



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL POTENCIAL
TERAPÉUTICO DE
COMPUESTOS DE ORIGEN
MARINO**

Jon Andoni Sánchez Salguero

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE VETERINARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

2016



DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

Facultad de Veterinaria
Campus universitario
27002 Lugo (Spain)
Tel.: +34 982 252 242
Fax: +34 982 252 195 · 982 252 242

Prof. Dr. D. **Luis M. Botana López**, Catedrático de Farmacología de la Universidad de Santiago de Compostela, como Director de la tesis titulada: “Estudio del potencial terapéutico de compuestos de origen marino”

Por la presente **DECLARO**:

Que la tesis doctoral presentada por Don **Jon Andoni Sánchez Salguero**, cumple las condiciones exigidas para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de *Estudios de Doctorado*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que el doctorando participó en la investigación, redacción y publicación durante el periodo de tutela.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta tesis será presentado por ninguno de ellos en otras tesis de Doctorado, lo que firmo bajo mi responsabilidad.



Prof. Dra. Dña. **Amparo Alfonso Rancaño**, como Directora de la tesis titulada:
“Estudio del potencial terapéutico de compuestos de origen marino”

Por la presente **DECLARO**:

Que la tesis doctoral presentada por Don **Jon Andoni Sánchez Salguero**, cumple las condiciones exigidas para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de *Estudios de Doctorado*, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que el doctorando participó en la investigación, redacción y publicación durante el periodo de tutela.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta tesis será presentado por ninguno de ellos en otras tesis de Doctorado, lo que firmo bajo mi responsabilidad.





AGRADECIMIENTOS

Dar las gracias a la Consellería de Cultura, Educación y ordenación universitaria da Xunta de Galicia por la concesión de la beca "Axudas de apoio á etapa predoutoral do Plan Galego de Investigación, Innovación e Crecemento (Plan 2IC)", que ha permitido la realización de esta Tesis, y también a todas las personas que de una manera u otra han hecho posible la realización de la misma.

A Luís, por haberme dado la oportunidad de hacer la Tesis en su grupo y demostrarme su cercanía.

Muy en especial a Mercedes Vieytes, principal responsable de que viniera a parar aquí, y que de no haber sido por ella, tal vez nunca hubiera abierto la puerta a la investigación.

¡Gracias Amparo! Sé que no ha sido nada fácil aguantarme. Gracias por tu paciencia, tus ánimos y el apoyo que me has mostrado en los momentos en los que ni yo creía en mi mismo... y también por decirme lo que no siempre quería escuchar.

A todos los profesores del departamento por haberme acogido como uno más desde el momento en el que entre por la puerta, sobre todo a Carmen Vale, por su trato cercano.

A todos mis compañeros, a los "viejos", Diego, Andrés, Sara, Silvia, Álvaro, María, Henar, Paz, Paula, la Roel, Ara, Andrea...y a los que acabáis de aterrizar. ¡Gracias a todos por los buenos momentos vividos tanto dentro, como fuera del departamento!

Gracias Eva por tu ayuda, sobre todo en estos últimos meses de la Tesis, haciéndome ver las cosas desde otra perspectiva en los momentos de caos.

A mis amigos de Bilbo, y como no, a los de Lugo, muy especialmente a Víctor, porque personas así no se encuentran todos los días. Juntos empezamos la carrera, continuamos con el doctorado y a pesar de que nuestros caminos se hayan separado sé que siempre te tengo ahí.

A Oliva y Adelina, porque habéis hecho sentir al "último vaquero" como uno más de vuestras familias, por todos los ratos de risas desconsoladas en el Km 75 que han hecho que me olvidase por un momento de mis preocupaciones, por eso, y por todo lo demás, gracias de verdad!

Gracias a mis abuelos y mis padres. Siempre habéis estado a mi lado apoyándome incondicionalmente y animándome a tirar hacia adelante y no rendirme...Esta Tesis os la dedico a vosotros.



RESUMEN

RESUMEN

La Tesis Doctoral “Estudio del potencial terapéutico de compuestos de origen marino” describe en profundidad el efecto de la autumnalamida, un compuesto obtenido de cianobacterias del género *Phormidium*, y de las gracilinas A, H, L y tetrahydroaplisulfurina-1, cuatro metabolitos secundarios aislados de la esponja marina *Spongionella gracilis* sobre los flujos iónicos de calcio (Ca^{2+}), uno de los mecanismos básicos implicados en la transmisión de la señal intracelular, y el papel de los reservorios intracelulares, mitocondria y retículo endoplasmático (ER). Además, se estudia la capacidad de estos compuestos para formar complejos con las ciclofilinas (Cyps). Por la implicación de ésta familia de proteínas en la regulación de procesos básicos en la célula, se profundiza en el estudio del efecto de estos compuestos sobre las Cyps y su influencia sobre enzimas como la calcineurina (CN), factores de transcripción, citocinas y receptores de membrana moduladas por las mismas.

Los efectos *in vitro* e *in vivo* mostrados por algunos de los compuestos de *Spongionella* sobre la modulación de los linfocitos T, ponen de manifiesto la capacidad reguladora de estos compuestos en la respuesta inmune celular, y por tanto, han servido como base para la síntesis de nuevas moléculas. De esta forma se pone de relevancia la utilidad de los compuestos de origen natural como fuente de compuestos activos y su valor como moléculas líderes para la síntesis de nuevas estructuras.

Palabras clave

Spongionella gracilis, cianobacterias, ciclofilinas, calcio, mecanismo de acción, linfocitos T.

RESUMO

A tese doutoral “Estudo do potencial terapéutico de compostos de orixe mariño” describe en profundidade o efecto da autumnalamida, un composto obtido de cianobacterias do xénero *Phormidium*, e das gracilinas A, H, L e tetrahydroaplisulfurina-1, catro metabolitos secundarios aislados da esponxa mariña *Spongionella gracilis* sobre os fluxos de calcio (Ca^{2+}), un dos mecanismos básicos implicados na transmisión das señais intracelulares, e o papel dos reservorios intracelulares, mitocondria e retículo endoplasmático (ER). Ademais, estúdase a

capacidade de estes compostos para formar complexos coas ciclofilinas (Cyps). Pola implicación de esta familia de proteínas na regulación de procesos básicos na célula, profundizase no estudo do efecto dos compostos sobre as Cyps e a súa influencia sobre enzimas como a calcineurina (CN), factores de transcripción, citocinas e receptores de membrana moduladas polas mesmas.

Os efectos *in vitro* e *in vivo* amosados por algúns dos compostos de *Spongionella* sobre a modulación dos linfocitos T, poñen de manifestó a capacidade reguladora de estes compostos na resposta inmune celular, e polo tanto, serviron como base para a síntese de novas moléculas. De esta maneira poñense de relevancia a utilidade dos compostos de orixe natural como fonte de compostos activos e o seu valor como moléculas líderes para a síntese de novas estruturas.

Palabras chave

Spongionella gracilis, cianobacterias, ciclofilinas, calcio, mecanismo de acción, linfocitos T.

SUMMARY

The Thesis "Study of the therapeutic potential of compounds of marine origin" describes in depth the effect of autumnalamida, a compound isolated from cyanobacteria of the genus *Phormidium*, and gracilins A, H, L and tetrahydroaplysulfurin-1, four secondary metabolites isolated from the marine sponge *Spongionella gracilis* on calcium (Ca^{2+}) ion fluxes, one of the basic mechanisms involved in intracellular signal transmission, and the role of intracellular stores, mitochondria and endoplasmic reticulum (ER). Furthermore, the ability of these compounds to form complexes with cyclophilins (Cyps) is studied. The involvement of this family of proteins in the regulation of basic processes in the cell delves into the study of the effect of these compounds on the Cyps and their influence on enzymes such as calcineurin (CN), transcription factors, cytokines and receptors membrane modulated by them.

The *in vitro* and *in vivo* effects exhibited by some of the *Spongionella* compounds over the modulation of T lymphocytes, shows a regulatory ability of these compounds in the cellular immune response, and therefore, have served as a basis for the synthesis

of new molecules. In this way, it becomes relevant the utility of the compounds of natural origin as a source of active compounds and its value as leading molecules for the synthesis of new structures.

Keywords

Spongionella gracilis, cyanobacteria, cyclophilins, calcium, mechanism of action, T lymphocytes.





ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADP:	adenosín difosfato ribosa
AID:	dominio auto-inhibitorio
ANT:	translocador de nucleótidos de adenina
ATP:	adenosín trifosfato
β A:	β -amiloide
Ca^{2+} :	calcio
CaM:	calmodulina
cAMP:	adenosín monofosfato cíclico
Ca_v :	canales de calcio dependientes de voltaje
cGMP:	guanosina monofosfato cíclico
CLD:	dominio de unión a la CsA
CN:	calcineurina
CnA:	calcineurina A
CnB:	calcineurina B
CsA:	ciclosporina A
Cyp A:	ciclofilina A
Cyp B:	ciclofilina B
Cyp D:	ciclofilina D
Cyps:	ciclofilinas
DAG:	diacilglicerol
DNA:	ácido desoxirribonucleico
ED ₅₀ :	dosis efectiva cincuenta
EMEA:	Agencia Europea de Medicamentos
EMMPRIN:	inductor de la metaloproteinasa de matriz

ER:	retículo endoplasmático
ETC:	cadena transportadora de electrones
FADH ₂ :	flavín adenín dinucleótido
FDA:	Food and Drug Administration
FK506:	tacrolimus
H ⁺ :	protones
H ₂ CX:	intercambiador calcio/protones
HVA:	canales con un umbral de activación alto
IC ₅₀ :	concentración inhibitoria cincuenta
Igs:	inmunoglobulinas
IL-2:	interleucina-2
IP ₃ :	inositol 1,4,5-trifosfato
IP ₃ R:	receptores inositol (1,4,5) trifosfato
JNK:	cinasa c-Jun N-terminal
K _D :	constante de disociación en el equilibrio
K _v :	canales de potasio dependientes de voltaje
LVA:	canales con un umbral de activación bajo
MAPK:	cinasas de proteína activada por mitógenos
mCU:	uniportador de calcio de la mitocondria
mPTP:	poro de permeabilidad transitoria mitocondrial
Na ⁺ :	sodio
nAChRs:	receptores nicotínicos de acetil colina
NADH:	nicotín adenín dinucleótido
Na _v :	canal de sodio dependiente de voltaje

NCKX:	cotransportador de potasio-calcio/sodio
NCX:	intercambiador sodio/calcio
NES:	secuencia de exportación nuclear
NFAT:	factor nuclear de linfocitos T activados
NHR:	región de homología del NFAT
NHX:	Na ⁺ / H ⁺
NLS:	secuencia de localización nuclear
NMDA:	N-metil-D-aspartato
OA:	ácido ocadaico
Orai1:	proteína 1 de los canales de Ca ²⁺ dependientes de reservorio
PiC:	transportador de fosfatos
PK:	quinasas de proteína
PLA ₂ :	fosfolipasa A ₂
PLC:	fosfolipasa C
PMCA ATPasas:	ATPasas de calcio de la membrana plasmática
PMM:	membrana plasmática mitocondrial
PP:	fosfatasas de proteína
PP1:	fosfatasas de proteína tipo 1
PP2A:	fosfatasas de proteína tipo 2A
PP2B:	fosfatasa de proteína tipo 2B
PPIasa:	peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerasa
PPIasa:	actividad peptidil-prolil isomerasa
RNA:	ácido ribonucleico
ROCCs:	canales de Ca ²⁺ operados por receptor

ROS:	especies reactivas de oxígeno
RyR:	receptores de rianodina
SAR:	relación estructura- actividad
SERCA:	ATPasas de calcio del retículo endoplasmático
SMOCs:	canales operados por segundos mensajeros
canales SOC:	canales de calcio dependientes de reservorio
STIM:	proteínas de interacción con el estroma
TAD:	dominio transactivador amino-terminal
TM:	proteína transmembrana
TRP:	canales de potencial receptor transitorio
TTX:	tetrodotoxina
VDAC:	canales aniónicos dependientes de voltaje
VIH:	virus de la inmunodeficiencia humana
VOCCs:	canales de calcio operados por voltaje
YTX:	yesotoxina

NOTA: Se decidió mantener las abreviaturas desde el inglés para dar continuidad al texto con algunas de las imágenes y con los artículos.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Compuestos de origen marino.....	3
1.1.1 Compuestos con actividad farmacológica aislados a partir de microorganismos	4
1.1.1.1 Compuestos aislados a partir de bacterias	4
1.1.1.2 Compuestos aislados a partir de cianobacterias	7
1.1.1.3 Compuestos aislados a partir de microalgas	8
1.1.1.4 Compuestos aislados a partir de hongos	11
1.1.2 Compuestos con actividad farmacológica aislados a partir de moluscos.....	12
1.1.3 Compuestos con actividad farmacológica aislados a partir de esponjas	13
1.1.4 Compuestos con actividad farmacológica aislados a partir de tunicados	16
1.1.5 Compuestos con actividad farmacológica aislados a partir de peces.....	18
1.2 Vías de señalización celular	21
1.2.1 Calcio	23
1.2.1.1 Mecanismos celulares que aumentan la concentración de calcio citosólico	24
1.2.1.1.1 Canales de entrada de calcio desde el medio extracelular	25
1.2.1.1.2 Mitocondria.....	29
1.2.1.1.3 Retículo endoplasmático.....	35
1.2.1.2 Mecanismos de descenso de la concentración de calcio citosólico.....	37
1.2.2 Ciclofilinas	37
1.2.2.1 Ciclofilina D.....	39
1.2.2.2 Ciclofilina A	41
1.2.2.2.1 Funciones intracelulares de la ciclofilina A.....	41
1.2.2.2.2 Funciones extracelulares de la ciclofilina A.....	48
2. OBJETIVO.....	51
3. PUBLICACIONES	55
4. DISCUSIÓN	127
5. CONCLUSIONES	143
6. BIBLIOGRAFÍA.....	147



1. INTRODUCCIÓN

1.1 COMPUESTOS DE ORIGEN MARINO

La biodiversidad en los océanos es muy superior a la de la tierra. Acogen alrededor de un millón de especies multicelulares (vegetales y animales) y aproximadamente un billón de organismos unicelulares, lista que sigue aumentando año tras año con el descubrimiento de nuevos organismos [1]. La gran diversidad genética y biológica presente en los ecosistemas marinos ofrece, por tanto, la oportunidad de obtener compuestos naturales con actividad sobre distintas dianas celulares y moleculares. Los organismos marinos han desarrollado adaptaciones para su comunicación y defensa mediante la producción de una gran variedad de compuestos químicos. De esta forma pueden sobrevivir en un entorno extremadamente competitivo. Teniendo en cuenta que aproximadamente la mitad de los compuestos que llega a comercializar la industria farmacéutica son de origen natural, o sintetizados en base a estructuras naturales, los compuestos de origen marino suponen una fuente importante de moléculas para el desarrollo de nuevos fármacos [2]. No obstante, hasta el momento sólo se han aislado unos 15.000 compuestos químicos activos con este origen. Esto corresponde solamente a una décima parte de los compuestos terrestres.

No es muy frecuente encontrar referencias en farmacología sobre medicamentos de origen marino. En el año 1900 se comercializó el primer producto con este origen, el ácido kaínico, un derivado del ácido glutámico. Este compuesto, aislado a partir de extractos de algas pardas, fue empleado como insecticida y antihelmíntico [3]. En el año 1950 se aislaron nucleósidos de espongouridina y espongotimidina de la esponja marina *Cryptotethya cripta*. En la década de los cincuenta también se aislaron la cefalosporina C a partir de un hongo marino y la pentabromopseudilina, otro antibiótico obtenido de bacterias marinas [4, 5]. Sin embargo, la carrera en el descubrimiento de organismos marinos como fuente de compuestos bioactivos no empezó a explotarse en serio hasta 1960 [6].

En la actualidad, aproximadamente un 38% de los compuestos marinos con actividad farmacológica proceden de microorganismos, incluyendo bacterias, protozoos, hongos o microalgas, seguido del 20% que se obtiene de esponjas marinas y corales, siendo el filo Porifera uno de los que más moléculas bioactivas aportan dentro de este grupo. Sin embargo, aunque tienen menor peso, las algas, peces, celenterados, moluscos y equinodermos también son origen de compuestos con interesante actividad a partir de

los cuales se obtienen moléculas activas [7]. Todos estos organismos producen compuestos con usos tan variados como antivirales, anticancerígenos, inmunomoduladores, antifúngicos, antiinflamatorios o neuroprotectores, entre otros [8]. A continuación se describen algunos de los compuestos con actividad farmacológica aislados a partir de organismos marinos clasificados en función de su origen.

1.1.1 Compuestos con actividad farmacológica aislados a partir de microorganismos

El concepto microorganismo engloba a todos los organismos que poseen un tamaño microscópico. Este término carece de cualquier implicación taxonómica o filogenética dado que abarca tanto a organismos unicelulares como pluricelulares, procariotas, como las bacterias, o eucariotas, estos últimos incluyen a parte de las algas y hongos. Esta clasificación se utiliza seguidamente para revisar los compuestos con actividad farmacológica obtenidos a partir de microorganismos.

1.1.1.1 Compuestos aislados a partir de bacterias

Las bacterias son productoras de compuestos con una amplia diversidad molecular y ofrecen estructuras con esqueletos de carbono novedosos y diferentes a la biota que habita tierra firme. Estos microorganismos pueden encontrarse en una gran variedad de hábitats; desde los sedimentos del suelo marino hasta en simbiosis con organismos multicelulares como macroalgas, corales o esponjas. De las bacterias se han aislado algunos compuestos muy interesantes, algunos ya en el mercado y otros con potencial para formar parte de la lista de fármacos aprobados para el tratamiento de enfermedades humanas, siendo *Streptomyces*, *Salinospora*, *Micromonospora* o *Verrucosipora* los principales géneros de bacterias productores de compuestos con actividad farmacológica [9].

La salinosporamida A (NPI-0052) es una β -lactona- γ -lactámica aislada de bacterias de las especies *Salinospora tropica* y *Salinospora arenicola* localizadas en sedimentos marinos [10]. Este compuesto de origen marino tiene relación estructural con la omuralida (bortezomib), un compuesto de origen terrestre que se aisló de *Streptomyces sp.*. Esta molécula había sido descrita como la única capaz de inhibir el proteosoma 20S

de forma específica sin afectar a otras actividades proteasa de la célula y por lo tanto inducir la muerte celular por apoptosis [11, 12]. Sin embargo, la salinosporimida A tiene una potencia 35 veces mayor a la de la omuralida, y aunque también actúa inhibiendo el proteosoma 20S parece hacerlo a través de otro mecanismo de acción distinto [13]. En la actualidad se encuentra en fase I de ensayo clínico como anticancerígeno comercializado por Nereus Pharmaceutical (San Diego, CA, USA) bajo el nombre de Marizomib[®] para el tratamiento contra el mieloma múltiple refractario como alternativa al tratamiento con bortezomib [14].

La diazepinomicina (ECO-4601) es un alcaloide aislado de algunas cepas saprófitas de *Micromonospora sp.* [15]. Presenta actividad antitumoral de amplio espectro y citotoxicidad a concentraciones en el rango nanomolar sobre 60 líneas del panel de líneas celulares tumorales del Instituto Nacional del Cáncer (USA). El ECO-4601 ya ha conseguido resultados *in vivo* muy prometedores frente a líneas tumorales de glioma, cáncer de mama y próstata en modelos animales [16]. Este compuesto ha superado todos los estudios preclínicos y se encuentra en fases clínicas como terapia contra el glioblastoma en Canadá [17].

