact with anions through hydrogen bonds and preferentially adopts a β conformation. Compound **1a** and related analogues **1b** and **1c** are highly active anionophores capable of promoting chloride and bicarbonate (and nitrate) transport in model phospholipid liposomes. Manipulation of these compounds by variation of the number of hydrogen-bond donors resulted in diminished anion-carrier ability. The anionophoric activity correlated well with the results observed in the in vitro studies. Active anion carriers are able to discharge pH gradients in living cells and the most active anionophores were found to be the most potent cytotoxic derivatives. Inactive, yet structurally very related molecules (such as compound **4**), did not show cytotoxicity against the GLC4 cell line. These findings led us to suggest that anion transport plays a relevant role in the mechanism of action of these compounds. Thus, development of new derivatives with improved anion-transport abilities could lead to new drugs with improved pharmacological properties. In this regard, the straightforward liposome assays could be useful for the screening of new candidates. Efforts in these directions are currently underway in our laboratories.

Experimental Section

General procedures and methods: Commercial reagents were used as received without any further purification. NMR spectra were recorded on

Varian Mercury 300 MHz and Varian Unity Inova 400 MHz spectrometers. Chemical shifts (δ) are reported in ppm, referenced to the residual solvent peak; coupling constants (J) are reported in Hz. HRMS were recorded on a Micromass Autospec S-2 spectrometer by using the electrospray ionization technique at 70 eV. Microwave reactions were performed in a Biotage Initiator 2.0 microwave. Compound **5** was prepared as described.^[10]

Compound 6: Compound **5** (0.15 g, 0.44 mmol) was suspended in water (18 mL). The mixture was heated at 170°C for 35 min under MW irradiation. Once cold, the solid was filtered off and washed with water to afford **6** (0.096 g, 91%) as a greenish powder. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 11.86 (s, 1H; NH), 11.46 (s, 1H; NH), 9.42 (s, 1H; CHO), 7.53 (d, J = 6.9 Hz, 1H; ArH), 7.39 (d, J = 6.9 Hz, 1H; ArH), 7.13 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 7.01 (t, J = 6.9 Hz, 1H; ArH), 6.55 (s, 1H), 3.88 ppm (s, 3H; OCH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): δ = 173.12, 158.14, 136.80, 131.84, 129.47, 128.12 (CH), 122.44 (CH), 120.44 (CH), 119.79 (CH), 118.63 (CH), 111.31 (CH), 100.69, 93.28, 57.97 ppm (CH_3).

Compound 1a-HCl: Under an inert atmosphere, **6** (0.1 g, 0.42 mmol) was dissolved in methanol (5 mL), then 2,4-dimethylpyrrole (86 μL , 0.83 mmol) was added, followed by dropwise addition of a solution of HCl in methanol (1.25 M, 0.66 mL). The color changed to dark purple and the mixture was stirred overnight. The solid formed was filtered off and washed with cold methanol (1 mL) to afford **1a-HCl** (0.137 g, 93%) as a dark-purple crystalline solid. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 12.89 (s, 1H; NH), 12.82 (s, 1H; NH), 12.26 (s, 1H; NH), 7.57 (d, J = 7.2 Hz, 1H; ArH), 7.53 (d, J = 7.2 Hz, 1H; ArH), 7.29 (t, J = 7.2 Hz, 1H; ArH), 7.08 (t, J = 7.2 Hz, 1H; ArH), 7.07 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 6.24 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 3.97 (s, 3H; OCH_3), 2.60 (s, 3H; CH_3), 2.28 ppm (s, 3H; CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 164.89, 150.39, 146.21, 142.50, 138.80, 127.81, 127.03, 125.54, 125.41 (CH), 121.31 (CH), 120.69 (CH), 119.72, 115.67 (CH), 114.67 (CH), 112.50 (CH), 108.77 (CH), 94.01 (CH), 58.64 (OCH_3), 14.10 (CH_3), 11.96 ppm (CH_3); HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}$: 317.15; found: 317.15.

Compound 1a-MeSO₃H: Compound **1a-MeSO₃H** was obtained as described for **1a-HCl** by using methanesulfonic acid as a catalyst to afford **1a-MeSO₃H** (0.142 g, 82%) as a dark-purple crystalline solid. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 12.23 (s, 1H; NH), 11.98 (s, 1H; NH), 11.43 (s, 1H; NH), 7.69 (d, J = 8.3 Hz, 1H; ArH), 7.52 (d, J = 8.0 Hz, 1H; ArH), 7.26 (t, J = 5.7 Hz, 1H; ArH), 7.13 (s, 1H), 7.05 (t, J = 7.2 Hz, 1H; ArH), 7.01 (s, 1H), 6.31 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.08 (s, 1H), 4.01 (s, 3H; OCH_3), 2.97 (s, 3H; SCH_3), 2.62 (s, 3H; CH_3), 2.29 ppm (s, 3H; CH_3).

Compound 1a: Compound **1a-HCl** (0.040 g, 0.11 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (20 mL). The solution was treated with a 1% aqueous solution of NaOH (30 mL) and the color changed from deep red to orange. The organic phase was dried over anhydrous Na_2SO_4 and the solvent was removed under reduced pressure. Compound **1a** (0.035 g, 98%) was obtained as an orange solid. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 12.05 (s, 1H; NH), 7.49 (d, J = 8.1 Hz, 1H; ArH), 7.11 (s, 1H), 7.02 (t, J = 8.1 Hz, 1H; ArH), 6.93 (t, J = 8.1 Hz, 1H; ArH), 6.90 (s, 1H), 6.77 (d, J = 8.1 Hz, 1H; ArH), 6.34 (s, 1H), 5.67 (s, 1H), 4.08 (s, 3H; OCH_3), 2.17 (s, 3H; CH_3), 1.78 ppm (s, 3H; CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 168.87, 158.55, 140.97, 137.75, 136.30, 133.98, 133.82, 128.43, 126.71, 123.31 (CH), 120.76 (CH), 119.52 (CH), 115.67 (CH), 112.61 (CH), 111.49 (CH), 104.68 (CH), 96.01 (CH), 58.57 (OCH_3), 12.15 (CH_3), 11.44 ppm (CH_3); HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}$: 317.1528; found: 317.1539.

Compound 1b-HCl: Compound **1b-HCl** was prepared as described for **1a-HCl**, from **6** (0.1 g, 0.42 mmol), 2,4-dimethyl-3-ethylpyrrole (112 μL , 0.83 mmol), and a solution of HCl in methanol (1.25 M, 0.66 mL). Compound **1b-HCl** (0.130 g, 82%) was obtained as a dark-purple solid. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ = 12.93 (s, 1H; NH), 12.83 (s, 1H; NH), 12.26 (s, 1H; NH), 7.58 (d, J = 7.5 Hz, 1H; ArH), 7.56 (d, J = 7.5 Hz, 1H; ArH), 7.28 (t, J = 7.5 Hz, 1H; ArH), 7.09 (t, J = 7.5 Hz, 1H; ArH), 7.08 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.28 (s, 1H), 4.00 (s, 3H; OCH_3), 2.60 (s, 3H; CH_3), 2.41 (q, J = 7.8 Hz, 2H; CH_2), 2.23 (s, 3H; CH_3), 1.08 ppm (t, J = 7.8 Hz, 3H; CH_3); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 164.39, 150.27, 145.18, 139.43, 138.74, 129.44, 127.86, 127.35, 125.29, 125.20 (CH), 121.19 (CH), 120.66 (CH), 119.29, 114.39 (CH), 112.60 (CH), 108.05 (CH), 93.88 (CH), 58.59

(OCH₃), 17.21 (CH₂), 14.57 (CH₃), 12.51 (CH₃), 9.88 ppm (CH₃); HRMS (EI): *m/z* calcd for C₂₂H₂₃N₃O: 345.1841; found: 345.1823.

Compound 1c-HCl: Compound **1c-HCl** was prepared as described for **1a-HCl** from **6** (0.1 g, 0.42 mmol), 4,5,6,7-tetrahydroindole (0.101 g, 0.83 mmol), and a solution of HCl in methanol (1.25 M, 0.66 mL). Compound **1c-HCl** (0.035 g, 22%) was obtained as a dark-purple solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 13.09 (s, 1H; NH), 12.95 (s, 1H; NH), 7.60 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H; ArH), 7.31 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H; ArH), 7.15 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H; ArH), 7.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H; ArH), 7.06 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.29 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 4.02 (s, 3H; OCH₃), 3.04 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H; CH₂) 2.56 (t, *J* = 6.0 Hz, 3H; CH₃), 1.82 ppm (m, 4H; 2 × CH₂); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 165.23, 152.04, 146.89, 139.08, 128.51 (CH), 127.86, 127.03, 126.75, 126.03, 125.75 (CH), 121.40 (CH), 120.90 (CH), 120.66, 117.97 (CH), 112.81 (CH), 109.16 (CH), 94.09 (CH), 58.77 (OCH₃), 24.17 (CH₂), 22.92 (CH₂), 22.57 (CH₂), 22.12 ppm (CH₂); HRMS (EI): *m/z* calcd for C₂₂H₂₁N₃O: 343.17; found: 343.46.

Compound 2-HCl: Under an inert atmosphere, **6** (0.03 g, 0.12 mmol) was dissolved in methanol (1.5 mL) and a solution of HCl in methanol (1.25 M, 0.20 mL) was added dropwise. The color changed to dark blue and the mixture was stirred for 48 h. The solid formed was filtered off and washed with cold methanol (1 mL) to afford compound **2-HCl** (0.028 g, 95%) as a deep-blue solid. ¹H NMR (300 MHz, [D₆]DMSO): δ = 12.82 (s, 2H; NH), 12.02 (s, 2H; NH), 7.79 (s, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H; ArH), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H; ArH), 7.28 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H; ArH), 7.13 (s, 1H), 7.12 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H; ArH), 6.88 (s, 1H), 4.03 ppm (s, 3H; OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, [D₆]DMSO): δ = 163.71, 143.38, 138.17, 127.97, 127.73, 124.83, 121.53 (CH), 120.67 (CH), 118.24 (CH), 111.78 (CH), 109.73 (CH), 107.22 (CH), 95.17 (CH), 59.05 ppm (CH₃); HRMS (EI): *m/z* calcd for C₂₇H₂₂N₄O₂: 434.1743; found: 434.1755.