La dolastatina 10 es otro de los compuestos con actividad antitumoral más remarcables producidos por bacterias. Se trata de un pentapéptido natural que originariamente fue aislado de un gasterópodo, *Dolabella auricularia* en 1972 [18]. Se han tardado 15 años en la determinación completa de su estructura debido que el compuesto activo se encontraba en concentraciones muy bajas en el gasterópodo del que procedía originariamente; de 1 tonelada de biomasa de este molusco sólo se conseguían obtener 29 mg de dolastatina 10. Posteriormente, este compuesto se aisló de las cianobacterias marinas de *Symploca hydroides* y *Lyngbya majuscula*, ambas especies alimento del molusco. A partir de ese momento fue posible avanzar en el estudio de esta molécula [19]. Este compuesto es uno de los agentes antiproliferativos conocidos más potentes con una dosis efectiva cincuenta (ED_{50}) en el rango picomolar sobre diferentes líneas celulares tumorales. Su mecanismo de acción se basa en la interacción e inhibición del ensamblaje de los microtúbulos de tubulina produciendo un bloqueo en la metafase del ciclo celular, además de inducir apoptosis a través de la fosforilación de la proteína Bcl-2 [20-22]. Si bien, los ensayos clínicos con este compuesto comenzaron en la década de los noventa, tardaron poco tiempo en

abandonarse al observar que tenía efectos neurocitotóxicos graves [23]. Sin embargo, este compuesto natural fue el punto de partida para la síntesis de un compuesto derivado como es la auristatina E (TZT-1027). Este compuesto entró en fase clínica de ensayo II con resultados muy prometedores, aunque, también tenía efectos muy tóxicos y no presentaba los mismos resultados que se habían obtenido *in vitro* [24]. Gracias al progreso tecnológico en el desarrollo de fármacos conjugados con anticuerpos se han hecho combinaciones de la auristatina E con un anticuerpo dirigido al receptor CD30 (muy expresado en ciertos tipos de tumores), dando lugar al brentuximab vedotin o SGN-35. Con él se ha conseguido solventar la toxicidad del compuesto natural y el análogo del que procede, además es un fármaco muy efectivo como tratamiento del linfoma de Hodgkin y el linfoma sistémico de células grandes. Este fármaco ha sido uno de los últimos de origen marino que ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) bajo el nombre comercial de Adcetris® producido por Seattle Genetics (Bothell, WA, USA) [25]. Si bien hasta la fecha, en el mercado sólo se encuentra el brentuximab vedotin, existen otros compuestos derivados de la auristatina E como el glembatumumab vedotin o CDX-011, que se encuentra en fase clínica de desarrollo II, el ASG-5ME que aún está en fase I y el SGN-75, derivado de la auristatina F, también en fase I de desarrollo clínico [26].

La mayoría de los esfuerzos de la industria farmacéutica en la actualidad se centran, sobre todo, en el desarrollo de fármacos contra el tratamiento del cáncer y otras enfermedades crónicas. Desde la década de los ochenta apenas se han comercializado antibióticos nuevos. En el caso de los antibióticos, la rentabilidad que la industria farmacéutica puede obtener de los mismos es mucho menor en comparación con otros compuestos empleados en el tratamiento de enfermedades crónicas debido a las resistencias que se desarrollan con su uso en el tiempo. Esto se ha convertido en un grave problema, ya que en la actualidad existen muchas bacterias causantes de infecciones que presentan resistencia a todos los antibióticos presentes en el mercado. A partir de las bacterias marinas se han aislado algunos compuestos con propiedades antibióticas extraordinarias frente a agentes bacterianos que en la actualidad presentan resistencia a todos los antibióticos conocidos [27]. La abisomicina C fue aislada a partir del actinomiceto *Verrucosipora sp.* [28]. Este compuesto es un policétido policíclico

que actúa como potente inhibidor de la síntesis del ácido *p*-aminobenzóico, inhibiendo por tanto la síntesis de ácido fólico en estadios más precoces que otros antibióticos comerciales como las sulfamidas. No sólo es efectivo frente a bacterias Gram-positivas sino que además es eficaz frente a cepas de *Staphylococcus aureus* que presentan multiresistencia antibiótica [29]. La marinomicina A es un compuesto aislado de cepas CNQ-140, pertenecientes a la familia *Marinospora*, que habitan el sedimento marino. Este macrólido presenta una actividad antibiótica muy potente frente al *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y al *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina [30]. La antracimicina aislada de *Streptomyces sp.* es, como la abisomicina A, otro antibiótico policétido muy potente frente a bacterias Gram-positivas de los géneros *Staphylococci*, *Enterococci* y *Streptococci*. Además, presenta actividad antibacteriana frente a la cepa UM23C1-1 de *Bacillus anthracis*, el agente causal del carbunco en animales y ocasionalmente en humanos. Aunque su mecanismo de acción aún no se ha dilucidado por completo, se sabe que este compuesto actúa inhibiendo la síntesis de ácido desoxirribonucleico (DNA) y del ácido ribonucleico (RNA) [31, 32].

1.1.1.2 Compuestos aislados a partir de cianobacterias

Las cianobacterias son microorganismos procariotas fotosintéticos que presentan una distribución global, pudiendo encontrarse en una gran variedad de ambientes; desde aguas oceánicas o continentales hasta tierra firme y adaptarse a condiciones extremas [33]. Pueden presentarse en forma de organismos unicelulares libres, o formando colonias [34]. Las cianobacterias se caracterizan por producir una gran cantidad de metabolitos secundarios, algunos de los cuales pueden resultar extremadamente tóxicos para los humanos y otros animales como la anatoxina-a, la microcistina, la lingbiatoxina o la saxitoxina entre las más comunes [35-37]. Dentro de este filo encontramos una amplia diversidad, destacando el género *Phormidium* con aproximadamente 200 especies catalogadas. Las distintas especies del género *Phormidium* presentes en aguas dulces se caracterizan por tener una forma cilíndrica simple con filamentos sin ramificar y formando racimos irregulares o colonias con tricomas dispuestos más o menos de forma paralela. Las vainas que forman los filamentos son delgadas, hialinas y se encuentran normalmente unidas a sustratos firmes. *Phormidium autumnale* se encuentra normalmente en las corrientes de los ríos, zonas de saltos de agua, muelles

constantemente húmedos, o suelos temporalmente encharcados [38]. Hasta la fecha, las principales aplicaciones de este género han sido fundamentalmente el uso en alimentación, en el tratamiento de desechos orgánicos procedentes de la ganadería, la acuicultura o la industria. Esto se debe a su capacidad de extraer nutrientes de los efluentes y transformar contaminantes, como fenoles o hidrocarburos, en productos no tóxicos. Además de su capacidad de producir hidrógeno o biodiesel [39, 40]. La extracción y estudio de compuestos activos a partir de las distintas especies del género *Phormidium*, sin embargo, no ha centrado tanto interés. Algunos de los compuestos bioactivos extraídos del éste género han mostrado tener actividad antimicrobiana, antiviral o propiedades antioxidantes [41-43]. Hasta el momento, a partir de *Phormidium autumnale* se han aislado diferentes pigmentos, algunos de ellos con una capacidad antioxidante mayor a la de la vitamina A [44]. A partir de cultivos de esta especie se ha obtenido una molécula natural, la autumnalamida, de la que se desconoce su mecanismo de acción y que será objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral. La autumnalamida es un compuesto cíclico prenilado, es decir, con moléculas hidrofóbicas en su estructura. Presenta un peso molecular de 901.49 Da y una fórmula molecular $C_{46}H_{64}N_{10}O_9$ (Figura 1).

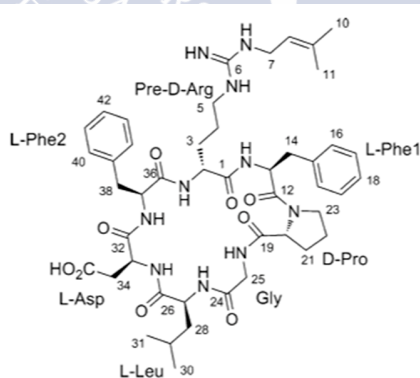


Figura 1. Estructura química de autumnalamide aislada a partir de *Phormidium autumnale*.

1.1.1.3 Compuestos aislados a partir de microalgas

Las microalgas son organismos eucariotas autótrofos. Algunos de estos microorganismos produce metabolitos secundarios con actividad tóxica. A pesar de éste

efecto se observó que estas moléculas presentaban dianas celulares muy interesantes con aplicación en el tratamiento de muchas enfermedades. Así, de estos organismos se han aislado gran cantidad de estructuras con mecanismos de acción muy diversos y con diferentes aplicaciones, no sólo terapéuticas, sino como herramientas para la caracterización de otros compuestos y dianas celulares [45].

La tetrodotoxina (TTX) es una toxina paralizante que se encuentra en las vísceras de muchas especies de peces tetraodóntidos y dióntidos, como el pez globo. Tradicionalmente la TTX se ha asociado al pez globo, animal en el que se aisló por primera vez en 1950, aunque también se ha detectado en una amplia variedad de artrópodos, equinodermos, moluscos, gusanos planos y anfibios [46, 47]. Además, la TTX también se ha aislado del dinoflagelado de la especie *Alexandrium tamarense* [48]. Esta biotoxina se une al sitio 1 del canal de sodio dependiente de voltaje (Na_v) produciendo el bloqueo del mismo e impidiendo por tanto la entrada de sodio (Na^+) al interior de la célula [49]. La TTX se usa como herramienta farmacológica para la identificación y clasificación de canales de sodio dependientes de voltaje por la implicación que estos canales tienen en enfermedades cardíacas, la epilepsia o el dolor [50]. En función de la sensibilidad al bloqueo de esta toxina, los canales de sodio se clasifican como sensibles o resistentes a TTX [51, 52]. Mientras los resistentes a TTX están implicados en el dolor neuropático, los sensibles a TTX además están también relacionados con la inflamación y la epilepsia [53]. En la actualidad esta molécula está en fase clínica III de desarrollo registrada bajo la marca Tectin[®] por la empresa canadiense WEX Pharmaceuticals como tratamiento contra el dolor neuropático [26].

El ácido ocadáico (OA) es una toxina diarreica producida por dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* y *Prorocentrum*. Fue aislada por primera vez en 1976 de la esponja *Holichondria okadai*, pero su estructura no se dilucidó hasta seis años después [54, 55]. El OA es uno de los inhibidores mejor estudiados, más potentes y selectivos de las fosfatasas de proteína tipo 1 (PP1) y sobre todo de la tipo 2A (PP2A) [56]. El OA se usa como herramienta farmacológica en el estudio de la señalización intracelular por la implicación que estas fosfatasas de proteína juegan en la misma [57, 58]. Recientemente se ha apuntado también a esta ficotoxina marina como una posible herramienta para diseñar modelos biológicos para el estudio de la enfermedad del Alzheimer por la

clínica de las alteraciones neurológicas que induce el OA, que simulan a las de esta enfermedad [59].

Los espirólidos se encuentran recogidos dentro del grupo de las iminas cíclicas y están producidos por dinoflagelados de la especie *Alexandrium ostenfeldii* [60]. Principalmente actúan sobre las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 2\beta 4$ de los receptores nicotínicos de acetil colina (nAChRs), ejerciendo sobre estos un fuerte antagonismo [61, 62]. Además, se ha descrito que también actúan disminuyendo la función de los receptores colinérgicos muscarínicos y modifican el número de receptores presentes en las membranas celulares [63]. Los nAChRs tienen una gran expresión en los tejidos nerviosos, encontrándose alterados en algunas patologías del sistema nervioso como la enfermedad de Alzheimer. La hipótesis colinérgica ha sido muy estudiada en los últimos veinte años como diana en el tratamiento de esta enfermedad. En el caso del 13-desmetil espirólido-C, hay estudios *in vitro* que indican su eficacia reduciendo dos de las alteraciones más representativas de esta patología como son la hiperfosforilación de tau y la proteína β -amiloide (βA) en cultivos neuronales e *in vivo* en un modelo de ratón triple transgénico para esta enfermedad [64-66]. En base a estos resultados, los espirólidos se han patentado como moléculas activas frente a alteraciones neurodegenerativas donde las proteínas βA y tau están implicadas [67].

La yesotoxina (YTX), es un éter policíclico producido por dinoflagelados de las especies *Protoceratium reticulatum* [68], *Lingulodinium polyedrum* [69] y *Gonyaulax spinifera* [70]. Inicialmente, esta ficotoxina se clasificó en el grupo de las diarreas porque eran extraídas de los moluscos junto con otras toxinas que producían diarrea como el OA [71]. Sin embargo, se ha demostrado que la YTX no causa diarrea [72], no inhibe fosfatasa de proteína [72] y tras la administración oral en ratón no resulta letal [73]. Aunque el mecanismo de acción de la YTX no está completamente caracterizado por ser un compuesto que actúa sobre muchas dianas celulares, se sabe que es un potente modulador de las fosfodiesterasas [74-76]. Además, recientemente se ha descrito que la YTX tiene propiedades anticancerígenas al disminuir la proliferación celular en distintas líneas celulares tumorales y se ha patentado como posible fármaco para el tratamiento del glioma y otro tipo de tumores [77-79].

El gambierol se aisló por primera vez en 1993 a partir de cultivos del dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus*. Las características estructurales de este producto natural

incluyen un esqueleto poliéter octacíclico en forma de escalera y una cadena lateral que contiene un grupo trieno parcialmente conjugado. Pese a que los estudios biológicos, incluyendo el estudio del mecanismo de acción del gambierol se han prolongado en el tiempo, en parte debido a la escasez de toxina procedente de fuentes naturales [80], la síntesis química del compuesto ha permitido avanzar en el estudio de su actividad biológica [81-84]. Los primeros estudios sobre el mecanismo de acción del gambierol demostraron que este compuesto inhibía la unión de la brevetoxina al sitio 5 de los Na_v , lo que llevó a sugerir que este sitio de unión era común para ambas toxinas [85]. Posteriormente se describió que el gambierol actuaba como agonista parcial de los Na_v en células de neuroblastoma humano y aumentaba la concentración de Ca^{2+} citosólico [86]. Si bien, más tarde se demostró que el principal efecto del gambierol es el bloqueo de los canales de potasio dependientes de voltaje (K_v) estabilizando el canal en su estado cerrado [87, 88]. Debido a la implicación de estos canales en algunas enfermedades neurodegenerativas se estudió el efecto del gambierol como un potencial agente terapéutico. Así, se ha descrito el efecto beneficioso de este compuesto sobre un modelo animal triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer, donde ha mostrado tener efectos beneficiosos modulando dos de las alteraciones típicas de esta enfermedad, la proteína tau y βA , además de bloquear los K_v 3.1 [89]. El efecto sobre estos canales está muy relacionado con las enfermedades autoinmunes. Esto abre una puerta para el estudio de este compuesto en el tratamiento de enfermedades como la artritis reumatoide o la diabetes mellitus tipo I [90].

1.1.1.4 Compuestos aislados a partir de hongos

Al igual que las bacterias, parte de los hongos se consideran microorganismos. Estos pueden encontrarse formando parte de los sedimentos marinos, las rocas, o muchas veces asociados a organismos multicelulares como corales o esponjas. La cefalosporina C, se aisló en 1950 de un hongo marino *Acremonium chrysogenum*, y en la actualidad aún esta en uso clínico como antibiótico. Este compuesto fue uno de los primeros fármacos de origen marino [91].

La halimida es una dicetopiperazina, con una estructura relativamente simple descubierta en 1998 a partir del hongo marino *Aspergillus ustus*, aislado del alga *Halimeda lacrimosa* y con buenos resultados como anticancerígeno [92, 93]. Este

compuesto actúa produciendo la despolimerización de los microtúbulos celulares [93]. Basándose en esta estructura natural se ha sintetizado un análogo conocido como plinabulina (NPI-2358). Este compuesto actúa uniéndose entre la región α y β de la tubulina, inhibiendo la polimerización de la misma. Esto da lugar a una desestabilización del endotelio vascular del tumor produciendo la muerte celular por apoptosis al reducir la circulación sanguínea [94, 95]. En el año 2006 Nereus Pharmaceutical (San Diego, CA, USA) comenzó los ensayos en fase clínica I como tratamiento de linfomas. En el año 2009 entró en fase clínica I/II para el tratamiento contra del cáncer de pulmón no microcítico.

1.1.2 Compuestos con actividad farmacológica aislados a partir de moluscos

Dentro del filo Mollusca, el género *Conus* es uno de los que más moléculas activas produce. Engloba a más de 500 especies diferentes productoras de toxinas peptídicas conocidas como conotoxinas. Actualmente, las conotoxinas son un grupo de moléculas que acaparan gran interés por sus resultados en el tratamiento de dolencias como la epilepsia, el dolor crónico o las alteraciones motoras [96]. Estos venenos peptídicos son usados por los moluscos para inmovilizar a sus presas. Normalmente actúan bloqueando canales dependientes de ligando y de voltaje con una gran especificidad. Estos canales se encuentran muy conservados en los organismos eucariotas superiores, de ahí el gran efecto de los compuestos peptídicos [97]. Cabe destacar las α - y la ψ -conotoxinas como ligandos de los nAChRs, las ω -conotoxinas que actúan bloqueando diferentes tipos de canales dependientes de voltaje como los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) y K_v o la conantokina-G y la -T, antagonistas de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) [96-98]. Como ejemplo se puede citar la ziconotida, un péptido sintético de 25 aminoácidos conocido comercialmente como Prialt[®], comercializado por la empresa farmacéutica Elan Corporation (Dublín, Irlanda), que lo produce de forma sintética. Esta molécula es una ω -conotoxina MVIIA aislada de *Conus magnus* [99]. La ziconotida fue aprobada por la FDA en el año 2004 y por la EMEA en 2005 como alternativa a otros analgésicos para el tratamiento del dolor severo crónico. Concretamente, la ziconotida actúa bloqueando los Ca_v tipo N y tiene una potencia analgésica 1000 veces mayor que la morfina [100]. Existen otras moléculas como la

leconotida, que también es una ω -conotoxina CVID formada por 27 residuos de aminoácidos con tres enlaces cis-cis. Al igual que la ziconotida, actúa bloqueando los Ca_v y por tanto se usa como analgésico. Se encuentra en fase clínica I y aunque hasta ahora la vía de administración haya sido como en el caso de la ziconotida, intraperitoneal, se están realizando ensayos para ver su eficacia tras la administración por otras vías [26].

1.1.3 Compuestos con actividad farmacológica aislados a partir de esponjas

Las esponjas son organismos invertebrados multicelulares que viven adheridos a sustratos sólidos. Estos organismos pertenecientes al filo Porifera son seres vivos exclusivamente acuáticos que poseen una estructura simple de canales a través de los cuales hacen circular el agua atrapando los microorganismos y la materia orgánica de la que se alimentan [101]. Se caracterizan por presentar una distribución muy amplia y estar adaptados a ambientes muy dispares en cuanto a salinidad, temperatura y presión, motivo por el cual existe una gran diversidad de especies. Existen unas 15.000 especies catalogadas pero se cree que el número es mucho mayor. De todo este grupo sólo un 1% se encuentra en aguas dulces. Por su condición sésil han desarrollado mecanismos químicos de defensa muy potentes para protegerse de otras especies invasoras que compiten por su mismo entorno o simplemente para protegerse de agentes infecciosos, de la contaminación biológica o del ataque de predadores [101]. Los metabolitos secundarios que producen, resultan por tanto cruciales en su supervivencia, hecho que les ha permitido mantenerse durante millones de años y llegar hasta nuestros días. Esto ofrece la posibilidad de aislar y obtener una gran cantidad de compuestos bioactivos con mecanismos de acción muy interesantes y que pueden ser empleados en diferentes áreas terapéuticas como el cáncer, enfermedades degenerativas, como antivirales, antifúngicos o antiinflamatorios.

El mesilato de eribulina (E7389) es un macrólido derivado de la halicondrina B. La halicondrina B fue aislada en el año 1985 en Nueva Zelanda de la esponja marina *Halichondria okadai* [102]. Los estudios con el compuesto natural se abandonaron debido a la dificultad para obtenerlo del medio natural. Sin embargo, en el año 1998 se produjo el mesilato de eribulina, con una estructura más sencilla que el compuesto

natural del que procedía y con la misma actividad [103]. Este compuesto derivado fue aprobado por la FDA en el año 2010 y la EMEA en el año 2011 como tercera línea de tratamiento del cáncer de mama recidivante [104]. Es comercializado por la farmacéutica Eisai (Tokio, Japón) bajo el nombre de Halaven[®]. Actúa inhibiendo el crecimiento de los microtúbulos y forma agregados de tubulina no productivos dando lugar a un bloqueo del ciclo celular en la fase G2/M e induciendo la muerte celular por apoptosis [105-108].