Compound 3-HCl: Under an inert atmosphere, **5** (0.1 g, 0.29 mmol) was dissolved in methanol (5 mL), 2,4-Dimethylpyrrole (51 μL, 0.50 mmol) was added, followed by dropwise addition of a solution of HCl in methanol (1.25 M, 0.40 mL). The color changed to dark red and the mixture was stirred for 2 h. The solvent was removed and the solid obtained was washed with acetone (3 mL) and filtered to afford **3-HCl** (0.103 g, 77%) as a dark-purple solid. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 12.90 (s, 1H; NH), 12.34 (s, 1H; NH), 8.11 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H; ArH), 7.70 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H; ArH), 7.38 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H; ArH), 7.26 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H; ArH), 6.13 (s, 1H), 6.04 (s, 1H), 4.00 (s, 3H; OCH₃), 2.62 (s, 3H; CH₃), 2.34 (s, 3H; CH₃), 1.59 ppm (s, 9H; (CH₃)₃); ¹³C NMR (75 MHz, [D₆]DMSO): δ = 164.60, 153.65, 148.73, 146.03, 145.73, 137.89, 128.64, 128.03, 126.96 (CH), 126.35, 123.84 (CH), 122.07 (CH), 118.75, 117.47 (CH), 117.17 (CH), 116.06 (CH), 115.19 (CH), 98.32 (CH), 84.75, 59.48 (OCH₃), 27.38 ((CH₃)₃), 13.99 (CH₃), 11.72 ppm (CH₃); HRMS (EI): *m/z* calcd for C₂₅H₂₇N₃O₃: 417.2052; found: 417.2054.

Compound 4: Compound **1a-HCl** (0.05 g, 0.14 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (8 mL) and placed in an ice bath. Et₃N (145 μL, 1.04 mmol) was added dropwise. After 5 min, BF₃·OEt₂ (153 μL, 1.04 mmol) was added dropwise. The mixture was stirred for 48 h at RT. The organic solution was washed with water and the organic residue chromatographed (SiO₂, CH₂Cl₂) to afford **4** (32 mg, 62%) as a purple solid. *R*_f = 0.9 (CH₂Cl₂); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 10.20 (s, 1H; NH), 7.62 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H; ArH), 7.50 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H; ArH), 7.28 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H; ArH), 7.17 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 7.12 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H; ArH), 6.32 (s,

1H), 6.08 (s, 1H), 3.97 (s, 3H; OCH₃), 2.59 (s, 3H; CH₃), 2.25 ppm (s, 3H; CH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 162.40, 153.66, 147.53, 138.79, 138.24, 132.07, 129.08, 127.82, 126.61, 124.61 (CH), 121.15 (CH), 120.57 (CH), 118.42 (CH), 116.45 (CH), 112.13 (CH), 108.48 (CH), 97.97 (CH), 58.39 (OCH₃), 14.72 (CH₃), 11.21 ppm (CH₃); HRMS (EI): *m/z* calcd for C₂₀H₁₈BF₂N₃O: 365.1511; found: 365.1522.

Single-crystal X-ray diffraction analysis: Single crystals of **1a-HCl**, **3-HCl**, and **4** were coated in high-vacuum grease and mounted on a glass fiber. X-ray measurements were made with a Bruker SMART CCD area-detector diffractometer with MoK_α radiation (λ = 0.71073 Å), beam size 0.5 mm. Intensities were integrated from several series of exposures, each covering 0.3° in ω, a hemisphere of data were recorded. For **1a-MeSO₃H** data were collected on a Bruker Nonius KappaCCD APEXII diffractometer mounted at the window of a Molybdenum rotating anode (λ (MoK_α) = 0.71073 Å). φ and ω scans were carried out to fill the asymmetric unit. Data collection and processing were carried out by using the programs COLLECT^[18] and DENZO^[19]. Absorption corrections for all samples were applied, based on multiple and symmetry-equivalent measurements by using the program SADABS.^[20,21] The structures were solved by direct methods and refined by least squares on weighted F₂ values for all reflections.^[22] All non-hydrogen atoms were assigned anisotropic displacement parameters and refined without positional constraints. All hydrogen atoms were constrained to ideal geometries and refined with fixed isotropic-displacement parameters. Refinement proceeded smoothly to give the residuals shown in Table 3. Complex neutral-atom scattering factors were used.^[23] For **3**, thermal parameters and geometrical restraints were applied to the disordered solvent. Hydrogen atoms of the NH groups were freely refined. CCDC-825757 (**1a-HCl**), CCDC-825755 (**1a-MeSO₃H**), CCDC-825758 (**3-HCl**), and CCDC-825756 (**4**) contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.

Computational methods: The geometries of the complexes studied in this report were optimized without any symmetry constraints. In these calculations we used the BP86 density functional^[24,25] in conjunction with the Ahlrichs quadruple-ζ plus polarization (def2-QZVP) basis sets^[26] for all atoms. The reported BP86 calculations were carried out at the resolution of the identity (RI) level. Therefore, we have used the parallel RI-DFT methodology,^[27,28] which uses an auxiliary fitting basis^[29] to avoid treating the complete set of two-electron repulsion integrals, thus speeding up the

Table 3. Selected crystal-structure data for **1a-HCl**, **1a-MeSO₃H**, **3**, and **4**.

Compound	1a-HCl	1a-MeSO₃H	3-HCl	4
Chemical formula	C _{20.5} H ₂₁ Cl ₂ N ₃ O	C ₂₁ H ₂₃ N ₃ O ₄ S	C ₂₅ H ₂₆ N ₃ O ₃ ·0.25(C ₄ H ₁₀ O)·Cl	C ₂₀ H ₁₈ BF ₂ N ₃ O
Formula mass	396.30	413.48	472.48	365.18
Crystal size [mm]	0.50 × 0.10 × 0.10	0.10 × 0.04 × 0.01	0.55 × 0.40 × 0.20	0.20 × 0.10 × 0.10
Crystal system	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
<i>a</i> [Å ⁻¹]	25.684(4)	12.3961(8)	29.642(9)	12.591 (3)
<i>b</i> [Å ⁻¹]	7.9002(13)	7.7364(4)	11.438(3)	8.2840 (19)
<i>c</i> [Å ⁻¹]	23.340(4)	20.6776(13)	15.641(5)	16.546 (4)
β [°]	121.753(3)	95.977(3)	90.273(6)	96.960 (4)°
Unit cell volume [Å ³]	121.753(3)	1972.2(2)	5303(3)	1713.1 (7)
<i>T</i> [K]	298	120(2)	298	298
Space group	<i>C2/c</i>	<i>P2₁/n</i>	<i>C2/c</i>	<i>P2₁/c</i>
<i>Z</i>	8	4	8	4
No. of reflections measured	19156	18440	25594	15956
No. of independent reflections	3550	3461	4667	2994
<i>R</i> _{int}	0.232	0.1518	0.071	0.0664
Final <i>R</i> _i values (<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>))	0.0892	0.1347	0.0748	0.0458
Final <i>wR</i> (<i>F</i> ²) values (<i>I</i> > 2σ(<i>I</i>))	0.2107	0.2175	0.2064	0.1241
Final <i>R</i> _i values (all data)	0.1458	0.2243	0.1147	0.0557
Final <i>wR</i> (<i>F</i> ²) values (all data)	0.2455	0.2570	0.2374	0.1441

calculations significantly. We computed the interaction energy for each complex by subtracting the total energy of the optimized reference monomers from the total energy of the complex in the optimized geometry. The environment effects (with water as solvent) were taken into account by the COSMO³⁰ continuum solvation model. For all compounds we have carried out geometry optimization in water at the RI-BP86/def2-QZVP level. All calculations were performed using the TURBOMOLE program, version 6.1.³¹

Cell culture materials and methods: Human SCLC cell line GLC4 were cultured in RPMI 1640 medium (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 U mL⁻¹), streptomycin (100 µg mL⁻¹)—all from GIBCO BRL, Paisley, UK—and L-glutamine (2 mM, Sigma Chemicals Co, St Louis, MO, USA) at 37 °C under 5% CO₂ in air.

Vital fluorescence microscopy: The living cultured cells were stained with acridine orange (AO).³² Briefly, cells on a chamber slide were incubated in the presence (800 nm) and absence of **1–4** in RPMI supplemented with 10% FBS at 37 °C for 15 min–1 h. After three washes with phosphate buffered saline (PBS), the cells were incubated with AO (5 µg mL⁻¹) in PBS for 30 min. The chamber slides were washed with PBS solution supplemented with 10% FBS (×3) and then examined with a Nikon microscope (E800) and photographed with a Diagnostic Instruments photo automat system (Spot JR).

Cell viability assay: Cell viability was determined by the MTT assay.³³ Briefly, 20 × 10³ cells were incubated in 96-well microtiter cell-culture plates, in the absence (control cells) or presence (100–800 nm) of **1–4** in a final volume of 100 µL. After 24, 48, and 72 h incubation, a solution of MTT in PBS (10 mM) of was added to each well for an additional 4 h. The blue MTT formazan precipitate was dissolved in 24:1 isopropanol/1 N HCl (100 µL) and the absorbance at 570 nm was measured on a multi-well plate reader. Cell viability was expressed as a percentage of control. Data are shown as the mean value (standard error of the mean (SEM), n = 6) of triplicate cultures.

Acknowledgements

The authors thank Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (project BU005B09) and the MICINN of Spain (project CTQ2009–12631-BQU and project CTQ2008–00841/BQU, FEDER funds) for financial support. This work has been partially supported by a grant from the Spanish government (FIS) and the European Union (PI10/00338, R.P.T.). We thank CONSOLIDER-Ingenio2010 (CSD2010–0065) and the CESCA for computational facilities. D.Q. and R.Q. thank the MICINN of Spain for a “Ramón y Cajal” contract. We also thank Marta Mansilla and Dr. Jacinto Delgado (SCAI-Universidad de Burgos) for the X-ray structure of compound **4**. We thank the reviewers for helpful comments.

- [1] For reviews see: a) A. P. Davis, D. N. Sheppard, B. D. Smith, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 348; b) J. T. Davis, O. A. Okunola, R. Quesada, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3843; c) P. A. Gale, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 216; d) G. W. Gokel, N. Barkey, *New J. Chem.* **2009**, 33, 947. For recent examples, see: e) R. E. Dawson, A. Hennig, D. P. Weimann, D. Emery, V. Ravikumar, J. Montenegro, T. Takeuchi, S. Gabutti, M. Mayor, J. Mareda, C. A. Schalley, S. Matile, *Nature Chem.* **2010**, 2, 533; f) A. Hennig, L. Fischer, G. Guichard, S. Matile, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 16889; g) J. Mareda, S. Matile, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 28; h) S. Hussain, P. R. Brotherhood, L. W. Judd, A. P. Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 1614.
- [2] a) R. Pajewski, R. Garcia-Medina, S. L. Brody, W. M. Leevy, P. H. Schlesinger, G. W. Gokel, *Chem. Commun.* **2006**, 329; b) X. Li, B. Shen, X.-Q. Yao, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 7264; c) X. Li, B. Shen, X.-Q. Yao, D. Yang, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 13676; d) P. Iglesias-Hernández, D. Moreno, A. Araujo Javier, T. Torroba, R. Pérez-Tomás, R. Quesada, *Chem. Commun.* **2012**, DOI: 10.1039/C1CC11300C.
- [3] J. T. Davis, *Top. Heterocycl. Chem.* **2010**, 24, 145.
- [4] A. Fürstner, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 320; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 308.
- [5] a) N. R. Williamson, P. C. Fineran, F. J. Leeper, G. P. C. Salmond, *Nature Rev. Microbiol.* **2006**, 4, 887; b) N. R. Williamson, P. C. Fineran, T. Gristwood, S. R. Chawrai, F. J. Leeper, G. P. C. Salmond, *Future Microbiol.* **2007**, 2, 605; c) M. S. Melvin, M. W. Calcutt, R. E. Noftle, R. A. Manderville, *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, 15, 742; d) R. Pérez-Tomás, B. Montaner, E. Llagostera, V. Soto-Cerrato, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 66, 1447.
- [6] J. L. Sessler, L. R. Eller, W.-S. Cho, S. Nicolaou, A. Aguilar, J. T. Lee, V. M. Lynch, D. J. Magda, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 6143; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 5989.
- [7] a) R. Pandey, R. Chander, K. B. Sainis, *Curr. Pharm. Des.* **2009**, 15, 732; b) R. Pérez-Tomás, M. Viñas, *Curr. Med. Chem.* **2010**, 17, 2222.
- [8] M. Nguyen, R. C. Marcellus, A. Roulston, M. Watson, L. Serfass, S. R. M. Madiraju, D. Goulet, J. Viallet, L. Bélec, X. Billot, S. Acoca, E. Purisima, A. Wiegman, L. Cluse, R. W. Johnstone, P. Beauparlant and G. C. Shore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 19512.
- [9] a) M. Konopleva, J. Watt, R. Contractor, T. Tsao, D. Harris, Z. Estrov, W. Bornmann, H. Kantarjian, J. Viallet, I. Samudio, M. Andreeff, *Cancer Res.* **2008**, 68, 3413; b) R. L. Smoot, B. R. A. Blechacz, N. W. Werneburg, S. F. Bronk, F. A. Sinicropo, A. E. Sirica, G. J. Gores, *Cancer Res.* **2010**, 70, 1960.
- [10] K. Dairi, Y. Yao, M. Faley, S. Tripathy, E. Rioux, X. Billot, D. Rabouin, G. Gonzalez, J.-F. Lavallée, G. Attardo, *Org. Process Res. Dev.* **2007**, 11, 1051.
- [11] H. H. Wasserman, D. J. Friedland, D. A. Morrison, *Tetrahedron Lett.* **1968**, 9, 641.
- [12] M. J. Hynes, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, 311.
- [13] K. Chen, N. S. Rannulu, Y. Cai, P. Lane, A. L. Liebl, B. B. Rees, C. Corre, G. L. Challis, R. B. Cole, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, 19, 1856–1866.
- [14] a) B. A. McNally, A. V. Koulov, T. N. Lambert, B. D. Smith, J.-B. Joos, A. L. Sisson, J. P. Clare, V. Sgarlata, L. W. Judd, G. Magro, A. P. Davis, *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 9599; b) P. A. Gale, C. Tong, C. J. E. Haynes, O. Adeosun, D. E. Gross, E. Karnas, E. M. Sedenberg, R. Quesada, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 3240.
- [15] S. Bhosale, S. Matile, *Chirality* **2006**, 18, 849.
- [16] a) J. T. Davis, P. A. Gale, O. A. Okunola, P. Prados, J. C. Iglesias-Sanchez, T. Torroba, R. Quesada, *Nature Chem.* **2009**, 1, 138; b) N. Busschaert, P. A. Gale, C. J. E. Haynes, M. E. Light, S. J. Moore, C. C. Tong, J. T. Davis, W. A. Harrell Jr., *Chem. Commun.* **2010**, 46, 6252; c) N. J. Andrews, C. J. E. Haynes, M. E. Light, S. J. Moore, C. C. Tong, J. T. Davis, W. A. Harrell, Jr., P. A. Gale, *Chem. Sci.* **2011**, 2, 256.
- [17] A. C. Allison, M. R. Young in *Lysosomes in Biology and Pathology*, Vol. 2 (Eds: J. T. Dingle, H. B. Fell), Amsterdam, North Holland, **1969**, pp. 600–628.
- [18] COLLECT data collection software, Nonius B. V., **1998**.
- [19] Z. Otwinowski, W. Minor in *Methods in Enzymology*, Vol. 276: *Macromolecular Crystallography, part A* (Eds.: C. W. Carter, Jr., R. M. Sweet), Academic Press, New York, **1997**, p. 307–326.
- [20] SADABS 2007/2 (Sheldrick, G. M., 2007).
- [21] G. M. Sheldrick. SADABS: A program for absorption correction with the Siemens SMART system; University of Göttingen: Germany, **2001**.
- [22] SHELXTL program system version 6.1; Bruker Analytical X-ray Instruments Inc., Madison, WI, **1998**.
- [23] *International Tables for Crystallography*, Vol. C (Ed.: A. J. C. Wilson), Kluwer, Dordrecht, **1992**.
- [24] A. D. Becke, *Phys. Rev. A* **1988**, 38, 3098.
- [25] J. P. Perdew, *Phys. Rev. B* **1986**, 33, 8822.
- [26] F. Weigend, R. Ahlrichs, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, 7, 3297–3305.
- [27] K. Eichkorn, O. Treutler, H. öhm, M. Häser, R. Ahlrichs, *Chem. Phys. Lett.* **1995**, 242, 652.
- [28] M. Von Arnim, R. Ahlrichs, *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 1746.

- [29] F. Weigend, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 1057.
- [30] A. Klamt, G. Schüürmann, *Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1993**, 799.
- [31] TURBOMOLE V6.1 2009, a development of University of Karlsruhe and Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 1989–2007, TURBOMOLE GmbH, since 2007; available from <http://www.turbomole.com>.
- [32] E. Holtzman, *Lysosomes*, Plenum Press, New York, **1989**, pp. 95–100.
- [33] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.

Received: May 19, 2011
Published online: November 9, 2011

Anexo II



Identification of dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors in melanoma cells: Prodigiosin vs. obatoclax

M. Espona-Fiedler^a, V. Soto-Cerrato^a, A. Hosseini^b, J.M. Lizcano^c, V. Guallar^b, R. Quesada^d, T. Gao^e, R. Pérez-Tomás^{a,*}

^aCancer Cell Biology Research Group, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, Faculty of Medicine, University of Barcelona, E-08907 Barcelona, Spain

^bJCREA Joint BSC-IRB Research Program in Computational Biology, Barcelona Supercomputing Center, E-08034 Barcelona, Spain

^cInstitute of Neuroscience and Department of Biochemistry and Molecular Biology – Faculty of Medicine, Autonomous University of Barcelona, E-08193 Barcelona, Spain

^dDepartment of Chemistry, Faculty of Science, University of Burgos, E-09001 Burgos, Spain

^eMarkey Cancer Center, Department of Molecular and Cellular Biochemistry, University of Kentucky, Lexington, KY 40536-0509, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 October 2011

Accepted 25 November 2011

Available online 6 December 2011

Keywords:

Prodigiosin
Obatoclax
Melanoma
PI3K/AKT
mTOR inhibitors
mTOR complexes

ABSTRACT

The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway regulates cell proliferation, survival and angiogenesis. The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a protein kinase ubiquitously expressed within cells that regulates cell growth and survival by integrating nutrient and hormonal signals. mTOR exists in two complexes, mTORC1 and mTORC2. Hyperactivation of the mTOR protein has been linked to development of cancer, raising mTOR as an attractive target for cancer therapy. Prodigiosin (PG) and obatoclax (OBX), two members of the prodiginines family, are small molecules with anticancer properties which are currently under clinical trials. In the present paper, we demonstrate that mTOR is a molecular target of both prodiginines in melanoma, a highly drug-resistant cancer model. The inhibition of mTORC1 and mTORC2 complexes by PG or OBX resulted in a loss of AKT phosphorylation at S473, preventing its full activation, with no significant effect on T308. The strongest activity inhibition (89%) was induced by PG on mTORC2. Binding assays using Surface Plasmon Resonance (SPR) provide kinetic and affinity data of the interaction of these small molecules with mTOR. In addition, *in silico* modeling produced a detailed atomic description of the binding modes. These results provide new data to understand the mechanism of action of these molecules, and provide new structural data that will allow the development of more specific mTOR inhibitors for cancer treatment.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Prodigiosin (PG) and obatoclax (OBX) are two prodiginine family members which have emerged as promising anticancer drugs and are currently in clinical trials. Prodiginines are bacterial metabolites with a pyrrolylpyrromethene skeleton which have shown immunosuppressive and anticancer properties. PG has shown apoptotic activity against several cancer cell types with low cytotoxicity in non-malignant cells. The National Cancer Institute (www.dtp.nci.nih.gov) tested prodigiosin (and some of its derivatives) against a collection of ~60 cell lines with an average IC₅₀ (for PG) of 2.1 μM [1]. It has been described that the apoptotic

process triggered by PG is mediated through the mitochondrial pathway and involves the induction of the proapoptotic gene NAG-1 [2]. Nevertheless, the molecular target of this agent is still unknown. Further studies are also necessary to understand the mechanism of action of OBX. OBX is a synthetic indolylprodiginin derivative, which was developed by GeminX Pharmaceuticals (recently acquired by Cephalon) and was described as a BH3 mimetic drug [3].