La espongotimidina y espongouridina son moléculas naturales aisladas de la esponja marina *Cryptotethia crypta*. Esta esponja fue descubierta por primera vez en las costas de Florida por Werner Bergmann en 1945. A principios de 1950 se aislaron y dilucidaron completamente las estructuras de estos dos nucleósidos que presentan la particularidad de tener arabinosa en lugar de ribosa en su estructura [109]. Aproximadamente 10 años después de su aislamiento, se sintetizaron varios análogos derivados de estas estructuras naturales [110]. En el caso de la citarabina o Ara-C, se observó que era un potente agente anticancerígeno contra la leucemia aguda humana [111]. Este compuesto fue aprobado en el año 1969 por la FDA. En la actualidad lo comercializan como Cytosar-U[®] y Depocyt[®] las empresas Bedford (USA) y Enzon (USA). El mecanismo de acción de este agente consiste en la unión del compuesto a la doble hélice de DNA, inhibiendo su síntesis. Una vez dentro de la célula este compuesto se transforma en un derivado trifosfato con efecto citotóxico que pasa a formar parte de la cadena de DNA recién sintetizada. De este modo interfiere con las DNA polimerasas bloqueando su funcionamiento [112]. Actualmente la citarabina es el compuesto más efectivo para combatir la leucemia mieloide crónica y otras alteraciones hematológicas [113, 114]. En el caso del nucleósido espongouridina, se comprobó que tenía efectos antivirales contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tipo I y tipo II con una concentración inhibitoria cincuenta (IC₅₀) de 0,25 y 0,5 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$, respectivamente [115, 116]. Esta molécula de origen natural se ha utilizado como molde para la síntesis de la vidarabina o Ara-A, mejorando así la actividad anti-VIH de la molécula natural. Una vez dentro de la célula, este compuesto se transforma en adenina arabinósido trifosfato, el cual se une a la cadena de DNA viral e impide el avance de la DNA polimerasa [117]. La vidarabina se aprobó por la FDA en 1976 como el primer nucleósido anti-VIH con origen marino bajo el nombre comercial Vira A[®]. King

Pharmaceuticals, empresa que lo comercializaba, lo descatalogó en el año 2001 por la aparición de nuevos compuestos más efectivos y con una venta terapéutica mayor que la de este fármaco [118, 119].

Además de estos tres compuestos que han llegado a comercializarse, en los últimos doce años se han obtenido una gran cantidad de compuestos activos a partir de esponjas, con el filo Porifera a la cabeza, por ser el que más estructuras activas ha aportado. Dentro de las estructuras químicas caracterizadas, los terpenos representan el segundo grupo más abundante con un 23% del total de los compuestos aislados de esponjas. En el caso de la esponja marina *Spongionella gracilis*, se han obtenido varios norditerpenos denominados gracilinas. Se han descrito la gracilina A, H, L y la tetrahidroaplisulfurina-1, todos ellos con una inusual fracción diacetoxihexahidrodifuro[2,3-b;3',2'-d]furano-2-ona en su estructura [120]. La estructura de estos cuatro compuestos se muestra en la Figura 2.

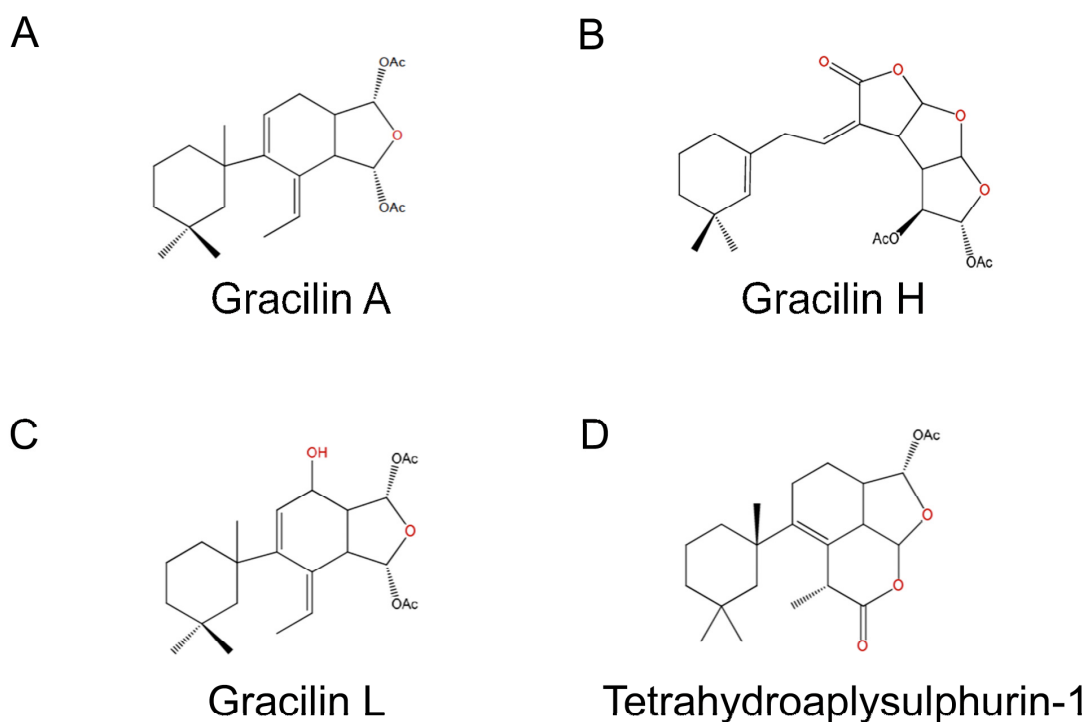


Figura 2. Estructura química de los compuestos derivados de *Spongionella*. A. gracilina A B. gracilina H C. gracilina L D. Tetrahydroaplisulfurina- 1.

Las gracilinas se conocen desde hace más de tres décadas, sin embargo, existen pocos estudios sobre su actividad biológica, su mecanismo de acción o su posible potencial terapéutico. La gracilina A fue el primer compuesto aislado de la esponja *Spongionella gracilis* en el año 1985 [121]. Ésta se ha descrito como un potente inhibidor de la fosfolipasa A₂ (PLA₂), enzima que juega un papel fundamental en los procesos inflamatorios y que interviene en el mecanismo de acción de algunos venenos de artrópodos y reptiles; por tanto, tiene posibles propiedades antiinflamatorias y como antídoto frente a dichas intoxicaciones [122]. Además de la gracilina A, se sabe que la gracilina H, L y la tetrahydroaplysulfurina-1, son citotóxicas en la línea linfoblástide de leucemia mieloide crónica humana y en las células mononucleares de sangre humana [120]. Además se ha observado que inhiben el receptor tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico, siendo la gracilina L la más potente de todas ellas. Este hallazgo indica por tanto el potencial efecto anticancerígeno de estos compuestos [120]. Más recientemente se ha descrito que este grupo de compuestos tiene la característica de actuar como agentes antioxidantes, preservando a las neuronas corticales de ratón del estrés oxidativo *in vitro* [123]. Además, tienen efecto sobre dos modelos celulares de neuroblastoma; BE(2)-M17 y SH-SY5Y-TMHT441, reduciendo la hiperfosforilación de tau y β-secretasa e inhibiendo las cinasas reguladas por señales extracelulares. Las gracilinas H y L, también han mostrado efectos positivos *in vivo* empleando un modelo de ratón triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer. Estos hallazgos señalan a estos compuestos como posibles candidatos a fármacos antialzheimer [124]. Sin embargo, el efecto de las gracilinas y la tetrahydroaplisulfurina-1 sobre las vías de señalización intracelular es desconocido, al igual que su mecanismo de acción y es objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral.

1.1.4 Compuestos con actividad farmacológica aislados a partir de tunicados

Los tunicados son un subfilo de animales encuadrado dentro del filo de los cordados, el mismo del que forman parte los vertebrados. Comprenden aproximadamente unas 2800 especies, todas ellas marinas y pueden tener vida libre o sésil, formar colonias o encontrarse de manera aislada [125]. Dentro de este grupo se

encuentran algunos de los compuestos anticancerígenos que recientemente han entrado a formar parte del mercado.

La ecteinascidina 743, también conocida con el nombre genérico de trabectedina o ET-743 es un compuesto aislado originariamente de un tunicado, *Ecteinascidia turbinata*, que habita en el Caribe [126]. Se han tardado más de 30 años en dilucidar su estructura debido a que este compuesto se encuentra en concentraciones muy bajas en el tunicado del que procede, de una tonelada de estos animales se extrae tan solo 1 g de compuesto [127, 128]. Esta molécula es un alcaloide que posee tres anillos tetrahidroisoquinolínicos. Los efectos antitumorales fueron descritos por primera vez en la década de los noventa [129]. La singularidad de su estructura y la actividad que presentaba frente a diferentes líneas celulares tumorales con diferentes orígenes en modelos *in vitro* e *in vivo* hicieron que se seleccionara para iniciar las fases clínicas una vez se había asegurado la producción del compuesto de forma semisintética [126]. En el año 2007 la trabectedina obtuvo la aprobación por la EMEA para su uso como fármaco frente a sarcomas de tejido blando como alternativa a otros tratamientos bajo el nombre de Yondelis[®] y comercializado por PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid, España). Dos años después se aprobó también su uso en combinación con la doxorrubicina para el tratamiento de pacientes con cáncer de ovario recidivante sensible al platino. Su mecanismo de acción parece ser diferente a todos los descritos hasta el momento para otros agentes usados como antitumorales que actúan dañando el DNA. La mayoría de los agentes alquilantes lo hacen uniéndose a la guanina en la posición N7 o O6 en el surco mayor. La trabectedina, sin embargo, lo hace uniéndose al grupo amino N2 de las guaninas en el surco menor del DNA de forma covalente. Esto provoca una torsión anormal de la doble hélice hacia el surco mayor. La unión al DNA impide la reparación por escisión de nucleótidos acoplada a la transcripción induciendo la apoptosis a través de un mecanismo de acción independiente al p53. Además actúa inhibiendo la transcripción de ciertos genes inducibles y provoca la detención del ciclo celular en la fase G2/M [130, 131].

La plididepsina es un depsipéptido cíclico aislado del tunicado *Aplidium albicans*. Este compuesto presenta una potencia antitumoral mucho mayor a la didemina B a concentraciones no tóxicas y con una IC₅₀ en el rango nanomolar. Se usa como tercera línea de tratamiento en pacientes con mieloma múltiple. Su mecanismo de acción se

basa en la activación sostenida de la cinasa c-Jun N-terminal (JNK) y la p38 cinasa de proteína activada por mitógenos (MAPK) dando lugar a la liberación del citocromo C induciendo apoptosis en células tumorales. Además inhibe la secreción del factor de crecimiento vascular endotelial, bloqueando así la proliferación de algunos tipos de tumores. Actualmente se obtiene por síntesis y se encuentra en fase clínica III como tratamiento contra el linfoma de células T de tipo refractario y recidivante. Este compuesto se conoce bajo el nombre comercial de Aplidina[®] y está siendo desarrollado por PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid, España). La lurbinectedina o PM01183 es un alcaloide tetrahidroisoquinolínico derivado de un compuesto natural aislado del tunicado *Ecteinascidia turbinata* [127] también por PharmaMar (Colmenar Viejo, Madrid, España) y que ya está en fase clínica II como tratamiento contra tumores sólidos. Actúa uniéndose a la curvatura menor del DNA de forma similar a la trabectedina [117].

1.1.5 Compuestos con actividad farmacológica aislados a partir de peces

Los peces, como el resto de organismos marinos, también contienen compuestos con actividades farmacológicas como péptidos o ácidos grasos. Algunas de las propiedades que se han descrito de las moléculas activas aisladas a partir de peces son propiedades antihipertensivas, cardioprotectoras o antimicrobianas [132]. De hecho, los péptidos con actividades antimicrobianas representan el grupo de moléculas aisladas a partir de peces con mayor abundancia. Las defensinas, las catelicidinas, hepcidinas o las piscidinas son algunas de las clases de péptidos con mayor presencia y distribución entre las diferentes especies de peces. En el caso de las hepcidinas son un grupo de péptidos ricos en cisteína aislados de diferentes especies de peces como la tilapia, la medaka común o el pez cebra. Se ha observado que tienen actividad antimicrobiana contra patógenos resistentes a antibióticos habituales con una IC₅₀ de entre 50 y 100 µg/mL contra *L. Monocytogenes*, *S. aureus* y *E. Faecium*. Si bien, hasta la fecha ninguno de estos compuestos ha llegado aún a fases clínicas [133, 134].

Durante más de 30 años se había apuntado a que el consumo de una dieta rica en pescado por parte de ciertas comunidades reducía la mortalidad por una enfermedad

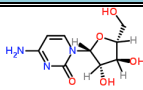
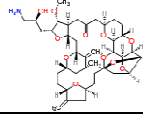
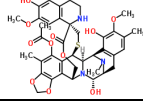
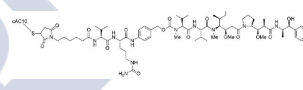
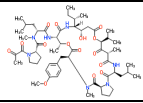
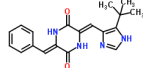

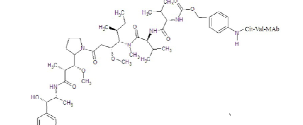
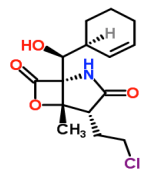
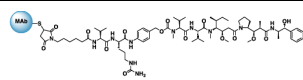
cardiovascular [135]. En la actualidad, varios estudios epidemiológicos han revelado que efectivamente la ingesta de ácidos grasos omega-3 se asocia con una reducción de muerte prematura por enfermedad cardiovascular al reducir la síntesis de triglicéridos a nivel hepático [136]. El consumo de ácidos grasos omega-3 es esencial en la dieta humana ya que el propio organismo no los puede sintetizar [137]. En el año 2004 la FDA y 5 años después la EMEA, aprobaron el primer medicamento derivado de aceites de pescado obtenido a través de la esterificación de diferentes ácidos grasos omega-3, donde los principales constituyentes son los ésteres etílicos del ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico comercializado bajo el nombre de Lovaza[®] por la empresa farmacéutica GlaxoSmithKline [138, 139].

La diversidad estructural y química que se obtiene de los compuestos naturales no es la única razón por la cual resultan interesantes en el desarrollo de nuevos fármacos. Una de las principales razones del aislamiento de compuestos naturales se debe a que la mayoría de las veces estas moléculas se caracterizan por tener actividades biológicas muy concretas y poseer una selectividad muy elevada, de tal forma que sirven de base para la síntesis de nuevos compuestos [140]. El desarrollo de técnicas analíticas refinadas como la resonancia magnética nuclear, la espectrometría de masas o las técnicas de difracción de rayos X, han permitido detectar y dilucidar la estructura concreta de una molécula, paso imprescindible en el desarrollo de un compuesto cabeza de serie. Una vez se ha aislado el compuesto y dilucidado la estructura química, el siguiente paso es el desarrollo de nuevas estructuras químicas en base a la molécula original. Esto implica identificar las partes estructurales de ese compuesto con unas propiedades determinadas, que son las responsables de su actividad biológica y producir variaciones moleculares del compuesto líder. Estas variaciones estructurales permiten mejorar su potencia, eliminar efectos secundarios no deseados, separar actividades en compuestos con más de una acción o favorecer la biodisponibilidad del compuesto cabeza de serie. La química computacional permiten relacionar la estructura química con la actividad biológica (SAR, del inglés structure-activity relationship). Los estudios SAR consideran las propiedades de las moléculas en tres dimensiones y permite predecir cómo una modificación en parte de la estructura de una molécula afecta a la interacción entre ligandos y receptores macromoleculares y por tanto a su actividad biológica, además de permitir predecir el posible farmacóforo (porción de la estructura

de un fármaco que interactúa con su diana farmacológica) de la molécula en estudio. Lo que ha permitido el desarrollo de nuevos compuestos [141].

En resumen, de los compuestos aislados a partir de microorganismos marinos ya comercializados o en fases clínicas, la mayoría presentan propiedades anticancerígenas, aunque también poseen otras actividades interesantes. En la Tabla I y II se agrupan las principales características de los compuestos más importantes que se han descrito.

Tabla I

Nombre del compuesto	Origen	Clasificación química	Diana celular	Indicación	Estado clínico	Estructura química
citarabina (Ara-C)	Esponja	Nucleósido	DNA polimerasa	Leucemia	Aprobado (FDA y/o EMEA)	
mesilato de eribulina (E7389)	Esponja	Macrólido	Microtúbulos	Cáncer metastásico de mama	Aprobado (FDA y/o EMEA)	
trabectedina (ET-743)	Tunicado	Alcaloide	Curvatura menor del DNA	Sarcoma de tejidos blandos y cáncer de ovarios	Aprobado (FDA y/o EMEA)	
brentuximab vedotin (SNG-35)	Molusco-bacteria	Anticuerpo conjugado con auristatina E	CD30 y microtúbulos	Linfoma sistémico anaplásico maligno de células T grandes	Aprobado (FDA y/o EMEA)	
plidiepsina	Tunicado	Depspéptido	Activa Rac1 y JNK	Mieloma múltiple, leucemia y linfoma	Fase clínica III	
plinabulina (NPI-2358)	Hongo	Dicetopiperazina	Microtúbulos	Cáncer de pulmón y cerebro	Fase clínica III	
lurbinectedina (PM01183)	Tunicado	Alcaloide	Curvatura menor del DNA	Cáncer de ovario, mama, pulmón, endometrio y leucemia aguda	Fase clínica II	
glembatumumab vedotin (CDX-011)	Molusco-bacteria	Anticuerpo conjugado con auristatina E	Microtúbulos y glicoproteína NMB	Cáncer metastásico de mama, melanoma y cáncer de mama	Fase clínica II	
marizomib (salinosporamida A, NPI-0052)	Bacteria	Beta-lactona-gamma lactámica	Proteosoma 20S	Cáncer de páncreas, de pulmón de células pequeñas, melanoma, linfoma y mieloma múltiple	Fase clínica I	
vorsetuzumab mafodotin (SGN-75)	Molusco-bacteria	Anticuerpo conjugado con auristatina F	CD70 y microtúbulos	Linfoma no hogdgin y carcinoma renal	Fase clínica I	

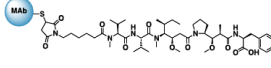
ASG-5ME	Molusco-bacteria	Anticuerpo conjugado con auristatina E	ASG-5 y microtúbulos	Cáncer de páncreas y próstata	Fase clínica I	
---------	------------------	--	----------------------	-------------------------------	----------------	---

Tabla I. Compuestos con actividad anticancerígena aislados a partir de organismos marinos aprobados o en fases de desarrollo clínico.

Tabla II

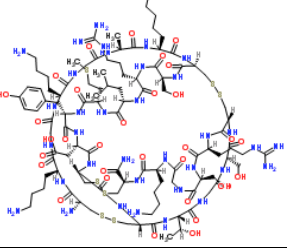
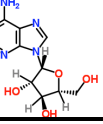
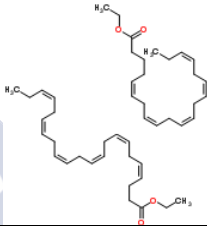
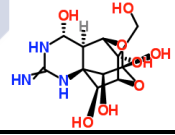
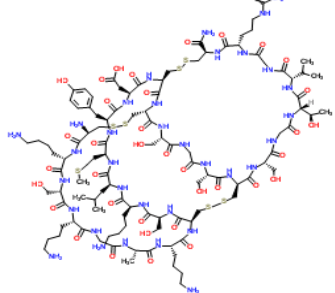
Nombre del compuesto	Origen	Clasificación química	Diana celular	Indicación	Estado clínico	Estructura química
ziconotida	Molusco	Péptido	Ca _v tipo N	Dolor: dolor severo crónico	Aprobado (FDA y/o EMEA)	
vidarabina (Ara-A)	Esponja	Nucleósido	DNA polimerasa viral	Antiviral	Aprobado (FDA y/o EMEA)	
ésteres de ácidos grasos Omega-3	Peces	Ácidos grasos omega-3	Enzimas encargadas de la síntesis de triglicéridos	Niveles elevados de TG	Aprobado (FDA y/o EMEA)	
tetrodotoxina	Peces	Alcaloide	Na _v	Dolor: dolor crónico	Fase clínica III	
leconotida (AM-336)	Molusco	Péptido	Peptido	Ca _v tipo N	Fase clínica I	

Tabla II. Compuestos aislados de organismos marinos con otras aplicaciones diferentes de la anticancerígena aprobados o en fases clínicas de desarrollo.