In the present report we identify the mammalian target of rapamycin (mTOR) as a new molecular target of the prodiginines. mTOR is an evolutionarily conserved serine/threonine protein kinase which is constituted by two signaling complexes: mTOR complex 1 (mTORC1) and mTOR complex 2 (mTORC2). Both complexes have specific effects on distinct cellular functions, such as controlling mRNA translation, ribosome biogenesis, autophagy and metabolism [4–6]. mTORC2 phosphorylates AGC kinases such as AKT, serum- and glucocorticoid-induced protein kinase-1 (SGK1) and protein kinase C-α (PKCα) [7–9]. AKT is one of the best-known downstream effectors of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K). Complete AKT activation depends on

Abbreviations: PG, prodigiosin; OBX, obatoclax; Rap, rapamycin; mTOR, mammalian target of rapamycin; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; AKT/PKB, protein kinase B.

* Corresponding author at: Cancer Cell Biology Research Group, Department of Pathology and Experimental Therapeutics, University of Barcelona, Pavelló Central, 5a planta, LR 5101C/Feixa Llarga s/n, E 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel.: +34 934024288; fax: +34 934024288.

E-mail address: rperez@ub.edu (R. Pérez-Tomás).

phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) and mTORC2, which phosphorylate AKT at two key sites: the activation loop (T308) and the C-terminal hydrophobic motif (S473), respectively [10,11]. mTOR signaling is regulated through a network of feedback loops, protein partners, substrates, and regulators [12,13]. Among them, PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa) is a key regulator of mTORC1. Moreover, in contrast to mTORC2, which contains rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mTORC1 contains raptor (regulatory associated protein of mTOR), which positively regulates mTOR activity and functions as a scaffold for recruiting mTORC1 substrates [14,15]. PRAS40 interacts with raptor in insulin-deprived cells and inhibits the activation of mTORC1 pathway [16]. mTORC1 regulates protein synthesis through S6-kinase and the translation repressor protein 4E-BP1. mTORC1 phosphorylates the hydrophobic motif of p70S6K on T389 [17]. On the other hand, phosphorylation of 4E-BP1 at S65 by mTORC1 prevents the binding of 4E-BP1 to the eIF4E translation initiation factor activating cap-dependent translation [13].

Interest in identifying and developing new mTOR inhibitors has increased since the second generation of mTOR inhibitors showed encouraging results in the treatment of different types of cancer, including melanoma [18]. Melanoma is an extremely aggressive disease with high metastatic potential and notoriously strong resistance to cytotoxic agents. Development of resistance has been related to the presence of different feedback loops that link both PI3K/AKT/mTOR and mitogen activated protein kinase (MAPK) pathways. These pathways are critical to melanoma progression and both are deregulated in melanoma, but not in normal cells [19,20]. Thus, compounds that counteract these feedback loops are considered in cancer therapy.

Here, we report that prodiginines inhibit both mTORC1 and mTORC2 complexes and thus counteract the S6K-1/IRS-1 negative feedback loop in melanoma. Moreover, binding assays provide data on the stability and affinity of the interaction between these small molecules and mTOR. In addition, we describe several of the recognition motifs involved in these interactions by *in silico* model.

2. Material and methods

2.1. Reagents

Prodiginosin (2-methyl-3-pentyl-6-methoxyprodiginosene) was provided by Dr. R.J. Schultz of the National Cancer Drug Synthesis and Chemistry Branch Chemotherapeutic Agents Repository (Bethesda, MD). Obatoclax, a synthetic indol-containing prodiginine, was provided by Dr. Roberto Quesada of the University of Burgos (Supplementary Fig. 1). Rapamycin (FRAP1/mTOR inhibitor) was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). All stock solutions were diluted in DMSO and stored at -20°C .

2.2. Cell lines and culture conditions

Human melanoma cancer cell lines SK-MEL-28 and SK-MEL-5 were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA).

Stable control, mTOR knockdown and raptor knockdown human colon cancer cells SW480 were generated using lentivirus-based shRNA targeting mTOR or raptor as described in [21].

All cell types were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Biological Industries, Beit Haemek, Israel) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Life Technologies, Carlsbad, CA), 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, and 2 mM L-glutamine all from Biological Industries. Cells were grown at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere.

2.3. Cell viability assay

Cell viability was determined by MTT assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) (see [Supplementary material and methods](#)).

2.4. Hoescht staining

Cell morphology was evaluated by fluorescence microscopy following Hoescht 33342 DNA staining (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO). Cells (2×10^5 cells/ml) were treated or not with PG for 24 h. They were washed in PBS and resuspended in 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoescht 33342 and incubated for 30 min at 37°C in the dark. Then, cells were washed in PBS and examined under a Carl Zeiss Jena microscope.

2.5. Kinase profiling

Kinase profiling was performed by The National Centre for Protein Kinase Profiling (MRC Protein Phosphorylation Unit, Dundee, UK). All kinase assays were carried out using a radioactive (^{32}P -ATP) filter-binding assay in duplicate. Screening was carried out at 10 μM and industry standard QC procedures were used to validate each assay.

2.6. Immunoblot analysis

Cells were treated with prodiginines before insulin (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) stimulation. Adherent and floating cells were lysed in buffer (50 mM Tris pH 7.5, 60 mM glycerophosphate, 20 mM sodium pyrophosphate, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 30 mM NaF, 1 mM orthovanadate, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 5 μM pepstatin A, 10 μM leupeptin). Protein concentration was determined with the BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL) using bovine serum albumin as standard. 40 μg of protein extracts was separated by SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Bedford, MA). Immunoblots were developed with primary antibodies according to the manufacturer's instructions (see [Supplementary material and methods](#)). DMSO was used as a control.

2.7. Immunoprecipitation and non-radioactive kinase activity assay

mTORC1 and mTORC2 complexes were immunoprecipitated from SK-MEL5 cells (see [Supplementary material and methods](#)). Immunoprecipitates were assayed against recombinant protein AKT1 and p70-S6K1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), respectively, in a final volume of 30 μl containing 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM magnesium chloride and 10 μM ATP which was incubated for 30 min at 30°C with gentle shaking. Assays were stopped by addition of 5 μl Laemmli buffer and samples were then heated to 100°C for 5 min. Samples were loaded on SDS-PAGE gel and analyzed by immunoblotting.

2.8. Surface Plasmon Resonance (SPR) assays

SPR assays were performed using Biacore T-100 (see [Supplementary material and methods](#)), which is a sensitive, high-performance, flow-cell-based SPR biosensor used for the analysis of protein-protein or protein-small molecule interactions [22]. This system incorporates software wizards which assist with the analysis of every interaction parameter, including kinetic and affinity evaluation and determination of binding specificity.

2.9. Theoretical methods

Using two separate computational approaches, (1) Blast + Modeller and (2) I-TASSER, we developed a homology modeling procedure for mTOR. Both approaches identified templates from the PI3K protein kinase family with 24–28% identity, and both built similar models. Additionally, two control *in silico* models from the PI3K family, PDK1 (pdbcode:2PE1) and PKC-alpha (pdbcode:3IW4), were chosen for the protein–ligand simulations (see Supplementary material and methods).

After preparing the models, we performed a cavity search with SiteMap, which confirmed the ATP binding site as the top ranked binding cavity, followed by initial rigid ligand docking with Glide [23]. For PDK1 and PKC-alpha we docked the crystallographic ligands together with PG. For mTOR we docked PG, OBX and PP242, a ligand that inhibits mTOR with an IC₅₀ of 8 nM [24]. The induced fit was modeled by 600 iterations with PELE (Protein Energy Landscape Exploration), a stochastic method of mapping large conformational rearrangements and induced fit events in protein–ligand interactions [25]. To map the change in affinity after the protein–ligand induced fit, the PELE results were clustered and representative structures were redocked with Glide.

2.10. Statistical analysis

For analysis of activity kinase, results are expressed as the mean ± S.D. of three independent experiments. Statistical analysis (ANOVA) was carried out with the Statgraphics plus 5.1. statistical package. $P < 0.05$ and $P < 0.01$ are represented by * and **, respectively.

3. Results

3.1. Prodiginines induce cell death in melanoma cells

To determine whether prodiginines could be potential melanoma chemotherapeutic agents, we first examined their effect on two melanoma cell lines obtained from different stages of melanoma progression according to the broadly accepted Clark model [26]. We examined SK-MEL-28 (radial growth phase) cells derived from an *in situ* melanoma. We then examined the next progression stage SK-MEL-5 (vertical growth phase) cells derived from a metastatic site (axillary node) of a melanoma-bearing patient.

To compare the cytotoxic-inducing potential of PG and OBX on melanoma cells, we treated SK-MEL-28 and SK-MEL-5 cells with

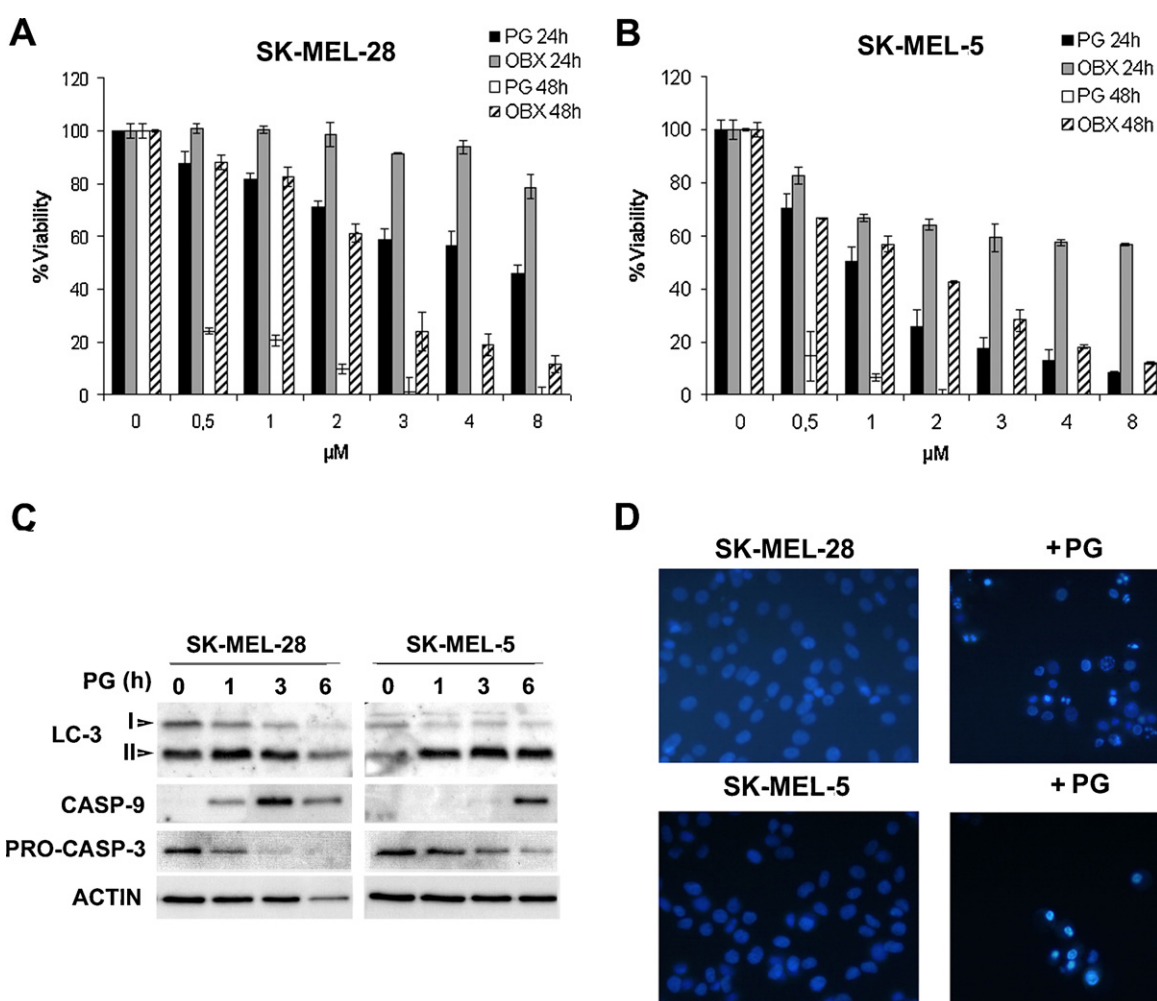


Fig. 1. Cell death in PG- or OBX-treated SK-MEL-28 and SK-MEL-5 cells. (A) Cytotoxic effect of PG is higher than that of OBX. Cells were treated with a range of PG or OBX concentrations (0–8 μM) for 24 and (B) 48 h. Cell viability was determined by MTT assay. The percentage of viable cells was calculated as the ratio of A_{570} between treated and control cells. Values are shown as mean ± S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate. (C) PG induces activation of both autophagic and apoptotic mechanisms. Cells were treated with PG IC₅₀ and cell extracts were assayed for LC-3, caspase-9 and procaspase-3 expression by Immunoblotting. Actin was used as loading control. (D) PG induces apoptotic body formation and nuclear condensation. This was observed through Hoescht staining in cells treated with PG IC₅₀ for 24 h.

both compounds at concentrations ranging from 1 μM to 8 μM for 24 and 48 h. Cell viability was reduced by PG in a dose-dependent manner. PG showed a half inhibitory concentration (IC_{50}) value of $4.51 \pm 0.47 \mu\text{M}$ and $1.02 \pm 0.15 \mu\text{M}$ in SK-MEL-28 and SK-MEL-5 cells, respectively (Fig. 1A and B). In contrast to PG, OBX had little effect on cell viability at 24 h. At 48 h of treatment, OBX showed an IC_{50} value of $2.2 \mu\text{M} \pm 0.43$ and $1.8 \mu\text{M} \pm 0.21$ in SK-MEL-28 and SK-MEL-5 cells, respectively.

Previous studies showed that OBX mediates cell death through the induction of autophagy and subsequent activation of apoptosis [27]. Therefore, we analyzed which cell death mechanism was triggered by PG, using caspase-3, -9 and LC-3 proteins as apoptotic and autophagic markers, respectively. After PG treatment, the cytosolic form of LC-3 (LC-3 I) disappeared and the form conjugated to phosphatidylethanolamine (LC-3 II) appeared, in a dose-dependent manner (Fig. 1C). It has been reported that LC-3 II is recruited to autophagosomal membranes, thus participating in autophagy [28]. LC-3 II was induced at shorter time exposures than the activation of caspase-9, indicating that both processes are triggered, but that autophagy precedes apoptosis. Moreover, caspase-3 proteolysis and the formation of apoptotic bodies corroborate the apoptotic process (Fig. 1D).

In addition, these results demonstrate that the cytotoxic effect mediated by PG is higher than by OBX in melanoma cells, especially in SK-MEL-5.

3.2. Regulation of PI3K/AKT/mTOR and MAPK pathways is mediated by prodiginosin

To analyze the potential of prodiginosins as protein kinase regulators a kinase profiling procedure was performed. The results

showed that PG (10 μM) suppressed the activity of few protein kinases from a panel of 65 protein kinases encoded by the human genome. The proteins that were significantly inhibited (>70%) were AKT, ribosomal S6 kinase (RSK)-2, mitogen and stress activated protein kinase (MSK)-1, serum glucocorticoid-inducible kinase (SGK)-1, calmodulin-dependent kinase (CaMK)-1 and Bruton's tyrosine kinase (Btk) [29,30]. All these proteins participate in PI3K/AKT/mTOR and MAPK pathways. Interestingly, other proteins closely related to these pathways such as PDK1, insulin growth factor (IGF)-I receptor, MAPK protein kinases (extracellular related kinases (ERK)-1/2, p38, c-Jun N-terminal kinase (JNK)-1/2) and inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase (IKK) were not inhibited. Unfortunately, other proteins of interest such as mTOR were not included in this kinase profiling (Fig. 2A). These results characterize PG as a multi-kinase inhibitor, and they provide a range of new potential targets of prodiginosins, all of which play a critical role in the control of the cell cycle and tumor progression.

To elucidate the specific molecular mechanisms that induce the cytotoxic effect of prodiginosins, and based on the kinase profiling results, we studied the effect of PG and OBX on PI3K/AKT/mTOR and MAPK pathways in melanoma cells. Both pathways regulate melanoma cell death and proliferation [26].

We first examined the activation of the two key effector kinases of these pathways, AKT and ERK1/2. Phosphorylation levels of these kinases were higher in SK-MEL-28 than in SK-MEL-5 cells (Fig. 2B). These differences in the up-regulation of pro-survival protein kinases might explain why resistance to prodiginosin treatment depends on the cell line.

We then analyzed the effect of PG on both pathways. Cells were treated with PG at the IC_{50} concentrations established as described above. PG reduced AKT phosphorylation on S473 in a time-