1.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR

Los compuestos de origen marino actúan modulando diferentes vías de señalización celular. Los sistemas de señalización celular son extremadamente complejos, formando

entramados de circuitos con múltiples elementos de control de los mismos. Las vías de comunicación celular son sistemas en cascada con una serie de etapas secuenciales. Las señales químicas en forma de moléculas, de origen endógeno (liberado por las células) o exógeno (fármacos) difunden a través del torrente sanguíneo y llegan al compartimento extracelular de todas las células del organismo. Esto podría resultar poco específico si no fuera porque cada célula es capaz de producir una respuesta en función de las proteínas receptoras que exprese en su membrana. Entre los más comunes se encuentran receptores de cinasas de tirosina, receptores de citocinas, canales dependientes de ligando y receptores acoplados a proteínas G [142]. Cuando los receptores de membrana son ocupados por moléculas extracelulares específicas para un determinado tipo celular se vuelven activos. Este receptor de membrana a su vez activa a sus proteínas asociadas, transformando esa señal extracelular en una señal intracelular, esto se traduce en la activación de proteincinasas, que son enzimas que transfieren un grupo fosfato del adenosín trifosfato (ATP) a una proteína o en la activación de enzimas de amplificación (adenilato ciclasa o fosfolipasa C (PLC)) que generan segundos mensajeros como adenosín monofosfato cíclico (cAMP), guanosina monofosfato cíclico (cGMP), inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), diacilglicerol (DAG) o Ca²⁺. Estos segundos mensajeros pueden interactuar con proteínas efectoras permitiendo regular procesos celulares básicos y funciones fisiológicas integradas. Tomando como ejemplo el Ca²⁺ por su versatilidad e implicación en numerosos procesos celulares, este puede actuar modulando la apertura de canales iónicos modificando el potencial de membrana celular y/o incrementar el Ca²⁺ intracelular que puede inducir modificaciones en la función proteica celular o cambiar la actividad enzimática de cinasas de proteína (PK) o fosfatasa de proteína (PP).

Estos sistemas deben funcionar de forma transitoria y controlada. Además de detectar, transformar y amplificar la señal, deben obedecer a los sistemas de terminación, adaptación e integración de las señales, que aseguren una activación y desactivación controlada, además de tener interconexión con el conjunto de señales que en cada momento recibe la célula. Cuando alguno de los mecanismos de control sufre alguna alteración dan lugar a situaciones patológicas. Por ello, estos sistemas pueden ser muy útiles como dianas farmacológicas pudiendo regular así las funciones celulares alteradas [143].

A continuación se describen dos elementos relacionados con la señalización celular estudiados en la presente Tesis Doctoral, por un lado el Ca^{2+} , y por otro las ciclofilinas, ambos con funciones básicas, y con implicaciones muy importantes para el funcionamiento celular.

1.2.1 Calcio

El Ca^{2+} es un segundo mensajero universal que está implicado en la regulación de multitud de procesos como la transcripción de genes, la regulación de enzimas, la contracción muscular, los procesos de proliferación celular o la activación del sistema inmune [144]. El Ca^{2+} regula, modifica o altera numerosos procesos intracelulares cuando sus niveles basales se ven incrementados en el citosol. Además de estar en este compartimento, este segundo mensajero también puede difundir a otras organelas intracelulares como la mitocondria, el núcleo o el ER. Las concentraciones de este ion dentro de la célula están reguladas por una gran variedad de mecanismos, todos ellos relacionados entre sí. Estos mecanismos se pueden clasificar en activadores o inhibidores dependiendo de si actúan aumentando o disminuyendo los niveles citosólicos de dicho ion [145].

Entre los principales mecanismos de incremento de Ca^{2+} citosólico se encuentran todos los canales localizados en la membrana plasmática que regulan la entrada de este segundo mensajero desde el medio extracelular y también el procedente de los reservorios intracelulares. Dentro de estos últimos se incluye el ER (sarcoplasmático en el caso de tratarse de células musculares) y la mitocondria, los cuales pueden liberar Ca^{2+} de manera finita al citosol por la acción de otros segundos mensajeros. Sin embargo, en la inhibición de la entrada de Ca^{2+} celular participan mayor cantidad de mecanismos, entre ellos las ATPasas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA ATPasas) y las ATPasas de Ca^{2+} del ER (conocida como SERCA, del inglés *sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPasa*) o transportadores localizados en la membrana plasmática que utilizan la diferencia de gradiente con otros iones para obtener energía y poder transportar el Ca^{2+} al medio extracelular, como el intercambiador sodio/calcio. Las mitocondrias además pueden amortiguar variaciones

de Ca^{2+} citosólico de manera rápida, secuestrándolo en su interior y posteriormente liberándolo cuando este es requerido en cualquier proceso celular [146].

Cuando una célula está en reposo, la concentración intracelular de Ca^{2+} es aproximadamente entre 50 nM-100 nM. Sin embargo, cuando las células son activadas por diferentes estímulos como la despolarización, segundos mensajeros o estímulos hormonales, la entrada de Ca^{2+} se activa y la concentración de este ion en el citosol puede alcanzar valores de 1 μM o incluso mayores [147].

1.2.1.1 Mecanismos celulares que aumentan la concentración de calcio citosólico

La expresión de diferentes combinaciones de canales de Ca^{2+} , bien sean de entrada o salida, puede variar dependiendo del tipo celular del que se trate. Esto, unido a la gran variedad de moléculas que pueden estar modulándolos, da lugar a respuestas muy variables. Así, los principales canales que se expresan en la mayoría de las células se pueden agrupar como canales de entrada o salida de Ca^{2+} [148]. Estos canales se muestran en la Figura 3.

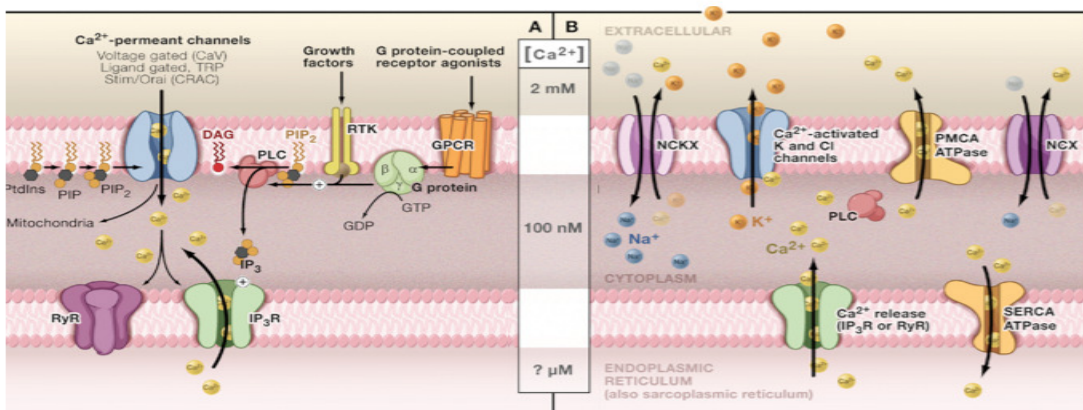


Figura 3. Principales mecanismos que contribuyen a la homeostasis del calcio en el citosol, adaptado de Clapham et al. [149]. A. Mecanismos que incrementan el Ca^{2+} a nivel citosólico: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, canales de Ca^{2+} dependientes de reservorio, de receptor y dependientes de segundos mensajeros como vías de entrada de este ion desde el medio extracelular o procedente de reservorios intracelulares, principalmente en el ER se encuentran los receptores de rianodina (RyR) e

inositol (1,4,5) trifosfato (IP₃R). B. Mecanismos que disminuyen los niveles de Ca²⁺ citosólico, principales canales, intercambiadores y bombas de extrusión de Ca²⁺ situados en la membrana plasmática: ATPasas de Ca²⁺ de la membrana plasmática (PMCA ATPasas), intercambiador sodio/calcio (NCX) y cotransportador de potasio-calcio/sodio (NCKX) y en los reservorios intracelulares como las ATPasas de Ca²⁺ del ER (SERCA) que actúan captando Ca²⁺ del citosol.

1.2.1.1.1 Canales de entrada de calcio desde el medio extracelular

Canales de calcio operados por voltaje

Los canales de Ca²⁺ operados por voltaje (VOCCs, del inglés *voltage operated calcium channels*) están ampliamente expresados especialmente en células excitables como el músculo o las neuronas, aunque también pueden hallarse de manera muy puntual en células no excitables (linfocitos). Este tipo de canales son activados ante una despolarización de la membrana plasmática. Los VOCCs en mamíferos generalmente están formados por 5 subunidades. A su vez, se han detectado múltiples isoformas de estas subunidades aumentando enormemente la combinación de posibilidades. De este modo se distinguen diferentes tipos de VOCCs en función del tejido donde se encuentran y se pueden clasificar en base a la sensibilidad farmacológica (sensibilidad frente a un bloqueante farmacológico) y electrofisiológicas (cinética de activación/inactivación) que presentan [150]. Se han descrito diferentes tipos de VOCCs, por tanto, desde un punto de vista funcional, se clasifican en dos grupos, los canales con un umbral de activación bajo o LVA (del inglés *low voltage activated*) o de tipo T, cuya función está asociada al inicio del potencial de acción [151] y los canales con un umbral de activación alto denominados HVA (del inglés *high voltage activated*) que incluyen los canales de tipo L, N, P/Q y R y cuyas funciones están muy relacionadas con la excitabilidad neuronal y la homeostasis de Ca²⁺ intracelular [152].

Canales de calcio operados por receptor

Los canales de Ca²⁺ operados por receptor o ROCCs (del inglés *receptor operated calcium channels*) comprenden un grupo de canales estructural y funcionalmente diversos que prevalentemente se encuentran en las células secretoras y en las terminaciones nerviosas. Estos canales son activados por la unión de un agonista al

dominio extracelular del canal, independientemente de los cambios que se puedan producir en el potencial de membrana. Los ROCCs por excelencia incluyen los receptores nicotínicos de acetilcolina [153] y los receptores ionotrópicos de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) [154].

Canales de calcio activados por segundos mensajeros

Los canales operados por segundos mensajeros o SMOC (del inglés, *second messenger operated channels*) participan en una gran cantidad de rutas de entrada de Ca^{2+} . Estas rutas pueden activarse por mensajeros o metabolitos como hormonas, o por la estimulación de factores de crecimiento. Se encuentran ampliamente distribuidos tanto en células excitables como no excitables. En algunos casos, estos canales activados por mensajeros forman una vía de entrada no específica a cationes. Se diferencian de los ROCCs en que éstos últimos tienen lugares de unión para agonistas extracelulares. Los mensajeros que activan la entrada de Ca^{2+} a través de los SMOC pueden ser desde ácidos grasos de cadena larga, como el ácido araquidónico a pequeños radicales inorgánicos de oxígeno y nitrógeno, distintos nucleótidos cíclicos o incluso el Ca^{2+} por sí mismo [155]. Muchas de las proteínas que forman los canales activados por mensajeros están relacionadas con los canales de potencial receptor transitorio (TRP, del inglés *transient receptor potential*), ampliamente expresados en las células y con importantes funciones. Este es el caso de los TRPM2 que proporcionan una vía de entrada para el Ca^{2+} cuando las concentraciones del metabolito adenosín difosfato ribosa (ADP) aumenta. Además de ser sensibles a mensajeros celulares, algunos canales TRP pueden ser activados por cambios ambientales tales como el dolor, el frío o incluso por el vaciamiento de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares al igual que ocurre con los canales de Ca^{2+} dependientes de reservorio o canales SOC (del inglés *Store operated Ca^{2+} channels*); de ahí que la clasificación de estos canales así como sus funciones sean controvertidas [147].

Canales de calcio dependientes de reservorio

Los canales SOC se encuentran ampliamente distribuidos y muy conservados desde las levaduras hasta los humanos y son por tanto una de las vías de entrada de Ca^{2+} por excelencia, ocupando un papel central en la fisiología de las células eucariotas [156, 157]. En los años ochenta, el estudio del Ca^{2+} por imagen mediante fluorescencia identificó un nexo de unión entre la producción de IP_3 y el incremento de la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, aunque el mecanismo exacto de unión no se conocía [158, 159]. En 1986, se propuso que el IP_3 producía la movilización del Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, lo cual a su vez inducía una entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática, pero el mecanismo exacto a través del cual se producía no se dilucidó hasta años después [160]. La tapsigargina, una lactona aislada de una planta, permitió encontrar la conexión entre la entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y su relación con los reservorios de Ca^{2+} del ER. Esta molécula actúa como un inhibidor selectivo de la SERCA, permitiendo el vaciamiento del ER sin inducir la liberación de IP_3 , de una forma idéntica a como lo hace el IP_3 , o al igual que ocurre cuando se estimula un linfocito T mediante un antígeno [161, 162]. En la actualidad se sabe que estos canales son activados por el vaciamiento de los depósitos intracelulares de Ca^{2+} como se muestra en la Figura 4. Su activación puede ser debida a la movilización de este ión de manera fisiológica por la acción de segundos mensajeros o por la acción de agentes farmacológicos. El mecanismo mediante el cual los canales SOC se activan, depende de la cantidad de Ca^{2+} que alberga el ER y el estado en el que se encuentre la mitocondria [163]. Sin embargo, no se identificaron las estructuras que mediaban en la regulación de este tipo de canales hasta hace exactamente una década. Fue entonces cuando se descubrieron las proteínas de interacción con el estroma (STIM, *del inglés* stromal interaction molecule) y las subunidades proteicas que componen los canales canales SOC y la proteína 1 de los canales de Ca^{2+} dependientes de reservorio (Orai1) [164, 165]. Los canales SOC, codificados por el gen Orai1, fueron identificados como los canales a través de los cuales el Ca^{2+} entraba en las células en estudios de pacientes inmunodeficientes que presentaban mutaciones para esta proteína y que por tanto no presentaban una entrada de Ca^{2+} normal en las células de la serie blanca [166, 167]. Hasta el momento se han descrito 3 isoformas de esta proteína en células de mamíferos conocidas como Orai1, 2 y 3. Estas proteínas de transmembrana son por tanto, las encargadas de formar el canal y se caracterizan por tener 4 dominios

transmembrana con terminaciones amino y carboxilo orientadas hacia el lado citosólico como se muestra en la Figura 4C. Estos extremos albergan los lugares de unión para las proteínas STIM [168, 169]. Las proteínas STIM actúan como sensores de Ca^{2+} entre el lumen del ER y las proteínas Orai1 que componen los canales SOC (Figura 4B y 4C).

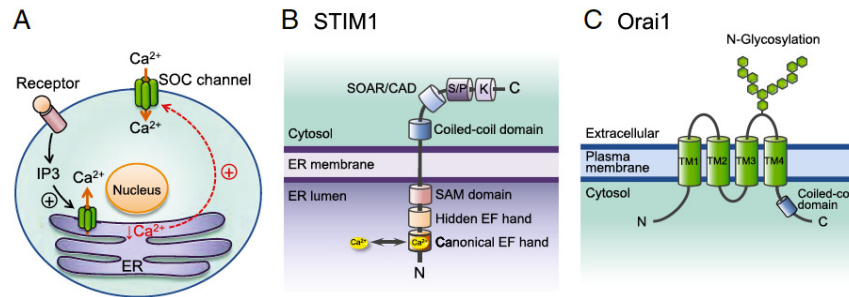


Figura 4. Mecanismo regulador del Ca^{2+} citosólico, tomado de *Chen et al.* [170]. A. Esquema de una célula no excitable donde se representa la entrada de Ca^{2+} dependiente de reservorio. Tras activarse por la unión de un ligando a un receptor se genera inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), que induce la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplasmático (ER), este vaciamiento es detectado por las proteínas de interacción estromal (STIM) situadas en el ER. Esto provoca la unión de la proteína STIM al las proteínas Orai1 que conforman los canales de entrada dependientes de reservorio (canales SOC) con la consecuente entrada de Ca^{2+} al interior de la célula. B. Esquema de la proteína STIM del ER con sus diferentes dominios. C. Organización de las proteínas transmembrana (TM1-TM4) que componen los canales SOC, la proteína 1 de los canales de Ca^{2+} dependientes de reservorio (Orai1).

Cuando el ER se encuentra repleto de Ca^{2+} , la proteína Orai1 está desacoplada en la membrana plasmática y las proteínas STIM están de manera libre repartidas por la membrana del ER en forma de dímeros. Las moléculas STIM presentan un dominio conocido como “EF-hand” (dominio estructural que consta de dos hélices alfa situadas aproximadamente perpendicular la una de la otra y unidos por un corto circuito de alrededor de 12 aminoácidos) de unión al Ca^{2+} . El Ca^{2+} se disocia del dominio EF cuando las concentraciones luminales de Ca^{2+} caen [171]. Dicha caída produce una reorganización de los receptores STIM formando oligómeros que interaccionan con los canales Orai1. La oligomerización de los receptores STIM y su interacción con las proteínas Orai1 es un proceso autónomo que implica la interacción de múltiples dominios entre ambas proteínas (Figura 5) [172].

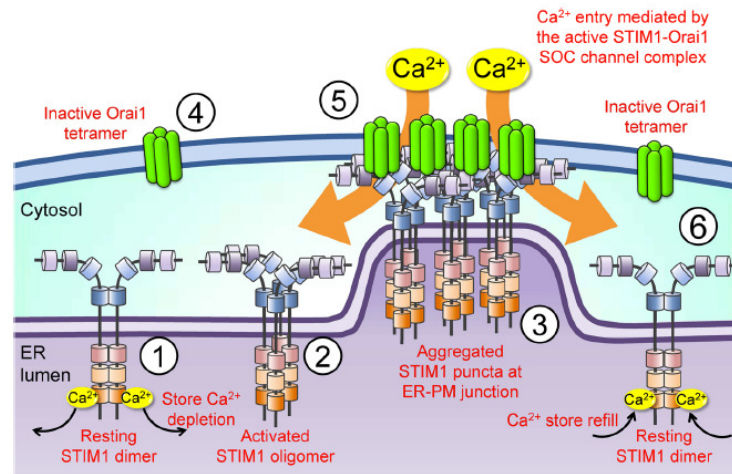


Figura 5. Entrada de Ca^{2+} dependiente de reservorio por activación de los receptores STIM1, tomado de Chen et al. [170]. 1 y 2. Disminución de Ca^{2+} del ER Oligomerización de las proteínas de interacción estromal (STIM) por la disociación del Ca^{2+} de sus dominios de unión. 3 y 5. Interacción de la proteína 1 de los canales de Ca^{2+} dependientes de reservorio Orai1 que forman los canales de Ca^{2+} dependiente de reservorio (canales SOC), y las proteínas de interacción estromal STIM1, que actúan como sensores de Ca^{2+} . De este modo se forma un complejo que cambia la conformación del canal y permite el paso del Ca^{2+} a su través. 4 y 6. Una vez los reservorios intracelulares se han llenado de Ca^{2+} , el propio ion se asocia a la zona de unión en la proteína STIM1 y se revierte la oligomerización desacomplándose STIM1-Orai1, cesando la unión de Ca^{2+} .

El acoplamiento de la proteína STIM de ER y Orai1 de la membrana plasmática se produce en zonas donde el ER y la membrana plasmática tienen la suficiente proximidad para la interacción. Del mismo modo, cuando los niveles de Ca^{2+} en el citosol y en los reservorios es el adecuado, esta estructura se disocia interrumpiendo la entrada de más Ca^{2+} [169, 173, 174].