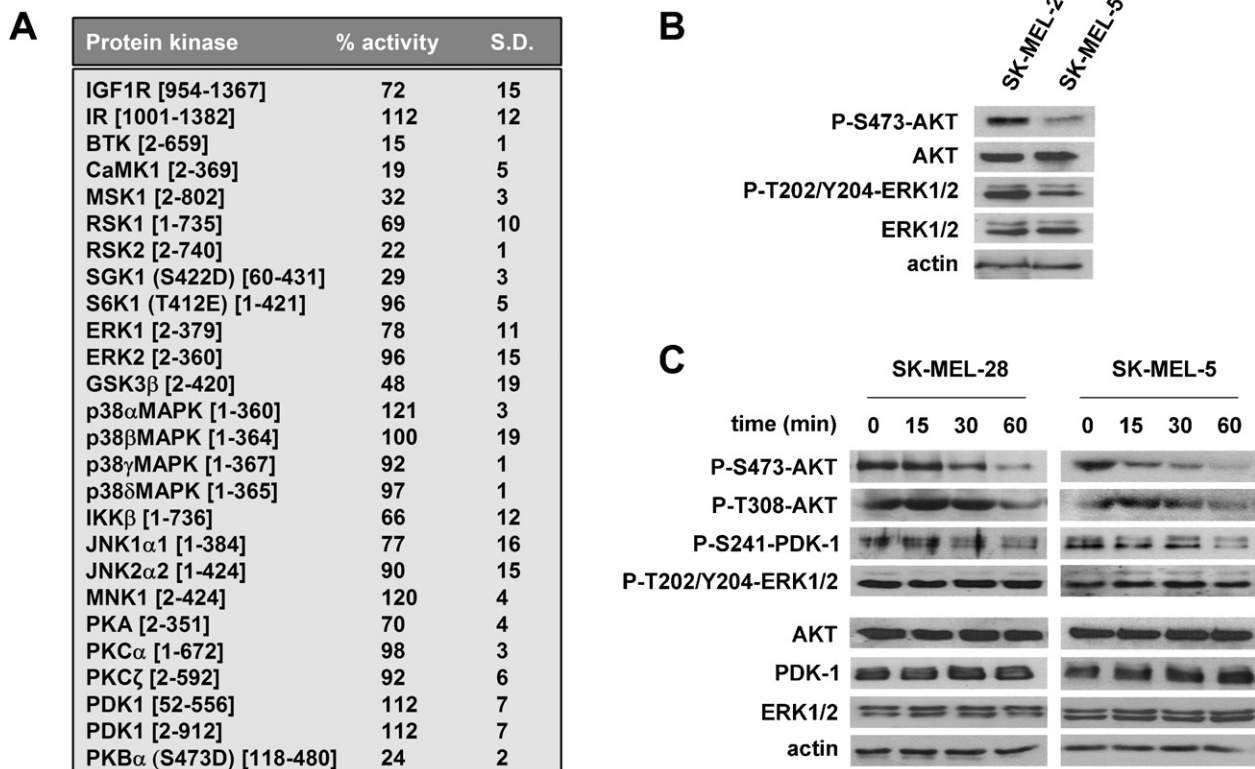


Fig. 2. Effect of PG on PI3K/AKT/mTOR and MAPK survival pathways. (A) PG induces inhibition of some PI3K and MAPK-related protein kinases *in vitro*. Kinase assays were performed by the MRC Protein Phosphorylation Unit. PG 10 μM was screened in duplicate against a panel of 65 protein kinases. All assays were carried out using a radioactive (^{32}P -ATP) filter-binding assay. (B) PI3K/AKT and MAPK pathways are activated in SK-MEL28 more strongly than in SK-MEL-5 melanoma cells. Phosphorylation and total protein levels of AKT and ERK1/2 were visualized by Immunoblotting. Actin was used as a loading control. (C) PG-induced AKT but not ERK1/2 dephosphorylation. SK-MEL-28 and SK-MEL-5 cells were treated with PG at a concentration of IC_{50} for 15 min to 1 h. Phosphorylation levels were visualized by Immunoblotting. Actin was used as a loading control.

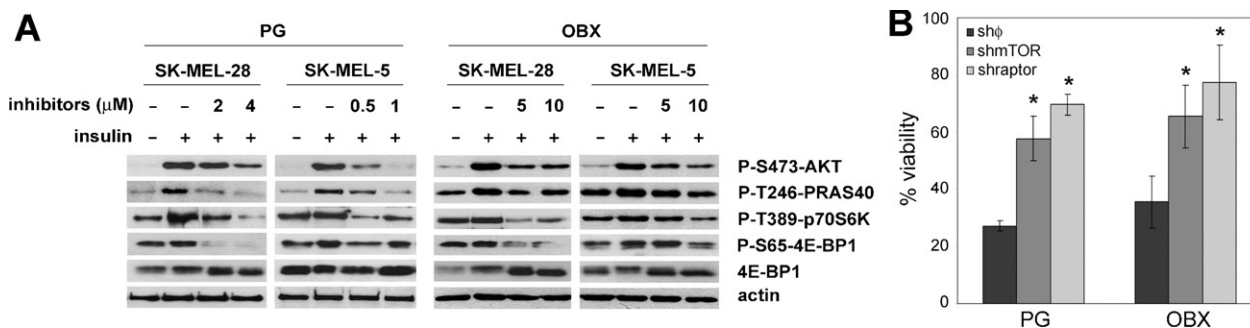


Fig. 3. Prodriginines target mTOR pathway. (A) Effect of prodriginines on critical effectors of PI3K/AKT/mTOR pathway in melanoma cells. SK-MEL-28 and SK-MEL-5 cells were deprived for 24 h and treated with PG or OBX at the indicated concentrations for 1 h before insulin-stimulation at 1 μ M for 30 min. Cell extracts were analyzed by Immunoblotting. Actin was used as loading control. (B) Inhibition of mTOR activity prevents from prodriginines-mediated cell death. Stable control and knockdown cells were treated with PG or OBX at 4 μ M for 48 h. The percentage of viable cells was calculated as the ratio of A_{570} between treated and control cells. Values are shown as mean \pm S.E.M. of three independent experiments performed in triplicate. Statistical significance is shown as * $P < 0.01$.

dependent manner. Nevertheless, only a slight effect was observed on T308, and PG had no effect on PDK1 or ERK1/2 (Fig. 2C). These results, together with the kinase profiling, indicate that mTOR signaling might be down-regulated in the presence of prodriginines.

3.3. Inhibition of mTOR signaling by prodriginines in melanoma cells

After observing significant inhibitory effects of PG on AKT, we sought to confirm the inhibition of the AKT/mTOR/p70S6K signaling pathway by prodriginines in melanoma cells. Thus, we examined the effect of prodriginines on the main regulators and substrates of this pathway. As shown in Fig. 3A, both PG and OBX inhibited mTORC2 activity, leading to an inhibition of the insulin-stimulated phosphorylation of AKT and PRAS40. Nevertheless, it was necessary to use higher doses of OBX (10 μ M) to obtain same effects as PG at 1 h of treatment. Insulin-stimulated phosphorylation of PRAS40 at T246 by AKT suppresses its mTORC1 inhibitory activity. Therefore, insulin stimulation activates mTORC1 and increases p70S6K phosphorylation [16]. After treatment with prodriginines, p70S6K and 4E-BP1, which are directly regulated by mTOR effectors were also dephosphorylated. Dephosphorylation of mTOR effectors suggests that prodriginines inhibit mTOR pathway.

To further confirm that prodriginines target mTOR pathway, we first determined whether knockdown of mTOR (sh-mTOR) or raptor (sh-raptor) in SW-480 cells prevented the cytotoxic effect induced by prodriginines. Knockdown of mTOR or raptor resulted in 47% or 74% reduction in endogenous protein expression, respectively, compared with stable control cells (sh- ϕ) (Supplementary Fig. 2A and B). The functional depletion of mTOR pathway was confirmed by decreased phosphorylation levels of p70S6K and AKT in mTOR and raptor knockdown cells (Supplementary Fig. 2C). According to protein depletion levels in both cell lines, results showed higher p70S6K inhibition in raptor knockdown cells. Complete AKT inhibition was observed after treatment with PG or OBX at 4 μ M for 1 h. After 6 h of treatment with both prodriginines, protein expression down-regulation was induced in both mTOR effectors.

We next assessed whether depletion of mTOR activity prevented from prodriginines-mediated cell death. Stable control cells and knockdown cells were treated with a range of concentrations (0–4 μ M) of PG or OBX for 24 or 48 h (Supplementary Fig. 3A and B). Results showed greater cytotoxic effects in sh- ϕ cells after treatment with PG than OBX, as observed in melanoma cells. Nevertheless, the most significant results were obtained after 48 h of treatment. At 4 μ M of PG or OBX, sh-mTOR and sh-raptor cell death was reduced in a ~35–40% compared with sh- ϕ cells (Fig. 3B), demonstrating that mTOR complexes are critical for prodriginines cytotoxic effect.

3.4. Prodriginines counteract the activation of the S6K-1/IRS-1 negative feedback loop through mTORC1 and mTORC2 inhibition

We further examined the ability of PG and OBX to inhibit mTORC1 and mTORC2 complexes in melanoma cells. Inhibition of mTORC1 induces activation of S6K-1/IRS-1 negative feedback [19]. Dual inhibition of mTORC1 and mTORC2 might counteract this mechanism. With this in mind, we first compared the effect of both compounds with that of rapamycin, which inhibits mTORC1, leading to an increase in AKT phosphorylation through an IGF-1R-dependent mechanism. As expected, rapamycin alone decreased phospho-p70S6K levels, while increasing phospho-AKT levels. The greatest effect of rapamycin was seen at 100 nM (Supplementary Fig. 4). As a further comparison, we co-treated both cell lines with PG (IC₅₀) or OBX (10 μ M) and 100 nM rapamycin for 1 h, before insulin stimulation. In contrast to both prodriginines alone, treatment with rapamycin induced a stronger decrease in the phospho-p70S6K levels, suggesting that mTORC1 is not completely inhibited by PG or OBX (Fig. 4A). Nevertheless, in both cell lines, PG rather than OBX counteracted the activation of this feedback loop, leaving AKT quite dephosphorylated.

To evaluate the inhibition on mTORC2 and mTORC1 complexes, further kinase activity assays were performed. We isolated active mTORC2 and mTORC1 complexes from melanoma cells after insulin stimulation. Active mTORC2 and mTORC1 were immunoprecipitated from the lysates using anti-rictor and anti-raptor antibodies, respectively. mTORC2 activity was analyzed using recombinant AKT as substrate. The inhibition of mTORC2 by PG or OBX resulted in a loss of AKT phosphorylation (Fig. 4B). We next measured the effect of both molecules on mTORC1 activity using p70S6 as a substrate (Fig. 4C). Both prodriginines markedly inhibited both mTOR complexes. The strongest inhibition (89%) was induced by PG on mTORC2 (Fig. 4D).

3.5. Kinetic characterization

In order to further characterize the prodriginines as mTOR inhibitors, we first monitored the interaction between mTOR and prodriginines by real-time interaction analysis. We used Surface Plasmon Resonance (SPR) assays, which allow kinetic and affinity evaluation and determination of binding specificity between proteins and small molecules [22].