La mitocondria también juega un papel muy importante en la regulación de los canales SOC y por tanto se describe de forma detallada en el siguiente apartado.

1.2.1.1.2 Mitocondria

Las mitocondrias son organelas que controlan un amplio número de procesos dentro de la célula. Principalmente realizan funciones energéticas, así mediante la fosforilación oxidativa consumen oxígeno para producir ATP, que es la fuente de energía imprescindible que las células emplean para la realización de sus reacciones químicas. Por otro lado actúan en la regulación de segundos mensajeros, muy

particularmente del ion Ca^{2+} . Además de realizar la fosforilación oxidativa y regular segundos mensajeros, la mitocondria desempeña funciones como la oxidación de ácidos grasos, la síntesis de cuerpos cetónicos o el metabolismo de los aminoácidos [175].

La estructura de la mitocondria consta de dos membranas, una membrana externa que es permeable al paso de iones y metabolitos con pesos moleculares inferiores a 6000 Da debido a la presencia de los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC, del inglés *voltage-dependent anion channels*) y una membrana interna muy plegada cuyas invaginaciones reciben el nombre de crestas mitocondriales. En esta membrana se encuentra la cadena respiratoria mitocondrial, la ATP sintasa y las proteínas que regulan el paso de metabolitos, así como distintos intercambiadores y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT, del inglés *adenine nucleotide translocator*). La membrana mitocondrial interna es especialmente impermeable al paso de iones debido a su alto contenido en cardiolipina, un fosfolípido esencial para soportar el gradiente electroquímico necesario para el desempeño de sus funciones energéticas. Estas dos membranas definen dos compartimentos diferentes, por un lado el espacio intermembrana situado entre ambas, donde se encuentran las enzimas que median en el tránsito de sustancias entre la matriz mitocondrial y el citosol, y por otro la matriz que está delimitada por la membrana interna donde se localizan numerosos complejos enzimáticos necesarios para la expresión y replicación de genes y para las funciones energéticas [176].

Entre las funciones que desempeña la mitocondria, la función energética resulta esencial para la homeostasis celular. La fosforilación oxidativa es un proceso que tiene lugar en la matriz mitocondrial. La entrada de Ca^{2+} a la luz de la mitocondria estimula el metabolismo mitocondrial actuando sobre las diferentes enzimas implicadas. Mediante este proceso se genera el poder reductor en forma de nicotín adenín dinucleótido (NADH) y flavín adenín dinucleótido (FADH_2) que es utilizado por la cadena respiratoria para bombear tres protones (H^+) hacia el espacio intermembrana. Ésto se traduce en la creación de un gradiente químico (diferencia de pH) y eléctrico entre los dos compartimentos. La diferencia de gradiente de H^+ creada permite el paso de estos a través de la ATP sintasa. Ésta fosforila una molécula de ADP, dando lugar a ATP. El correcto funcionamiento de la cadena de transporte de electrones resulta esencial para el desarrollo de las funciones de esta organela y por tanto de la célula. La mitocondria

también juega un papel muy importante en la regulación de los niveles citosólicos de Ca^{2+} . El movimiento de iones a través de la membrana interna mitocondrial se produce principalmente por dos mecanismos: a través del uniportador de Ca^{2+} , que actúa internalizando Ca^{2+} del espacio intermembrana a la matriz mitocondrial y a través del intercambiador como el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ con mayor representación en células excitables y que actúa retirando Ca^{2+} de la matriz mitocondrial a cambio de iones Na^+ , el intercambiador Na^+/H^+ , que extruye Na^+ a cambio de H^+ y el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, que también extruye Ca^{2+} a cambio de H^+ [177]. Estos mecanismos se muestra en la Figura 6.

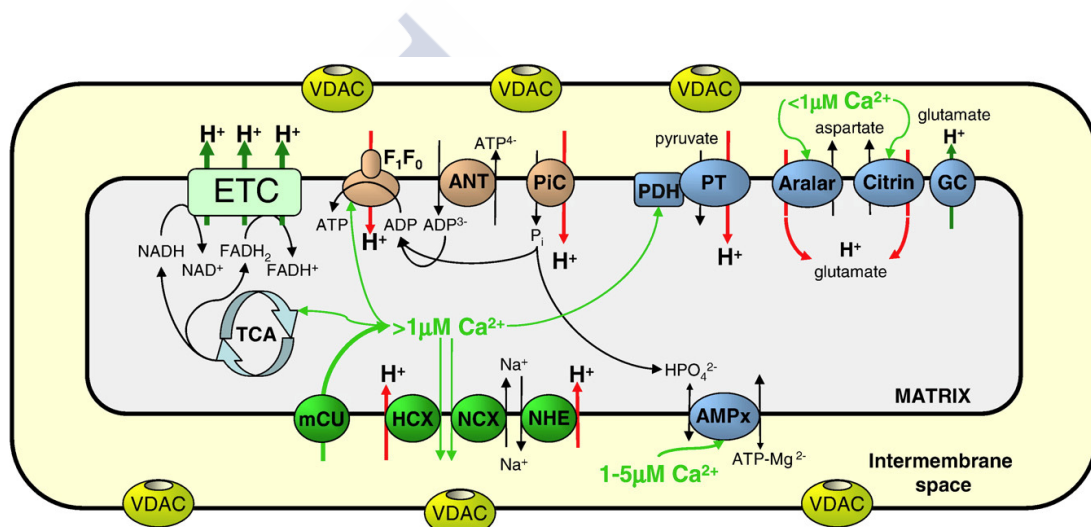


Figura 6. Mecanismos de obtención de energía y transporte de iones en la mitocondria, tomado de Demarex et al. [175]. En el esquema se observan las proteínas que identifican señales que producen el movimiento de iones y adenosín trifosfato (ATP) como la cadena transportadora de electrones (ETC), el translocador de nucleótidos de adenina (ANT), el transportador de fosfatos (PiC). La función de los intercambiadores/uniportadores como el uniportador de Ca^{2+} (mCU), el intercambiador de protones (H^+)/calcio (Ca^{2+}) (HCX), el intercambiador sodio (Na^+)/ Ca^{2+} (NCX) o el intercambiador Na^+/H^+ (NHE) y de sustratos metabólicos por las isocitrato y piruvato deshidrogenasas (azul) entre el espacio intermembrana (amarillo) y la matriz mitocondrial y entre éste y el citosol a través del canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) situado en la membrana externa de la mitocondria.

Además de estos canales e intercambiadores, existe la posibilidad de que se forme, bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas, un complejo multiprotéico conocido como poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP, del inglés *mitochondrial permeability transition pore*). Entre las proteínas que lo constituyen se encuentran la

hexocinasa, los VDAC, el ANT y la ciclofilina D (Cyp D) [176, 178]. Esta última se tratará en detalle más adelante.

El mPTP permite una conexión directa entre la membrana interna y la externa de la mitocondria facilitando la salida de Ca^{2+} y otras sustancias de hasta 1,5 kDa directamente al citosol. Este canal puede formarse de forma transitoria o permanente. En el primer caso, su formación es fisiológica y se produce como consecuencia de la estimulación que el Ca^{2+} tiene sobre la cadena respiratoria, proceso que da lugar a una alcalinización de la matriz de la mitocondria como consecuencia del bombeo de H^+ hacia el espacio intermembrana. El mPTP es muy sensible a pH altos y por tanto se induce su apertura de tal modo que se produce la salida de Ca^{2+} directa al citosol. Esta salida de Ca^{2+} hacia el citoplasma produce de nuevo la acidificación la matriz mitocondrial, reestableciéndose su potencial de membrana, momento en el que se volverá a cerrar [179]. Si su apertura es permanente, la disipación del potencial de membrana, la alteración del gradiente proteico, y el hinchamiento de la mitocondria por la entrada de agua con la consecuente rotura de sus membranas y la liberación de factores proapoptóticos da lugar a la muerte de la célula por necrosis [180]. La apertura permanente puede producirse por múltiples factores como alteración del potencial de membrana, especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) o el aumento de las concentraciones de Ca^{2+} citosólico de forma sostenida, entre otros factores [181-183].

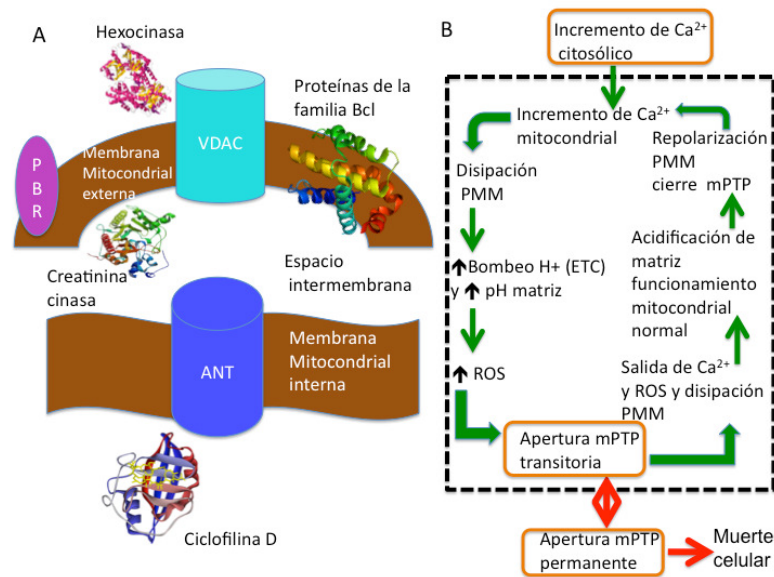


Figura 7. Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (mPTP). **A.** Principales componentes del mPTP: creatinina cinasa, ciclofilina D (Cyp D), translocador de nucleótidos de adenina (ANT), canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), hexocinasa y proteínas de la familia Bcl [184]. **B.** Esquema de la regulación de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial por el mPTP. Al aumentar el bombeo de protones (H^+) por la cadena transportadora de electrones (ETC) al espacio intermembrana se produce una alcalinización de la matriz mitocondrial, incrementándose las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos factores inducen la apertura transitoria del mPTP permitiendo la salida de Ca^{2+} y ROS al exterior de la mitocondria, disipándose el potencial de membrana mitocondrial (PMM). Una vez se ha producido este reajuste, el pH de la matriz vuelve a acidificarse y se repolariza la membrana de la mitocondria, cerrándose el mPTP. Si el estímulo que está induciendo su apertura permanece en el tiempo desencadenan la muerte celular por necrosis.

La mitocondria juega un papel fundamental en la regulación de los niveles citosólicos de Ca^{2+} en la célula. El desajuste entre la rápida entrada de Ca^{2+} a través del uniportador de Ca^{2+} y la extrusión lenta del ion por parte de los intercambiadores al espacio intermembrana, combinado con la elevada concentración de fosfato en la matriz mitocondrial, dota a la mitocondria de la capacidad de actuar como un compartimento acumulador de Ca^{2+} . La captación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria modifica la amplitud de las señales de Ca^{2+} . Así, ante un aumento de la concentración de Ca^{2+} en el citosol, la mitocondria puede detectarlo captando iones Ca^{2+} del citosol amortiguando esa elevación para luego liberarlo lentamente y de forma sostenida ayudando a

prolongar las señales producidas por el segundo mensajero. Las mitocondrias, de este modo, pueden cambiar la amplitud de las señales de Ca^{2+} en el citosol, liberándolo cuando éste sea necesario. Al actuar como un reservorio temporal de Ca^{2+} y poder liberarlo de forma lenta, la mitocondria juega un papel muy importante en el relleno de Ca^{2+} de otros reservorios intracelulares, como es el caso del ER. La baja cinética del intercambiador mitocondrial se combina mejor con la cinética de la bomba SERCA del ER que la entrada explosiva de Ca^{2+} que se produce a través de los distintos canales de entrada de este ion a través de la membrana plasmática. Debido a que facilita la entrada del Ca^{2+} al interior de la célula, la mitocondria permite que algunos canales mantengan una entrada eficiente del ion a la vez que favorece un buen relleno del principal reservorio intracelular, el ER.

Por la implicación de la mitocondria, especialmente en la regulación de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC, se describe a continuación el papel que esta organela desempeña en la activación e inactivación de estos canales. En condiciones fisiológicas, las mitocondrias próximas al ER actúan retirando el Ca^{2+} liberado de este reservorio, favoreciendo por un lado un buen vaciamiento del ER impidiendo que los receptores de IP_3 se inactiven ante el aumento de Ca^{2+} citosólico y por otro permitiendo una mayor entrada de este ion a través de los canales SOC [163]. Tras la activación de la corriente de Ca^{2+} y el consiguiente aumento de los niveles citosólicos de este ion, se produce la inactivación, en la cual se establecen dos mecanismos como los responsables de restringir la entrada de más Ca^{2+} al interior del citosol. Por un lado la inactivación rápida y por otro la inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} . La primera se produce como consecuencia de la presencia de microdominios de Ca^{2+} en las proximidades de los canales SOC y es por tanto puramente dependiente de este ion [185]. En este proceso la mitocondria no tiene implicación alguna. Sin embargo, en la inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} esta organela juega un papel crucial [186, 187]. Esta inactivación se produce como consecuencia del aumento de Ca^{2+} a nivel citosólico. Comienza a desarrollarse décimas de segundo tras la activación y puede tener una duración de minutos. Se produce como consecuencia de la incapacidad por parte de la mitocondria para seguir captando Ca^{2+} una vez se ha recargado [163].

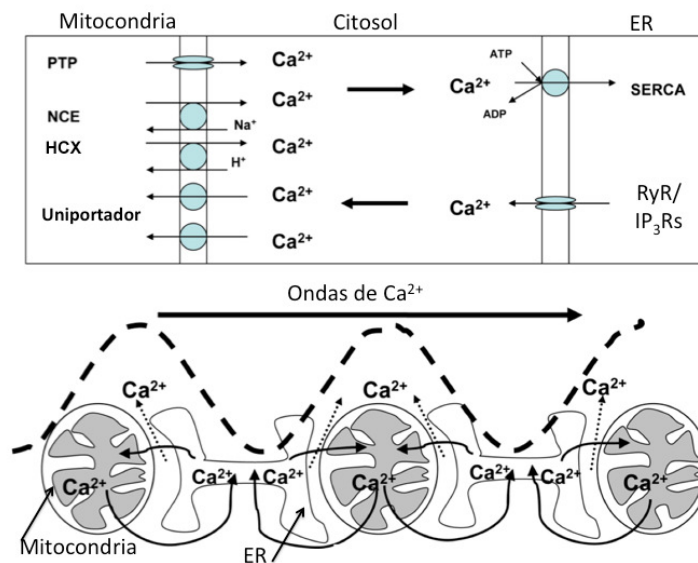


Figura 8. Relación entre la mitocondria y el retículo endoplasmático (ER) en la regulación del Ca^{2+} citosólico, adaptado de Seppet *et al.* [188]. A. La mitocondria acumula Ca^{2+} a través del uniportador de Ca^{2+} . El Ca^{2+} acumulado puede ser liberado desde la mitocondria a través de los distintos intercambiadores/ bombas como el intercambiador sodio (Na^+)/ calcio (Ca^{2+}), (NCE), el intercambiador de protones (H^+)/ Ca^{2+} , (HCX) o de una manera más rápida a través del poro de permeabilidad transitoria (mPTP). El Ca^{2+} liberado por la mitocondria es captado por la ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplasmático (SERCA). B. Interacción entre ambas organelas para regular los niveles de Ca^{2+} citosólico a unos niveles más o menos constantes.

1.2.1.1.3 Retículo endoplasmático

La liberación de Ca^{2+} de los depósitos del RE está mediada principalmente por los receptores de inositol 1,4, 5-trifosfato (IP_3Rs) y los receptores de rianodina (RyRs, del inglés *ryanodine receptors*), dos de los principales canales intracelulares de liberación de Ca^{2+} al citosol. La actividad de estos receptores juega un papel esencial en los procesos celulares de regulación de Ca^{2+} a nivel global en la célula.

Los IP_3Rs se expresan de manera generalizada en todos los tejidos de mamíferos, principalmente en el RE. En humanos existen tres isoformas que comparten entre un 60-70% de homología en sus secuencias. Se expresan en diferentes proporciones dependiendo del tipo celular del que se trate. El IP_3 actúa sobre estos receptores para liberar Ca^{2+} desde este reservorio intracelular al citosol en respuesta a estímulos externos. La unión de algunas hormonas y factores de crecimiento a receptores

específicos presentes en la membrana plasmática desencadena la activación de la PLC, la cual cataliza la hidrólisis de fosfolípidos para producir IP₃. Aunque deriva de un lípido, el IP₃ es soluble en agua y difunde al interior celular donde se encuentran los IP₃Rs en el RE. La unión del IP₃ al receptor produce un cambio de conformación en su receptor y el canal se abre produciéndose una salida de Ca²⁺ desde esta organela al citosol. Los IP₃Rs son estructuras de gran tamaño compuestas por 4 subunidades, con una masa molecular de aproximadamente 1200 kDa. En la codificación de estas subunidades están implicados 3 genes. Estos tres genes se diferencian sutilmente en características, como la afinidad por el IP₃. Además, estos receptores pueden presentarse de forma homomérica o heteromérica dando lugar por tanto a un rango muy amplio de funcionalidades en base al tipo celular. Aunque los IP₃Rs requieren obligatoriamente la presencia de IP₃ para abrirse, su activación esta regulada por la concentración citosólica de Ca²⁺ en su superficie. De hecho, la apertura de un IP₃Rs se ve favorecida por incrementos de Ca²⁺ moderados, entre 0,5 μM y 1 μM, mientras que concentraciones mayores a 1 μM inhiben su apertura. La dependencia de los niveles de Ca²⁺ citosólico de los receptores IP₃Rs es crucial en la generación de los complejos patrones oscilatorios de las señales de Ca²⁺ en muchas células. Del mismo modo, las modificaciones covalentes y las interacciones alostéricas también ejercen un control importante sobre los IP₃Rs [189].

Los RyRs se encuentran principalmente en células excitables, como células musculares y neuronas. Estos receptores son estructural y funcionalmente análogos de los IP₃Rs, aunque los doblan en peso molecular y conductancia. Otra característica que comparten ambos receptores es su sensibilidad a concentraciones citosólicas de Ca²⁺, aunque generalmente los RyRs son activados e inhibidos por concentraciones de Ca²⁺ más elevadas (la activación se produce en un rango de 1-10 μM, mientras que la inhibición se produce ante concentraciones de Ca²⁺ mayores a 10 μM). A diferencia de los IP₃Rs, los cuales necesitan la existencia de IP₃ y Ca²⁺ para su activación, los RyRs pueden ser activados sólo en presencia de Ca²⁺. Los IP₃Rs se expresan ampliamente en todos los tejidos celulares, mientras los RyRs son más abundantes en células excitables. Como en el caso de los IP₃Rs, los RyRs están codificados por tres genes. Sin embargo, estos genes no parecen tener la misma redundancia funcional que se observa en las

isoformas de los IP₃Rs. Las diferentes proteínas que componen los RyRs se caracterizan por desempeñar funciones específicas. Por ejemplo, los RyRs tipo 1 se encargan de desencadenar los procesos de excitación muscular mientras los de tipo 2 desempeñan esta función en el músculo cardíaco exclusivamente [190].

1.2.1.2 Mecanismos de descenso de la concentración de calcio citosólico

Existen un conjunto de mecanismos cuyo fin es devolver a la célula las condiciones iniciales de reposo. En este sentido, las células utilizan las PMCA ATPasas, intercambiadores/bombas como el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ y la recaptación de Ca²⁺ por parte de los reservorios intracelulares (bombas SERCA del ER y mitocondrias) con el fin último de mantener la homeostasis de este ion y evitar su potencial toxicidad [191].

En el caso de las PMCA, son el principal mecanismo de eliminación de Ca²⁺ al exterior de manera permanente manteniendo de forma efectiva los niveles de este ion en concentraciones bajas. Su actividad no afecta al gradiente electroquímico de la membrana. La eliminación del Ca²⁺ al exterior produce una disminución del pH que se compensa con el intercambiador Na⁺/H⁺. Sin embargo, los intercambiadores actúan también disminuyendo los niveles de Ca²⁺ en la célula, pero a diferencia de las bombas, tienen la capacidad de producir ajustes de los niveles citosólicos de forma rápida ante aumentos repentinos de este ion en el citosol, como ocurre, por ejemplo, ante los reajustes de Ca²⁺ que se producen durante la generación de un potencial de acción en una neurona [192].

Debido a la capacidad multifuncional del Ca²⁺ como segundo mensajero y su importancia como elemento de señalización celular, a continuación se describen algunas proteínas que están moduladas entre otros factores por las concentraciones citosólicas de este ion.

1.2.2 Ciclofilinas

El descubrimiento de las Cyps no podría explicarse sin el hallazgo de la ciclosporina A (CsA). Éste compuesto se aisló por primera vez en la década de los setenta del hongo terrestre *Hypocladium inflatum gams* [193]. La CsA es un polipéptido cíclico hidrofóbico compuesto por 11 aminoácidos (C₆H₁₁N₁₁O₁₂) con un peso

molecular de 1203,63 Da. Aunque se conocía su potente acción inmunosupresora, su mecanismo de acción no se dilucidó hasta años después, con el descubrimiento de las Cyps, su diana intracelular [194-197].

En el año 1984 se descubrió la actividad peptidil-prolil isomerasa (PPIasa) [198]. Esta actividad enzimática permite catalizar la reacción de *cis* a *trans* de los péptidos que poseen residuos de prolina, facilitando así el plegamiento proteico (Figura 9). Este hallazgo coincidió con el descubrimiento de unas proteínas citosólicas aisladas por primera vez en los timocitos bovinos con esta actividad PPIasa, a las que además se unía de forma específica la CsA, y que actuaba bloqueando la actividad isomerasa de las mismas [199]. Cinco años después se demostró que aquella proteína aislada de los timocitos bovinos se correspondía con la ciclofilina A (Cyp A) [200].

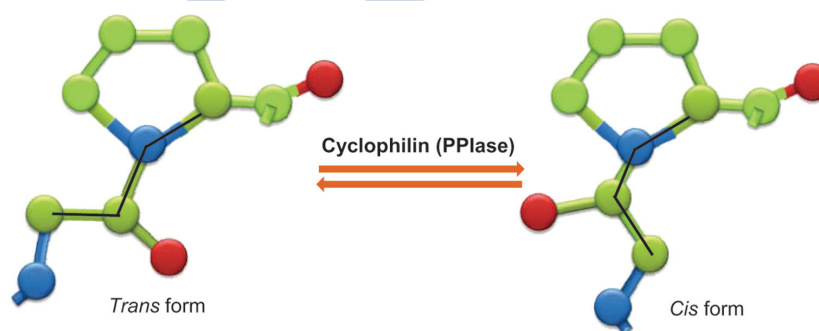


Figura 9. Ilustración esquemática de los isómeros cis y trans del enlace peptidil-prolil, tomado de Kumari, et al. [201]. La interconversión entre las dos formas es catalizada por las ciclofilinas y otras peptidil-prolil isomerasas.

Las Cyps son una subfamilia de proteínas celulares englobadas dentro de la superfamilia conocida como inmunofilinas, en la cual se incluyen las proteínas de unión a FK506 y las parvulinas. Los tres miembros que componen la familia de las inmunofilinas reciben este nombre debido a la capacidad de unirse a moléculas específicas relacionadas con la inmunosupresión [201-204].

Las Cyps son proteínas muy conservadas a lo largo de la evolución, estando presentes tanto en células eucariotas como procariontas. Este grupo de proteínas presentan dos dominios, un dominio común de aproximadamente 109 aminoácidos conocido como dominio de unión a la CsA (CLD, del inglés *Cyclosporine Like*

Domain) y un segundo dominio, exclusivo de cada uno de los miembros de esta familia y por tanto asociado a las estructuras celulares y funciones específicas que llevan a cabo. En el genoma humano se han identificado 16 isoformas de Cyps de las cuales han sido objeto de estudio más detallado 7 de ellas. La localización subcelular específica de cada una de las Cyps es muy amplia: el citosol, el ER, la mitocondria o el núcleo son algunas de las compartimentos donde se pueden encontrar. [205]. También intervienen en muchas funciones celulares como el transporte, la maduración y el plegamiento proteico, actuando como receptores de señales, interviniendo en procesos de apoptosis, eliminando las ROS en la célula o como receptoras de la CsA donde una vez formado el complejo CsA-Cyp A pueden modular la respuesta inmune [206].

A pesar de que las siete ciclofilinas que se han caracterizado estructuralmente presentan actividad isomerasa y se unen a la CsA con distintas afinidades, cada una de ellas desempeña unas funciones específicas dentro y/o fuera la célula. Hasta el momento, principalmente tres de ellas, la Cyp A, la ciclofilina B (Cyp B) y la Cyp D, han sido las de mayor objeto de estudio por su implicación en múltiples eventos a nivel celular y su implicación en muchas patologías; del resto poco o nada se sabe acerca de sus funciones [204, 207].

1.2.2.1 Ciclofilina D

La Cyp D es una proteína formada por 207 aminoácidos, con un peso molecular de 22 kDa, que se encuentra localizada en la matriz mitocondrial en condiciones fisiológicas. La Cyp D tiene una estructura de barril con 8 láminas β antiparalelas, dos hélices- α y una hélice 3_{10} en la que los aminoácidos están dispuestos en una estructura de forma helicoidal en sentido horario [208]. Se caracteriza por jugar un papel fundamental en la formación del mPTP [176]. Se cree que es la interacción de la Cyp D con otras proteínas presentes en las membranas mitocondriales y el espacio intermembrana (VDAC, ANT, la ATPasa de la membrana mitocondrial, el transportador de fosfato, proteínas de la familia Bcl, el receptor de benzodiazepinas o la creatinina cinasa), la que resulta imprescindible para la formación del mPTP [209]. Esto se ha demostrado en estudios con ratones con la expresión de la Cyp D reducida, presentando una mayor resistencia a la formación de esta estructura en ausencia de Cyp D y también mediante su bloqueo farmacológico con CsA [180]. A pesar de que son

muchas las proteínas implicadas en la formación del mPTP, hasta la fecha es la Cyp D la que se considera elemento esencial para inducir su formación. Como se describía anteriormente, esta estructura puede formarse bajo condiciones fisiológicas, como una vía de liberación rápida de Ca^{2+} o patológicas pudiendo inducir la muerte de la célula [178]. A pesar de que los mecanismos mediante los cuales la Cyp D interacciona con sus proteínas diana para formar el poro no están totalmente esclarecidos, se sabe que la translocación de la Cyp D a la membrana mitocondrial interna, y la interacción con su(s) proteína(s) diana para inducir la formación del mPTP en respuesta a un estímulo inductor dado, normalmente estrés oxidativo, puede ocurrir por mecanismos de interacción directos o indirectos. Los mecanismos directos de interacción de la Cyp D con sus proteínas diana en la membrana interna de la mitocondria pueden ser desencadenados por la activación de la proteína diana ante el estrés oxidativo. El estrés oxidativo es uno de los estímulos que pueden inducir cambios conformacionales de la proteína diana por modificaciones químicas y/o cambios en la topografía de la membrana interna de la mitocondria que hagan que se active esta proteína. En principio la mayoría de los estudios apuntan al ANT como la proteína diana necesaria para la interacción con la Cyp D y la iniciación de la formación del poro. Dentro de los mecanismos directos también puede ser que se active la Cyp D y ésta se una a la proteína diana. En este caso, modificaciones postraslacionales como la fosforilación, nitrosilación o la acetilación de sitios específicos de la Cyp D sirven como estímulo para su activación y favorecen la interacción con la proteína diana contribuyendo a la formación del mPTP. La unión indirecta entre la Cyp D a su(s) proteína(s) diana en la membrana mitocondrial interna para inducir la formación del poro puede ocurrir también a través de la interacción con otras proteínas presentes en la matriz mitocondrial, como por ejemplo la proteína supresora tumoral p53. Ésta proteína bajo ciertas situaciones patológicas que induzcan estrés oxidativo, puede dar lugar a su acumulación en la luz de la mitocondria y a favorecer la translocación de la Cyp D a la membrana mitocondrial interna, desencadenando la formación del mPTP, aunque el mecanismo exacto a través del cual se produce todavía no se conoce [209, 210]. Todos estos factores que favorecen la formación de esta estructura pueden llevar a inducir la muerte de la célula, como en el caso del daño cardíaco o cerebral inducido por procesos de isquemia y reperfusión o en la diabetes. Aunque la formación del mPTP es un

fenómeno que se conoce bien, la identidad molecular exacta del complejo multiproteico aún no está bien determinada. Hasta el momento los estudios realizados apuntan a la Cyp D como elemento clave en su regulación y formación, por tanto entender los mecanismos de activación e interacción de esta proteína en la formación del mPTP pueden resultar interesantes en el desarrollo de agentes farmacológicos para modular la muerte celular mediada por la mitocondria.

1.2.2.2 Ciclofilina A

La Cyp A es la más abundante, representando el 0,1-0,6% de las proteínas citosólicas totales. Esta inmunofilina de 18 kDa está relacionada con una gran cantidad de funciones intracelulares, como la regulación del plegamiento, el transporte de proteínas y procesos de señalización intracelular o extracelulares o actuar como ligando de receptores de superficie de membrana [204, 207, 211-214].

La Cyp A consta de una estructura en barril con 8 láminas β antiparalelas y dos cadenas en hélice- α que se encuentran a cada lado de la estructura en barril. El núcleo de esta proteína está formado por 7 residuos aromáticos hidrofóbicos y un bucle que se extiende desde la lisina 118 hasta la histidina 126 y cuatro cadenas β (β 3- β 6) que constituyen la zona de unión para la CsA [202, 215, 216].

1.2.2.2.1 Funciones intracelulares de la ciclofilina A

Para explicar la implicación de la Cyp A en la modulación del sistema inmune es necesario explicar su relación con la CsA y el papel que juega la CN en todo el proceso de señalización celular. Como se citaba anteriormente, el núcleo de unión de la Cyp A interacciona con los residuos de aminoácidos localizados entre la posición 1-3 y 9-11 de la molécula de CsA que se fijan al sitio activo de la Cyp A, con la que forman un complejo binario. Una vez se ha formado el complejo Cyp A-CsA, es capaz de interaccionar con la ranura hidrofóbica localizada en la zona de unión de las dos subunidades de la CN, bloqueando su actividad y por tanto pudiendo modular la respuesta inmune al bloquear la síntesis de diferentes tipos de citocinas [217]. La CN, también conocida como fosfatasa de proteína tipo 2B (PP2B), fue identificada por primera vez por Wang y Desai como una proteína muy abundante en el cerebro, con alta afinidad por la calmodulina (CaM) [218]. Sin embargo, no fue hasta 5 años más tarde,

cuando se descubrió la actividad intrínseca fosfatasa dependiente de Ca^{2+} y CaM [219]. La primera evidencia de que la CN podría desempeñar un papel importante en la señalización del Ca^{2+} concretamente, en células T, se produjo a raíz de estudios bioquímicos realizados con el objetivo de identificar proteínas de unión a la CN en células B y T y que llevó a la identificación de la CN como la principal proteína de interacción con la CaM en ambos tipos celulares [220].

Independientemente de su origen, la CN es una proteína heterodimérica con actividad fosfatasa regulada por Ca^{2+} y CaM, que cataliza la reacción de residuos fosforilados de serina y/o treonina [221]. Esta proteína está formada por una subunidad catalítica con actividad fosfatasa que posee un lugar de unión a la CaM y se conoce como calcineurina A (CnA). Su peso molecular oscila entre los 58 y los 64 kDa dependiendo de la isoforma que presente (CnA α , β y γ) según su origen. Esta subunidad catalítica se encuentra unida firmemente a una subunidad reguladora denominada calcineurina B (CnB). Su peso molecular oscila entre los 16-19 kDa dependiendo igualmente de la isoforma que presente (CnB1 y CnB2) [221, 222].

Aunque la CN se expresa ampliamente en todos los tipos celulares y tejidos, la CnA γ y la CnB2 se expresan casi con exclusividad en los testículos [223, 224] mientras que las isoformas de la subunidad catalítica CnA α y β y la isoforma de la subunidad reguladora CnB1 se encuentran en mayor proporción en las células T en comparación con otros tipos celulares. Ambas subunidades se caracterizan por estar muy conservadas tanto en células eucariotas como procariotas [225].

Como se muestra en la Figura 10, la subunidad catalítica de la CN, consta de un dominio catalítico situado en el extremo N-terminal y un dominio regulador situado en el extremo C-terminal; este último contiene el dominio de unión a la CnB, el dominio de unión de la CaM y un dominio auto-inhibitorio (AID) [222, 226]. Por otro lado, la CnB contiene cuatro dominios de unión al Ca^{2+} .

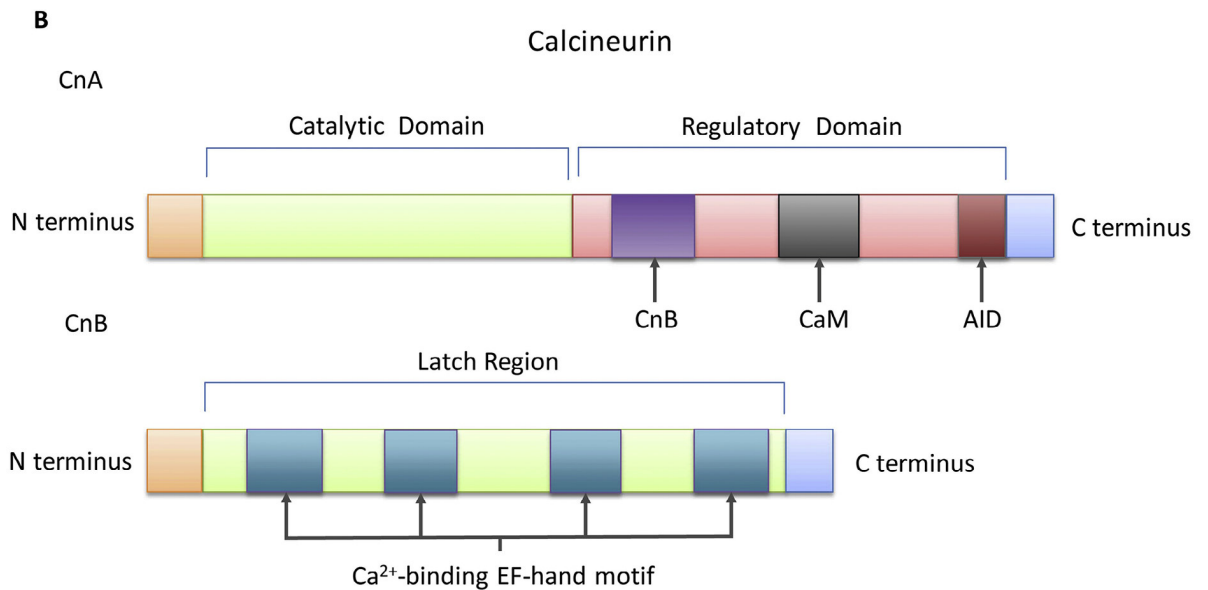


Figura 10: Estructura general de la calcineurina, tomado de *Shou et al.* [226]. La calcineurina consta de dos subunidades denominadas calcineurina A (CnA) y calcineurina B (CnB). La CnA contiene un dominio catalítico con actividad fosfatasa y un dominio regulador que posee un lugar de unión a la subunidad reguladora (CnB), un lugar de unión a calmodulina (CaM) y un dominio autoinhibitorio (AID). En la subunidad reguladora CnB se encuentra una región con 4 lugares de unión de calcio, “Ca²⁺-binding EF-hand motifs”.

La CN juega un papel central en la señalización del Ca²⁺ en las células. Como se muestra en la Figura 11, en condiciones de reposo (ausencia de Ca²⁺/CaM), el AID interacciona con la hendidura del sitio activo del dominio de unión a la CaM para inhibir la actividad fosfatasa. Sin embargo, en estado activado, las concentraciones citoplasmáticas elevadas de Ca²⁺ son detectadas por los dominios de unión al Ca²⁺ situadas en la CnB. Estos niveles de Ca²⁺ citosólicos elevados inducen el desplazamiento del AID, quedando libre el sitio activo de unión a la CaM produciéndose la unión entre la CnA y la CnB. Una vez se ha activado la CN, esta actúa defosforilando los múltiples residuos de fosfoserina de su sustrato, el factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT) [225].

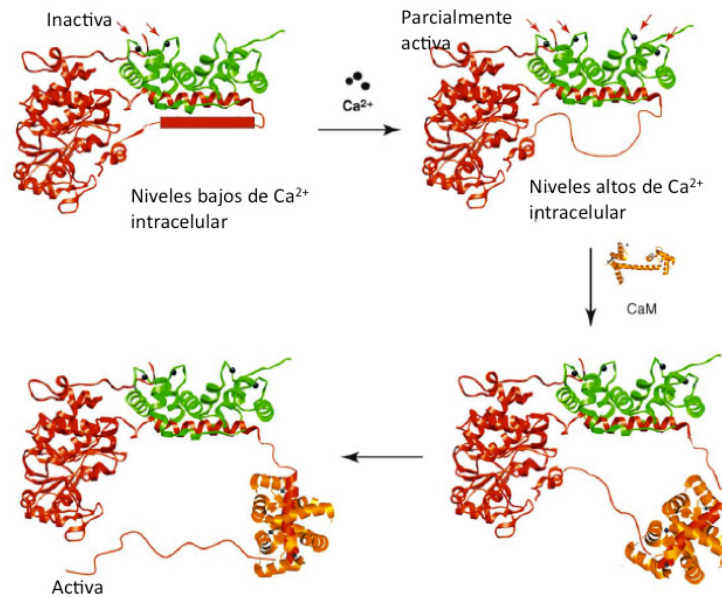


Figura 11. Modelo de activación de la calcineurina dependiente de Ca²⁺ y CaM, adaptado de Li et al. [227]. La CnA está representada en rojo, la CnB en verde y la CaM en naranja. Las esferas negras representan el ion Ca²⁺.

Los NFATs fueron descubiertos por primera vez hace aproximadamente 30 años en extractos nucleares de linfocitos T activados. Inicialmente se pensó que estos factores actuaban como factores de transcripción en células T activadas [228]. Sin embargo, no fueron estudiados en profundidad hasta el desarrollo de fármacos inmunosupresores como la CsA o el tacrolimus (FK506). Entonces se observó que los NFAT estaban presentes no sólo en los linfocitos T sino en todo tipo de células, tanto sanas como tumorales [226, 229, 230].

La familia de factores de transcripción NFAT está compuesta por 5 miembros codificados por distintos genes: NFATc1 (también denominado NFATc2 o NFATp), NFAT2 (nombrado también NFATc1), NFAT3 (o NFATc4), NFAT4 (cuyos nombres alternativos son NFATc3 y NFATx) y el NFAT5 (o tonEBP, del inglés *tonicity enhancer binding protein*), éste es un factor de transcripción importante en la regulación de las respuestas al estrés hipertónico [231].

Las proteínas NFAT contienen un dominio de transactivador amino-terminal (TAD) y un extremo carboxilo-terminal. Las proteínas NFAT1-4 poseen dos dominios adicionales muy conservados en los cuatro miembros. El dominio de unión a DNA, (RHR del inglés, *Rel-homology region*), está formado por 300 aminoácidos con una

homología en su secuencia de entre un 68-73% entre los distintos subtipos existentes. Además posee otro dominio conocido como región de homología del NFAT, (NHR del inglés, *NFAT homology region*), que es el dominio regulador y contiene el sitio de unión de la CN, también con una región muy conservada de 300 aminoácidos y que esta codificada por un exón simple en los cuatro NFATs presentes en todas las especies de vertebrados estudiadas hasta el momento. [232]. La estructura general de las proteínas NFAT1-4 se representa en la Figura 12. Los NFAT1-4 están regulados por Ca^{2+} y CN, excepto el NFAT5, que se activa en respuesta al estrés osmótico, pues carece del dominio NHR [233].