For binding experiments, we first immobilized the recombinant protein mTOR (aa 1360–2549) on a sensor surface. The analytes (PG and OBX) were then injected in solution over the surface. Changes in SPR response were detected even at nanomolar concentrations. The interactions of small molecule inhibitors with

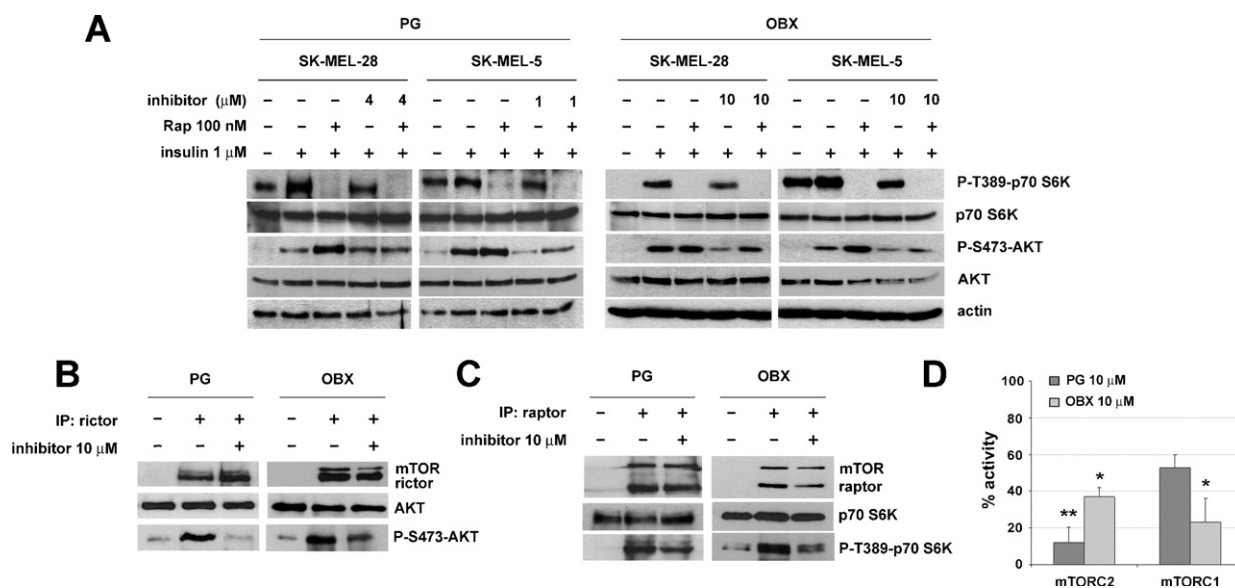


Fig. 4. Prodiginines counteract S6K1/IGF-1R negative feedback loop through mTORC1 and mTORC2 inhibition. (A) Effect of PG on S6K1/IGF-1R negative feedback loop in melanoma cells. Before insulin stimulation, deprived cells were pre-incubated with rapamycin 100 nM for 15 min and prodiginines were then added at the indicated concentrations for 1 h. (B) Prodiginines inhibit mTORC2 and mTORC1 complexes. Active mTORC2 and mTORC1 complexes were immunoprecipitated from insulin-stimulated SK-MEL-5 cells using anti-rictor or (C) anti-raptor antibodies, respectively. Immunoprecipitated were incubated with recombinant AKT or p70S6K (20 ng), 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM magnesium chloride, 10 μM ATP and PG or OBX, both at 10 μM for 30 min. Kinase reaction was stopped with Laemmli buffer (5 \times) and phosphorylation levels of p70 S6K or AKT were visualized by immunoblotting. (D) Data is expressed as the percentage of phospho-AKT or phospho-p70S6K levels (normalized by AKT or p70S6K levels), respectively, and shown as the mean \pm S.D. Statistical significance is shown as * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

mTOR were analyzed, providing kinetic and affinity data in the nanomolar range (Fig. 5A and B). The same order of magnitude in the affinity data (K_D) and the low dissociation rates (Kd) suggest that both molecules form similar specific and stable binders.

Small molecule specificity was tested by performing interaction analysis between these compounds and another protein kinase:

AKT. In this case, the data did not fit this interaction model using PG as analyte. Moreover, using OBX no high-affinity saturable component was obtained (Supplementary Fig. 5). These marked differences in the characteristics of the interactions compared to mTOR suggest that stable binding does not occur between prodiginines and AKT.

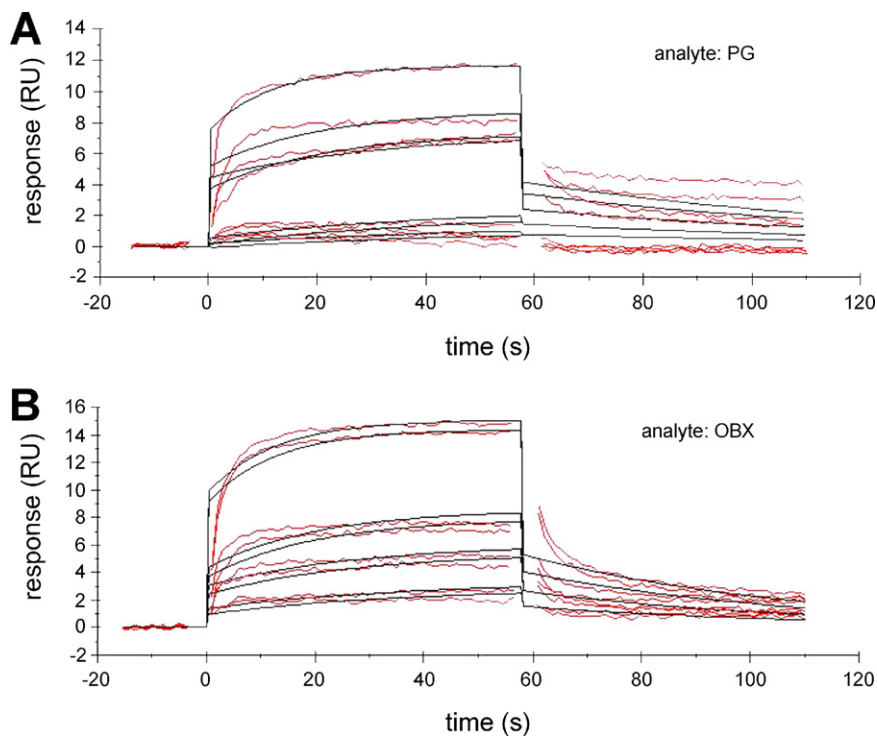


Fig. 5. Kinetic characterization of PG and OBX binding to mTOR by Surface Plasmon Resonance (SPR) assays. (A) PG or (B) OBX were injected at a range of concentrations between 0.06 μM and 1 μM over immobilized mTOR (aa 1360–2549). Sensograms and curve fit (black lines) are shown. Kinetics and affinity evaluation of these sensograms showed affinity ($K_D = K_d/K_a$) constants of 416 \pm 49 nM for PG and 355 \pm 121 nM for OBX, respectively. RU, resonance units.

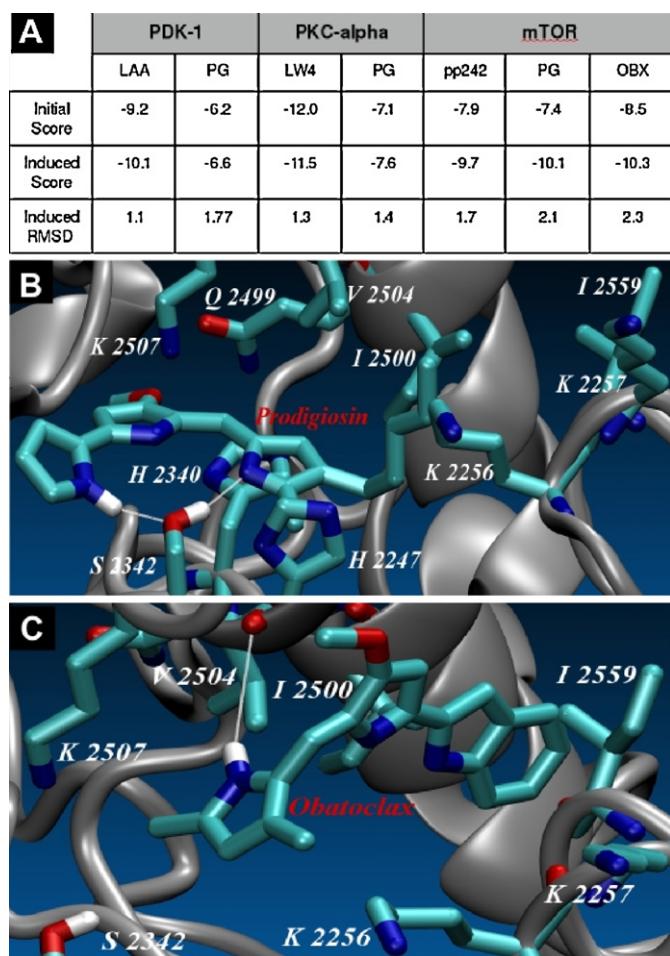


Fig. 6. *In silico* model. (A) Initial and after PELE (induced fit) scores obtained with Glide for the different systems and ligands. Also show is the RMSD along the induced fit process. RMSD was computed as all heavy atom within 10 Å of the initial docking position (units in angstroms). (B) Detailed view of the PG-mTOR and (C) OBX-mTOR induced fit complex.

3.6. *In silico* docking prediction

To further characterize the interaction of prodiginines with mTOR, we developed a homology model of the active site sequence (residues 2131–2516). PDK1 and PKC-alpha were used as control systems. Fig. 6A shows the Glide docking scores before and after the PELE run modeling the induced fit procedure, together with the active site RMSD along the fit process, for all systems and ligands. As expected, we obtain good initial docking scores for the two crystallographic ligands in PDK1 and PKC-alpha, -9.2 and -12.0 , respectively. Furthermore, when comparing the docked structure for each ligand with its crystal structure we obtained an RMSD of ~ 0.3 Å. Such agreement, however, is expected when a ligand is docked into its crystal structure. The induced fit procedure does not significantly change the scores, and only introduces slight changes to the protein–ligand structures in the active site: 1.1 Å and 1.3 Å for LAA and LW4, respectively. Thus, the control test with both crystallographic ligands indicates good affinities and small induced fit reorganization. Next, we applied the same protocol to PG and found significantly lower initial binding scores: -6 to -7 . The initial models, however, were taken from the crystal structures with bound ligands. Thus, they are biased towards the crystal ligands, requiring some induced fit in order to adapt to PG. For this purpose PELE was used [25]. The induced fit procedure increased the RMSD but did not substantially improve the affinity for PG; the

control experiments support the absence of inhibition in PDK1 and PKC observed in the kinase profiling.

Regarding the mTOR ligand docking, the initial docking score of pp242, PG and OBX is about -7 to -8 , similar to the value measured for PG in our *in silico* control assays. For mTOR, however, the induced fit procedure (the same used for PDK1 and PKC-alpha) introduced significant changes. We observe a clear increase in binding affinity along with a significant active site adjustment, the RMSD increases to 2.1 and 2.3 for PG and OBX, respectively. For all three ligands we obtained scores which are similar to those obtained for the crystal ligands in PDK1 and PKC-alpha. Thus, our simulation studies corroborate recent observations on pp242 [24] and also support our experimental findings with PG and OBX.

In Fig. 6B and C we display the detailed atomic view of the induced fit of the PG- and OBX-mTOR complex, where we can observe several recognition motifs. For example, in the fit PG-mTOR complex, the hydrophobic environment around the pentyl side chain includes Ile2500, Ile2559 and Val2504. We also observe a stacking interaction between His2340 and the PG pyrrole rings. The most interesting feature, however, is the “H-bond ring” created by the alcohol side chain in Ser2342 and the two extreme pyrrole nitrogens. *In silico* mutation of this serine to a glycine reduces the glide score by 3 units, pointing to the importance of this interaction [31].

4. Discussion

Prodiginosin (PG) and obatoclax (OBX), both belong to the prodiginine family, which are pyrrole alkaloids of bacterial origin. Both molecules are promising candidates as anticancer drugs, since they have pro-apoptotic activity in a broad range of human cancer cell lines [1]. Although they are currently in pre-clinical and clinical trials, respectively, further studies are necessary to identify the molecular target involved in their anticancer activity. It was hypothesized that OBX has more complex effects on melanoma cells than merely binding to and inhibiting antiapoptotic Bcl-2 family proteins [3]. In the present report, we considered other survival signals to further understand the mechanism of action of prodiginines. We studied the prodiginine-mediated cytotoxic effect in different stages of melanoma progression. PI3K/mTOR and MAPK signaling pathways are involved in growth and progression in melanoma. Deregulation of these pathways is associated with resistance to apoptosis, increased cell growth, cell proliferation and cell energy metabolism. It also confers to melanoma resistance to many chemotherapeutic agents [26]. Prodiginines overcome this resistance, and are thus cytotoxic in both cell lines. Moreover, deregulation of these pathways might explain the higher IC₅₀ value of SK-MEL-28 cells compared to SK-MEL-5 cells.

Melanoma cells were more sensitive to PG than to OBX. Our results are consistent with previous reports where melanoma cells rendered more sensitive to OBX-induced apoptosis only in combination with molecules that induce reticulum stress, but not as a single agent [32]. It was also described that OBX induces autophagy before apoptosis [27]. Our results show that PG also activates both mechanisms. Moreover, cytotoxic effect of prodiginines was partially prevented by mTOR and raptor proteins depletion, concluding that prodiginines-induced mTOR pathway inhibition leads to cell death. We have characterized the effect of both prodiginines on critical elements of mTOR signaling such as AKT, PRAS40, p70 S6K and 4E-BP1, as well as on different compensatory mechanisms which link PI3K/mTOR and MAPK signaling [18,20]. Our results demonstrate that prodiginines target mTOR pathway. In contrast to rapamycin, prodiginines counteract the feedback loop triggered by mTORC1 inhibition, which leads to AKT activation through IGF-1/IRS-1 signaling [19]. The effective-

ness of prodiginines relies on their ability to inhibit mTOR activity. Therefore, the suppression of mTORC1 as well as mTORC2 activity implies a reduction of phosphorylation of AKT at S473.

The kinetics and affinity evaluation revealed high-affinity binding between mTOR and prodiginines. Nevertheless, although mTOR is a validated target for the treatment of cancer, it might be necessary to develop more effective prodiginine-derivates with improved chemical properties that increase their bioavailability.

The second generation of mTOR inhibitors targets the ATP site. These compounds suppress AKT phosphorylation, leading to a stronger antiproliferative effect than that of rapamycin [18,33]. Therefore, prodiginines effect might be closer to the second generation of mTOR inhibitors. Thus, it will be interesting to compare prodiginines with other small molecules such as AZD-8055 (AstraZeneca), INK-128 (Intellikine), OSI-027 (OSI pharmaceuticals) or pp242 which also block both mTORC1 and mTORC2 complexes. pp242 is structurally similar to prodiginines [24]. *In silico* models suggest that prodiginines, like pp242, could interact in the active-site of mTOR and provided several of the recognition motifs involved in their interaction. Moreover, these models also illustrate the importance of the alcohol side chain and the two extreme pyrrole nitrogens of the prodiginines for the interaction on Ser2342 of mTOR.

These findings described here by PG and OBX as mTORC1 and mTORC2 inhibitors contribute to our understanding of the molecular mechanisms of action of both molecules and provide data about their structural properties that will allow the development of more-effective mTOR inhibitors in the future.

Acknowledgements

The authors thank Marta Taulés for technical assistance from Centres Científics i Tecnològics (Universitat de Barcelona) and Robin Rycroft for language assistance. This work was supported by a research grant from Spanish government and the European Union (FIS-PI10/00338).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bcp.2011.11.027.

References

- [1] Perez-Tomas R, Vinas M. New insights on the antitumoral properties of prodiginines. *Curr Med Chem* 2010;17:2222–31.
- [2] Soto-Cerrato V, Vinals F, Lambert JR, Kelly JA, Perez-Tomas R. Prodigiosin induces the proapoptotic gene NAG-1 via glycogen synthase kinase-3beta activity in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6:362–9.
- [3] Nguyen M, Marcellus RC, Roulston A, Watson M, Serfass L, Murthy Madiraju SR, et al. Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:19512–7.
- [4] Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 2004;14:1296–302.
- [5] Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006;124:471–84.
- [6] Guertin DA, Sabatini DM. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal* 2009;2:pe24.
- [7] Ali SM, Sabatini DM. Structure of S6 kinase 1 determines whether raptor-mTOR or rictor-mTOR phosphorylates its hydrophobic motif site. *J Biol Chem* 2005;280:19445–8.
- [8] Frodin M, Antal TL, Dummler BA, Jensen CJ, Deak M, Gammeltoft S, et al. A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J* 2002;21:5396–407.
- [9] Garcia-Martinez JM, Alessi DR. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* 2008;416:375–85.
- [10] Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 1996;15:6541–51.
- [11] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261–74.
- [12] Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000;103:253–62.
- [13] Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 2002;16:1472–87.
- [14] Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 2002;110:177–89.
- [15] Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;110:163–75.
- [16] Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, Lindquist RA, Kang SA, Spooner E, et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 2007;25:903–15.
- [17] Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G, et al. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70S6k. *EMBO J* 1997;16:3693–704.
- [18] Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:371–7.
- [19] Wan X, Harkavy B, Shen N, Grohar P, Helman LJ. Rapamycin induces feedback activation of Akt signaling through an IGF-1R-dependent mechanism. *Oncogene* 2007;26:1932–40.
- [20] Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, et al. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest* 2008;118:3065–74.
- [21] Liu J, Stevens PD, Gao T. mTOR-dependent regulation of PHLPP expression controls the rapamycin sensitivity in cancer cells. *J Biol Chem* 2011;286(8):6510–20.
- [22] Nordin H, Jungnelius M, Karlsson R, Karlsson OP. Kinetic studies of small molecule interactions with protein kinases using biosensor technology. *Anal Biochem* 2005;340:359–68.
- [23] Glide. version 5.6, Schrödinger. New York, NY: LLC; 2010.
- [24] Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D, et al. Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol* 2009;7:371–83.
- [25] Borrelli K, Cossins B, Guallar V. Exploring hierarchical refinement techniques for induced fit docking with protein and ligand flexibility. *J Comput Chem* 2010;31:1224–35.
- [26] Miller AJ, Mihm Jr MC. Melanoma. *N Engl J Med* 2006;355:51–65.
- [27] Pan J, Cheng C, Verstovsek S, Chen Q, Jin Y, Cao Q. The BH3-mimetic GX15-070 induces autophagy, potentiates the cytotoxicity of carboplatin and 5-fluorouracil in esophageal carcinoma cells. *Cancer Lett* 2010;293:167–74.
- [28] Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 2004;117:2805–12.
- [29] Dalby KN, Morrice N, Caudwell FB, Avruch J, Cohen P. Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *J Biol Chem* 1998;273:1496–505.
- [30] Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/AKT – a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 2004;1697:3–16.
- [31] Tirion MM. Large amplitude elastic motions in proteins from a single-parameter, atomic analysis. *Phys Rev Lett* 1996;77:1905–8.
- [32] Jiang CC, Wroblewski D, Yang F, Hersey P, Zhang XD. Human melanoma cells under endoplasmic reticulum stress are more susceptible to apoptosis induced by the BH3 mimetic obatoclax. *Neoplasia* 2009;11(9):945–55.
- [33] Liu Q, Thoreen C, Wang J, Sabatini D, Gray NS. mTOR mediated anti-cancer drug discovery. *Drug Discov Today Ther Strateg* 2009;6:47–55.