En células en reposo, la región NHR se encuentra fuertemente fosforilada en los residuos de serina localizados en regiones con secuencias ricas en serina (SRR-1, repeticiones SPxx y SRR-2). Ante un aumento de Ca^{2+} intracelular, inducido por un estímulo concreto se activa a la CN. Al activarse esta fosfatasa, actúa defosforilando esas regiones concretas del NFAT [234, 235]. La defosforilación del NFAT induce un cambio conformacional en la proteína, que resulta en la exposición de la secuencia de localización nuclear (NLS), y en un incremento de su afinidad por el DNA. Una vez en el núcleo, los NFAT cooperan con otros factores de transcripción como el activador proteico 1 y los complejos Fos-Jun para iniciar la transcripción génica y producir interleucinas, especialmente la interleucina-2 (IL-2). La refosforilación del dominio NHR conduce a la exposición de la secuencia de exportación nuclear (NES) y al enmascaramiento de la secuencia de localización nuclear (NLS), dando lugar a la translocación del NFAT del núcleo al citosol, finalizando así su función de transcripción [231].

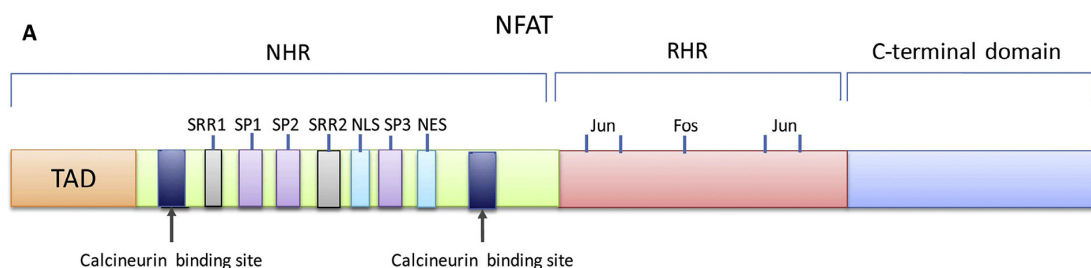


Figura 12: Estructura general de las proteínas NFAT1-4 [226]. Las proteínas NFAT1-4 constan de un dominio *Rel-homology region* (RHR), otro dominio conocido como *NFAT homology region* (NHR) y un

dominio carboxilo-terminal mientras que el NFAT5 carece del dominio NHR. El dominio NHR contiene un dominio de transactivación amino-terminal (TAD), el lugar de unión de la calcineurina (CN), la secuencia de localización nuclear (NLS) y la señal de exportación nuclear (NES). También presenta varias zonas ricas en prolina (SRR1, SRR2, SP1, SP2 and SP3). El dominio RHR contiene el dominio de unión de DNA.

Por tanto, en condiciones fisiológicas la Cyp A no interviene en el proceso de activación de la CN. Sin embargo, en presencia de CsA se forma un complejo binario CypA-CsA que resulta imprescindible para unirse a la CN en una región muy concreta situada entre la zona de unión de la CnA y la CnB, como se muestra en la Figura 13. De esta forma se impide la unión de la CN a su sustrato, el NFAT, y por tanto su defosforilación [228, 231, 236-238].

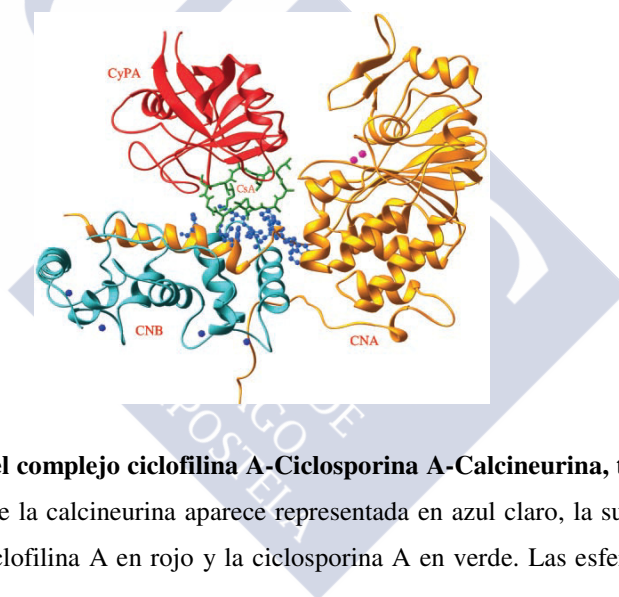


Figura 13. Representación del complejo ciclofilina A-Ciclosporina A-Calcineurina, tomado de *Huai et al.* [239]. La subunidad B de la calcineurina aparece representada en azul claro, la subunidad A de la calcineurina en amarillo, la ciclofilina A en rojo y la ciclosporina A en verde. Las esferas de color azul añil representan el ion Ca^{2+} .

Los complejos Cyp A-CsA compiten con el sustrato de la CN (NFAT) por su sitio de unión y, aunque esto por sí mismo explicaría la acción inhibidora del complejo, no se descarta que además, los complejos Cyp A-CsA impidan el acceso de los sustratos al sitio activo de la enzima por impedimento estérico [206]. El mecanismo inmunosupresor de la CsA se esquematiza en la Figura 14.

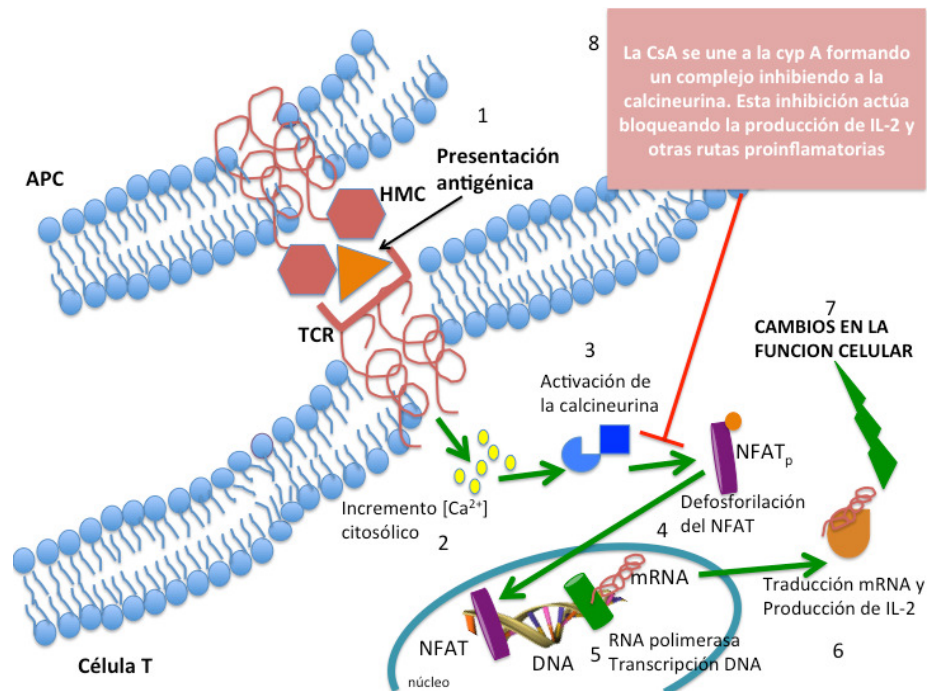


Figura 14: Principal mecanismo de acción inmunosupresivo de la ciclosporina A. 1. Presentación de un antígeno a una célula T y transmisión de la señal al interior de la célula T. 2. Incremento de las concentraciones de Ca^{2+} citosólico. 3. Activación de la calcineurina por efecto del incremento de Ca^{2+} . 4. Defosforilación del factor nuclear de linfocitos T activados (NFAT) y translocación al núcleo. 5. Transcripción del (ácido desoxiribonucleico) ADN. 6. Traducción del (ácido ribonucleico mensajero) mRNA y producción de IL-2. 7. Cambios en la función celular. 8. En presencia de CsA se forma un complejo con la Cyp A que se une a la calcineurina y bloquea la defosforilación del NFAT.

Se sabe que la actividad isomerasa de las CyPs guarda una relación directa con el plegamiento de las proteínas [240]. En el caso de la Cyp A está descrito que interviene en el plegamiento proteico de la transferrina o el colágeno [241, 242]. Además de intervenir en esta función, la Cyp A actúa en el transporte de proteínas ya maduras. El receptor de asialoglicoproteína, el receptor de insulina y el ligando Flt3 (factor de crecimiento y diferenciación de células hematopoyéticas) son ejemplos de proteínas en cuyo transporte entre el ER y el aparato de Golgi y la membrana plasmática interviene la Cyp A [243-245]. Más recientemente se ha descubierto también su implicación en el transporte del receptor CD147 o EMMPRIN (del inglés *extracellular matrix metalloproteinase inducer*). Los estudios de unión realizados entre la Cyp A y el receptor CD147 han demostrado que la interacción del residuo de prolina 211 del receptor CD147 situado en la región transmembrana con la Cyp A resulta fundamental

el transporte a la membrana de este receptor. De este modo la CsA puede modular la expresión de todos estos receptores al unirse a la Cyp A e inhibir sus funciones en el transporte proteico [246, 247].

1.2.2.2.2 Funciones extracelulares de la ciclofilina A

La primera Cyp en ser descubierta en los fluidos extracelulares fue la Cyp B [248]. Hasta hace no mucho tiempo, se pensaba que la función de la Cyp A era meramente intracelular, pero en el año 1992 se descubrió que esta proteína era excretada al medio por los macrófagos en respuesta a la estimulación con lipopolisacáridos [211]. En el año 2001 se identificó el EMMPRIM como receptor para la Cyp B [249] y posteriormente se demostró que era necesario también para el desarrollo de las funciones celulares de la Cyp A extracelular [246].

El receptor CD147 es una glicoproteína transmembrana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Igs). El receptor está formado por 269 residuos de aminoácidos. Consta de un dominio extracelular, que contiene dos dominios Ig glucosilados pesados y un dominio citoplasmático. La región extracelular está comprendida entre las posiciones 25 y la 200. Dentro de esta región extracelular, 77 residuos de aminoácidos forman el dominio extracelular IgI, desde la posición 25 a la 101. El dominio extracelular IgII compuesto por 95 residuos se extiende desde la posición 106 a la 200. El dominio de transmembrana simple contiene un residuo de ácido glutámico (Glu 218), que resulta fundamental para las interacciones proteína-proteína asociadas a la membrana plasmática y que está ampliamente conservado entre las diferentes especies [214]. La estructura y los dominios funcionales del receptor CD147 se representan en la Figura 15. Numerosos estudios apuntan a que los diferentes dominios del receptor CD147 están asociados con diferentes actividades [250]. El receptor CD147 está ampliamente expresado a distintos niveles y en diferentes tipos celulares entre las que se encuentran las células hematopoyéticas, las células epiteliales, las células endoepiteliales y también en células tumorales [214, 251]. Este receptor se expresa constitutivamente en bajos niveles en monocitos, linfocitos y neutrófilos en reposo. Sin embargo, su expresión se exagera cuando las células sufren un estímulo que les lleva a su estado activado, por ejemplo cuando intervienen en un proceso inflamatorio o autoinmune [252].

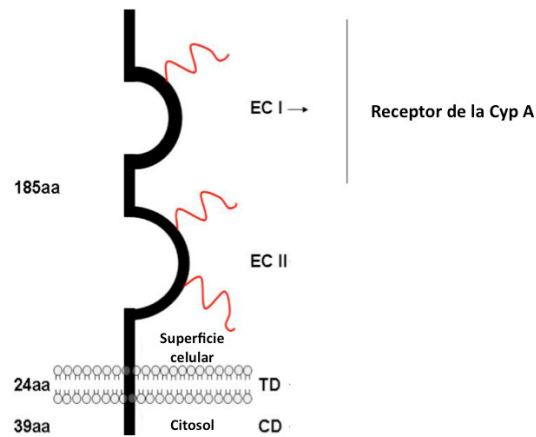


Figura 15: Estructura y dominios funcionales del receptor CD147 asociados a los diferentes mecanismos de transducción que desencadenan la unión de distintos ligandos, adaptado de Zhu *et al.* [253]. Dominio extracelular I (ECI), dominio extracelular II (ECII), dominio transmembrana (TD) y dominio citoplasmático (CD).

La Cyp A actúa como potente mediador de la inflamación, estimulando la respuesta inflamatoria al ejercer una actividad quimiotáctica para los neutrófilos y linfocitos a través de su unión al receptor CD147 en los residuos de prolina 180 y glicina 181 del ECI [254] (Figura 15).



2. OBJETIVO

Algunas moléculas aisladas a partir de organismos vivos tienen mecanismos de acción novedosos y dan lugar a efectos muy interesantes que abren muchas posibilidades farmacológicas. En el marco de dos proyectos Europeos (BAMMBO -Ref. 265896- y PHARMASEA -Ref. 312184-) cuya finalidad era la obtención de moléculas con actividad biológica de origen natural, se aislaron y purificación varios compuesto producidos por organismos marinos y terrestres de actividad desconocida. De esta forma se han obtenido, a partir de cultivos de cianobacterias del género *Phormidium* un compuesto nuevo denominado autumnalamida, y a partir de la esponja marina *Sponginella gracilis* cuatro metabolitos secundarios, gracilinas A, H y L y tetrahidroaplisulfurina-1. Estas moléculas mostraron actividad antitumoral, antioxidante y antialzhéimer por un mecanismo de acción no identificado. En este contexto, el objetivo de la presente Tesis Doctoral es estudiar las señales intracelulares moduladas por la autumnalamida y profundizar en las rutas intracelulares implicadas en el efecto de los compuestos aislados de *Sponginella*.





3. PUBLICACIONES

En este apartado de la memoria se recogen los datos obtenidos en la Tesis Doctoral que han sido publicados en revistas internacionales. Se presentan cinco artículos en los que se describe la metodología usada, las conclusiones y la discusión de los resultados. Estos trabajos recopilan los datos sobre el mecanismo de acción de la autumnalamida, purificada a partir de cultivos de cianobacterias de agua dulce, y de las gracilinas A, H y L y la tetrahidroaplisulfurina-1 obtenidas de la esponja marina *Spongionella gracilis*. Todos los resultados conforman una única sección por la continuidad de los experimentos. Se estudió el efecto de los compuestos sobre los niveles citosólicos de Ca^{2+} , el papel de canales SOC y la relación con los principales reservorios intracelulares (mitocondria y ER) de este ión. Estos estudios se realizaron mediante microscopía de fluorescencia utilizando Fura-2 AM, un indicador que permite cuantificar las variaciones de Ca^{2+} . El modelo celular empleado fue el neuroblastoma humano SH-SY5Y. De esta forma se determinó que la mitocondria tiene un papel fundamental en el efecto de todos los compuestos sobre la homeostasis del calcio. A continuación se estudió la unión de los compuestos con la Cyp D, una proteína fundamental en la regulación mitocondrial, y por homología con la Cyp A, empleando un biosensor de afinidad SPR. Esta técnica permite determinar la afinidad de un ligando con un analito. La autumnalamida mostró la mayor afinidad por la Cyp D, mientras que todos los compuestos se unieron con la Cyp A. Como esta proteína se relaciona con la modulación del sistema inmune, se determinó el papel de los compuestos en varios parámetros asociados con su función, utilizando linfocitos T humanos purificados a partir de sangre de donantes. Se estudiaron los efectos sobre la CN y la producción de IL-2 mediante ELISA, y la expresión del factor de transcripción NFATc1 en el núcleo empleando la técnica de western blot. Estos resultados permitieron identificar a la autumnalamida fundamentalmente como una molécula que induce la apertura del mPTP e inhibe a la CN, mientras que los compuestos de *Spongionella* parecían tener un efecto inmuno-modulador. Por eso se estudiaron los niveles de expresión del receptor CD147 en presencia de estos compuestos en la superficie de membrana celular, con técnicas de microscopía confocal, y el efecto sobre la secreción de Cyp A y la migración linfocitaria. Finalmente, los dos compuestos de *Spongionella* que mostraron los resultados más interesantes, gracilinas H y L, se testaron en un modelo animal de

reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) para comprobar su capacidad moduladora de la respuesta inmune.

Todos los resultados se recogen en las siguientes publicaciones:

- I. Autumnalamide, a prenylated cyclic peptide from the cyanobacterium *Phormidium autumnale*, acts on SH-SY5Y cells at the mitochondrial level**
- II. Autumnalamide targeted proteins of the immunophilin family**
- III. *Spongionella* secondary metabolites regulate store operated calcium entry modulating mitochondrial functioning in SH-SY5Y neuroblastoma cells**
- IV. Identification of *Spongionella* compounds as cyclosporine A mimics**
- V. *Spongionella* secondary metabolites as promising modulators of immune response**

A continuación se presentan los artículos escritos en inglés descritos en este apartado, junto con una traducción del resumen en castellano.

I. Autumnalamide, a Prenylated Cyclic Peptide from the Cyanobacterium *Phormidium autumnale*, Acts on SH-SY5Y Cells at the Mitochondrial Level

Resumen

Las cianobacterias filamentosas del género *Phormidium* han sido poco estudiadas debido a su diversidad química. Se ha demostrado por primera vez, que el cultivo de *Phormidium autumnale* produce un péptido cíclico prenilado denominado autumnalamide (**1**). La estructura de este péptido fue determinada por completo tras una exploración en profundidad de los resultados espectroscópicos, incluyendo NMR y HRMS. Curiosamente, la fracción prenilada se localizó en el extremo guanidina terminal del aminoácido arginina. Las configuraciones absolutas de la mayoría de los aminoácidos fueron medidas usando el análisis enantioselectivo GC/MS, el modelado ^{13}C NMR se usó para la determinación de la D-arginina y la D-prolina. Los efectos de **1** en el flujo de calcio (Ca^{2+}) y sodio fueron estudiados en las células SH-SY5Y y hNav 1.6 HEK. Cuando la entrada de Ca^{2+} se estimuló con tapsigargina, se observó un fuerte bloqueo en presencia de **1**. Como consecuencia, este compuesto podría actuar bloqueando la recaptación normal de Ca^{2+} por parte de la mitocondria, induciendo la apertura del poro de permeabilidad transitoria, el cual resulta en un bloqueo indirecto de los canales de calcio dependientes de reservorio.

**Autumnalamide, a Prenylated Cyclic Peptide from the Cyanobacterium
Phormidium autumnale, Acts on SH-SY5Y Cells at the Mitochondrial Level**

Coralie Audoin,^{†,‡,∇} Jon Andoni Sánchez,^{§,∇} Grégory Genta-Jouve,[⊥] Amparo

Alfonso,[§] Laurent Rios,[‡] Carmen Vale,[§] Olivier P. Thomas,^{*,†,||} and Luis M.

Botana^{*,§}

[†]Institut de Chimie de Nice-PCRE, UMR 7272 CNRS, Faculty of Science, University of Nice Sophia-Antipolis, Parc Valrose, 06108 Nice, France

[‡]GREENSEA SAS, Promenade du Sergent Jean-Louis Navarro, 34140 Mèze, France

[§]Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain

[⊥]Laboratoire de Pharmacognosie, UMR 8638 CNRS, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

^{||}Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie Marine Et Continentale, UMR 7263 CNRS–IRD–Aix-Marseille Université–UAPV, Station Marine d'Endoume, Rue de la Batterie des Lions, 13007 Marseille, France

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=autumnalamide>

II. Autumnalamide targeted proteins of the immunophilin family

Resumen

Trabajos previos en nuestro laboratorio indicaron que la autumnalamida bloqueaba los canales dependientes de reservorio (SOC) a través de la modulación mitocondrial. En este trabajo estudiamos el efecto de la autumnalamida sobre los flujos Ca^{2+} inducidos por ionomicina. Así, la autumnalamida no modifica los flujos de Ca^{2+} sensibles a ionomicina de los reservorios intracelulares, mientras que la entrada de Ca^{2+} inducida por ionomicina fue bloqueada con una potencia similar, independientemente de si la incubación fue realizada antes o después del vaciamiento de reservorios intracelulares sensibles a ionomicina. Sin embargo, la autumnalamida no fue capaz de bloquear la entrada de Ca^{2+} una vez que la entrada del ion había sido activada. Además, el compuesto inhibió de manera efectiva la liberación de Ca^{2+} inducida por el ácido flufenámico (FFA) en la mitocondria pero no afectó a su entrada. En un estudio anterior se determinó que el efecto de la autumnalamida era inhibido por la ciclosporina A (CsA), por eso, se estudiaron las dianas sobre las que actúa este fármaco. Además, se estudió la afinidad de la autumnalamida por la ciclofilina D (Cyp D). Se calculó la constante de disociación en el equilibrio (K_D) obtenida para la unión Cyp D-autumnalamida. El péptido mostró una afinidad de unión por la Cyp D de $1,52 \pm 1,39 \mu\text{M}$. Además se calculó la K_D para la ciclofilina A (Cyp A)-autumnalamida. El péptido mostró una afinidad similar a la CsA ($8,08 \pm 1,23$ y $6,85 \pm 1,1 \mu\text{M}$ respectivamente). Tras testar la capacidad de unión de la autumnalamida a la Cyp A, se estudió la actividad de este compuesto en una ruta modulada por la Cyp A. De este modo se testó el efecto sobre la liberación de interleucina 2 (IL-2) en linfocitos T activados. La autumnalamida fue capaz de reducir los niveles de IL-2 a valores próximos a las células en reposo. A continuación se evaluó el efecto sobre la calcineurina y el factor de transcripción NFATc1. Mientras la CsA inhibe tanto la calcineurina como el NFATc1, la autumnalamida no produjo ningún efecto sobre el NFATc1. De estos resultados concluimos que la autumnalamida tiene como diana la mitocondria y bloquea la producción de IL-2 a través de la modulación de los canales SOC.

Autumnalamide targeted proteins of the immunophilin family

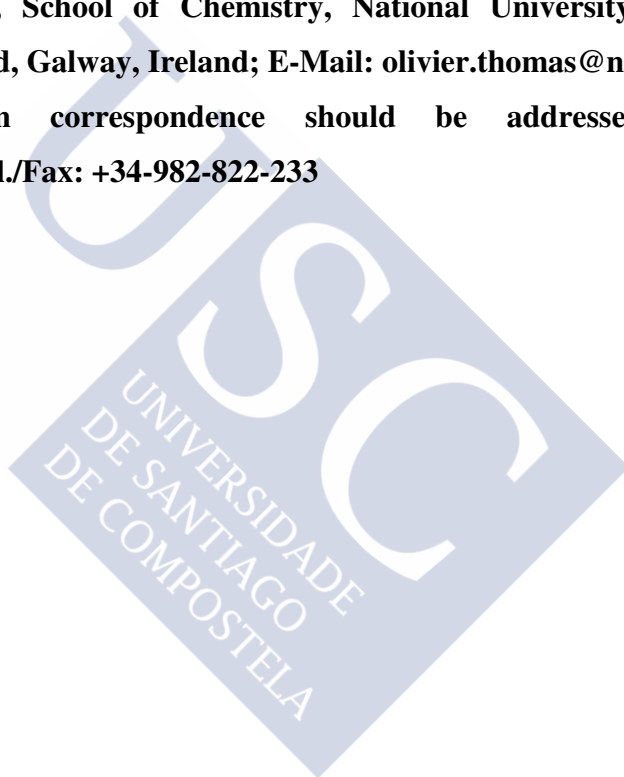
Jon Andoni Sánchez^a, Amparo Alfonso^a, Olivier P Thomas^{b,c}, Luís M. Botana^{a*}

^a Departamento de Farmacología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela, Lugo 27002, Spain; E-Mails: jonandoni.sanchez@rai.usc.es (J.A.S.); amparo.alfonso@usc.es (A.A.)

^b Geoazur, UMR Université Nice Sophia Antipolis-CNRS-IRD-OCA, 250 rue Albert Einstein, 06560 Valbonne, France

^c Marine Biodiscovery, School of Chemistry, National University of Ireland Galway, University Road, Galway, Ireland; E-Mail: olivier.thomas@nuigalway.ie

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: Luis.Botana@usc.es; Tel./Fax: +34-982-822-233



Abstract

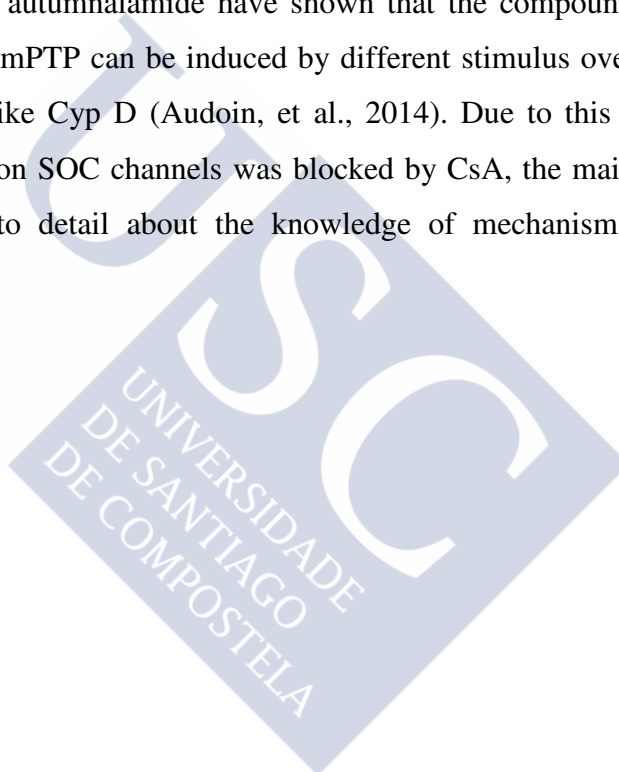
Previous works with autumnalnamide reported that Store Operated Calcium (SOC) channels were blocked through mitochondrial modulation. In the present paper we studied the effect of autumnalnamide on ionomycin Ca^{2+} fluxes. Thus, autumnalnamide did not modify ionomycin-sensitive intracellular pools while the ionomycin-induced Ca^{2+} influx was blocked with similar potency whether the incubation was done before or after ionomycin-sensitive pools depletion. Nevertheless, autumnalnamide was not able to inhibit ionomycin-induced Ca^{2+} influx once the membrane channels were activated. Moreover, the compound efficiently inhibited flufenamic acid (FFA) Ca^{2+} release induced in the mitochondrion but not the next influx. Since in previous work the effect of autumnalnamide was inhibited by cyclosporine A (CsA), structures that target this drug were studied. Therefore, the affinity of autumnalnamide for cyclophilin D (Cyp D) was examined. The equilibrium dissociation constant (K_D) obtained for Cyp D-autumnalnamide was $1.51 \pm 1.399 \mu\text{M}$. Moreover, the K_D for cyclophilin A (Cyp A)-autumnalnamide was calculated. The peptide had a similar order of Cyp A binding affinity than CsA (8.08 ± 1.23 and $6.85 \pm 1.1 \mu\text{M}$ respectively). After testing autumnalnamide-binding capacity for Cyp A, the activity of this compound in a pathway where Cyp A is involved was tested. Thus, the effect on interleukin (IL)-2 release on activated T-lymphocytes was checked. Autumnalnamide was able to reduce IL-2 levels near to T cells in resting conditions. Next, the effect over calcineurin and NFATc1 was also evaluated. While CsA inhibits both calcineurin and NFATc1, autumnalnamide did not produce any effect over NFATc1. From these results we can conclude that, autumnalnamide targeted mitochondrion and prevent T-cells from IL-2 production through the modulation of SOC Ca^{2+} channels.

Keywords: *Phormidium autumnale*, SOC channels, Cyclophilin, mitochondria, Ca^{2+}

1. Introduction

Filamentous cyanobacteria of the genus *Phormidium* have a worldwide distribution and present a large chemical diversity with nearly 200 described species. The genus *Phormidium* forms mats on wet soil, mud, wetted rocks, macrophytes and in standing and running waters. Up to now, several species from different genus have been cultivated for the production of large quantities of biomass with wide range of applications, including animal and human nutrition, as biofertilizers in agriculture, cosmetics or with energy purpose to produce biodiesel (Markou and Georgakakis, 2011). Nevertheless, the use of active metabolites in the pharmaceutical sector is less studied. In the case of cyanobacteria, the production of toxic metabolites with therapeutic potential has attracted the attention of pharmacy industry (Coates, 2013). Autumnalamide is a prenylated cyclic peptide obtained from the cyanobacteria *Phormidium autumnale* whose chemical structure has been recently elucidated (Figure 1) (Audoin, et al., 2014). This specie is one of the most common of the genus *Phormidium*, which colonizes stones in streams and rivers (Komárková, 2003). Initial studies on the biological activity of this natural compound has shown that autumnalamide is able to induce calcium influx blockade through store operated calcium channels (SOC channels) in SH-SY5Y neuroblastoma cells due to an effect at the mitochondrial level, disrupting the mitochondrial membrane potential (MMP) and inducing the opening of mitochondrial permeability transition pore (mPTP). Moreover, the effect of autumnalamide on SOC channels was abolished by pre-incubation with the immunosuppressant drug cyclosporine A (CsA), (Audoin, et al., 2014). The mPTP complex is a multiproteic structure composed by different proteins. Among them, cyclophilin D (Cyp D) is an essential component with a molecular weight of 22 kDa (Elrod and Molkentin, 2013, Javadov and Kuznetsov, 2013). CsA is a cyclic 11-amino-acid peptide isolated from the fungus *Tolypocladium inflatum* and was described as a potent and selective mPTP inhibitor due to Cyp D binding in the matrix and on the inner surface of the mitochondrial membrane (Elrod and Molkentin, 2013, Hoppert, et al., 2001). Besides Cyp D binding and mPTP opening inhibition, CsA has the ability to bind to all Cyclophilins (CyPs) present in the cell with different affinities due to a high degree of sequence conservation in their structure (Wang and Heitman, 2005, Fruman, et al., 1994). The CyPs protein family structurally contain two main protein domains, a

cyclophilin (Cyp)-like domain, which is the conserved domain across all family members and the specific domain depending on the family member (Lee and Kim, 2010). These proteins are present in all eukaryote and prokaryote cells like plants, fungi, bacteria, insects and human cells with a common peptidyl-prolyl isomerase activity. That is, Cyps catalyze the isomerisation of the peptide bonds from trans to cis form at the proline residues and facilitates protein folding among other functions (Wang and Heitman, 2005, Kofron, et al., 1991, Davis, et al., 2010). The location of these proteins is very broad and can be found in different organelles and also in the cytosol or in the extracellular medium (Lee and Kim, 2010, Kumari, et al., 2013). Our initial studies on the biological activity of autumnamide have shown that the compound induced the formation of mPTP. The mPTP can be induced by different stimulus over the proteins that form this structure like Cyp D (Audoin, et al., 2014). Due to this and since the effect of autumnamide on SOC channels was blocked by CsA, the main objective of this work was to go into detail about the knowledge of mechanism of action of autumnamide.



2. Materials and Methods

2.1 Chemicals and Solutions.

Carboxymethyl dextran (CM5) sensor chips, Hank's Balance Solution Surfactant P20 (HBS-EP) buffer (pH 7.4, 0.01 M 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 0.15 M NaCl, 3 mM Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 0.005% polysorbate), amine coupling kit (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) and ethanolamine-HCl were supplied by BiacoreAB (Uppsala, Sweden). Percoll was obtained from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Plastic tissue-culture dishes were purchased from Falcon (Madrid, Spain). RPMI and Foetal calf serum (FBS) were bought from Gibco (Glasgow, UK). The Pan T cell Isolation Kit (human) and the monoclonal antibody to human CD3, clone BW264/56, FITC were purchased from Miltenyi Biotec (Germany). Human interleukin (IL)-2 ELISA kit was obtained from Invitrogen (Spain). Active human Cyclophilin D (Cyp D) and Active Human Cyclophilin A (Cyp A) full-length proteins were from Abcam (Cambridge, UK). Anti-nuclear factor of activated T cells (NFAT) c1 mouse monoclonal antibody [AT1C3] to NFATc1 and rabbit polyclonal anti-lamin B1 antibody were from Abcam (UK). FURA-2AM was obtained from Molecular Probes. Polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane was from Millipore (Temecula, CA). Polyacrylamide gels and molecular weight marker Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope was from BioRad (Barcelona, Spain). The Protease Inhibitor Complete Tablets and Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets were from Roche (Spain). Bovine serum albumin (BSA) and CsA (purity \geq 98.5%), Flufenamic acid (FFA), carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) and the rest of Chemicals and reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). The strain of *Phormidium autumnale* was purchased from the Culture Collection of Algae and Protozoa (UK, CCAP1446/10). The strain was cultured and extracted as previously described (Audoin, et al., 2014). Autumnalamide was isolated with purity higher than 95% as demonstrated by its ^1H NMR spectrum. The composition of saline solution (PBS) used for human T lymphocytes purification was in (mM): 137 ClNa, 8.2 Na_2HPO_4 , 1.5 KH_2PO_4 , 3.2 KCl and 2 EDTA. The composition of Umbreit saline solution was in (mM): 119 NaCl, 1.2 Mg (SO_4), 1.2 NaH_2PO_4 , 22.8 NaHCO_3 , 5.9 KCl, 1 CaCl_2 and 1g/L Glucose. The pH

was equilibrated between 7.2-7.3. Stock solutions of drugs were done in dimethylsulphoxide (DMSO).

2.2 Human neuroblastoma culture cells and human T lymphocytes isolation

Neuroblastoma cell line SH-SY5Y was purchase from American Type Culture Collection (ATCC) Number CRL-2266. The cells were plated in 25-cm² flasks at a cultivation ratio of 1:10. The cells were maintained in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) from ATCC and F12 Medium (Invitrogen) 1:1 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) plus 100 UI/mL penicillin and 100µg/mL streptomycin. The neuroblastoma cells were expanded weekly using 0,05% trypsin/EDTA (1x) (Invitrogen).

Peripheral lymphocytes were isolated from human fresh heparinised blood from healthy volunteers as previously described (Alfonso, et al., 2001). The blood was diluted in the same proportion with PBS plus EDTA 2 mM previously equilibrated at room temperature. 4 mL of diluted blood were placed over 3 mL of isotonic percoll (57,5%) carefully avoiding the mixture of the two phases. Once the tubes were prepared they were centrifuged at 3000 rpm, 25 min at room temperature. After centrifugation, different phases were obtained and only the fraction that containing the population of white blood cells was collected and washed three times by centrifugation with PBS-EDTA at 1500 rpm, 10 min, room temperature to remove remaining percoll. Lymphocyte purity was always higher than 80%. T lymphocytes were purified from this population with a human Pan T cell Isolation Kit. This is an indirect magnetic labeling system for the isolation of untouched T cells. T cell purity was always higher than 95%. Assessment of cell purity was performed by flow cytometry by using a monoclonal antibody to human CD3 labeled with FITC. Viability (>95%) was determined by trypan blue exclusion. Pure T cells were maintained in RPMI 1640 plus 10% FBS and plated in 24 plastic tissue-culture dishes in humidified 5% CO₂ and 95% air atmosphere at 37°C.

2.3 Measurements of Cytosolic Free Calcium

Cells were seeded onto 18-mm glass cover slips and used between 48-72 h after plating at a density of 120.000 cells/glass cover slip. For cytosolic Ca²⁺ measurements, cells were washed twice with saline solution (Umbreit) supplemented with 0.1% BSA.

Umbreit composition was (mM): NaCl 119, Mg (SO₄) 1.2, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 22.85, KCl 5.94, Glucose 0.1% and CaCl₂ 1. In all assays the solutions were equilibrated with CO₂ before being used, adjusting the final pH between 7.2-7.4. The cells were loaded with the Ca²⁺-sensitive fluorescent dye FURA-2 AM (0,5 μM) for 6,5 min at 37 °C and 300 rpm. Loaded cells were washed twice with saline solution and the cover slips were placed in a thermostatic chamber (Life Sciences Resources, UK). Cells were viewed using a Nikon Diphot 200 microscope equipped with epifluorescence optics (Nikon 40X- immersion UV- Fluor objective). Addition of drugs was made by aspiration and addition of fresh bathing solution with the drug to the incubation chamber. Cytosolic Ca²⁺ levels as FURA-2 ratio was obtained from the images collected by fluorescent equipment, Ultra-high-speed wavelength switching illumination system (Lambda-DG4) for excitation and Lambda 10-2 for emission from Sutter Instruments Co., USA. The Light source was a xenon arc bulb and the different wavelengths used were chosen with filters. Cells were excited at 340 and 380 nm lights alternately and emission was collected at 510 nm.

2.4 Viability Assay

Cells were incubated with different concentrations of autumnalamide ranging from 0.001 to 10 μM for 24 and 48h. After incubation, cells were washed twice with saline solution. MTT (500 μg mL⁻¹) dissolved in saline solution was added to the 96-well microplate for 1h at 37°C (300 rpm) in the dark. Finally the MTT incubation media was removed and cells were washed once before the addition of SDS at 5%. Colored formazan salt aggregates were measured at 595 nm in a spectrophotometer plate reader.

2.5 Binding experiments: Surface activation, Ligand Immobilization and Binding

A Biacore X SPR biosensor with Control Software and BIAevaluation software version 3.0 from Biacore (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) was used to check the binding between molecules. Sensor surface activation and ligand immobilization were performed by using HBS-EP as running buffer at a flow rate of 5 μL min⁻¹ and 25°C. CM5 sensor chip were used as surface where Cyp D or Cyp A was immobilized as ligand. The CM5 chip is a glass slide coated with a thin layer of gold with a matrix of carboxymethylated dextran covalently attached. The CM5 chip was activated using an

amine coupling kit. Following manufacture instructions, a mixture (1:1, v/v) of EDC and NHS was applied for 2 min over the sensor chip. After activation, the ligand, $100\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ of Active human Cyp A or Cyp D full-length protein dissolved in sodium acetate 10 mM at pH 4.5 was added. In these conditions, a typical covalent binding curve was obtained. Then, the CM5 chip surface was washed with HBS buffer and no fall in the signal was observed, indicating the protein immobilization onto the sensor chip surface. Finally, ethanolamine-HCl was injected to deactivate the remaining active esters, remove non-covalently bound protein and avoid non-specific binding (Sanchez, et al., 2015, Alfonso, et al., 2014). Next, analytes were added to check the binding between them and Cyp D or Cyp A. Individual binding curves for each analytes were analyzed by determining the kinetic constant of analytes-Cyp A/D binding, namely, the observed rate constant (K_{obs}), the association rate constant (K_{ass}), the dissociation rate constant (K_{diss}), and the kinetic equilibrium dissociation constant (K_{D}). At equilibrium, by definition, $K_{\text{diss}}/K_{\text{ass}} = K_{\text{D}}$. The pseudo-first-order association rate constants K_{obs} (s^{-1}) were determined by using the 1:1 Langmuir association model of BiaEvaluation software (BiaCore, Uppsala, Sweden). Then a representation of K_{obs} against the corresponding concentration of compound was done. These plots follow a linear correlation coefficient. From the equation of this representation, K_{ass} , $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, gradient of the Plot, and K_{diss} , s^{-1} , intercept of the Plot was obtained. Within these two values, the kinetic equilibrium dissociation constant K_{D} for the analyte-Cyp A/ D binding was obtained.

The duration of the sample injection was 2 min at $10\mu\text{L min}^{-1}$ flow rate. Next, dissociation of bounded molecules in HBS-EP buffer flow was studied. The bounded drugs were removed from the chip surface before the next injection by adding 1 M Glycine-HCl at pH 2.5 for 1 min. The association phase was used to quantify the compound-Cyp A/ D interactions.

2.6 Interleukin 2 release

Human T lymphocytes at the concentration of 1×10^6 cells mL^{-1} were plated in 24 well plates and pre-treated for 2 hours with autumnalimide (10 μM). Then, cells were stimulated with Concanavalin A (Con A) at $50\mu\text{g}/\text{mL}$ for 48 h to induce IL-2 release.

The amount of IL-2 released to the culture medium was evaluated using a Human IL-2 ELISA kit.

2.7 Calcineurin Phosphatase Activity assay

Calcineurin phosphatase activity was used as a measure of Cyp A activity by means of a calcineurin Phosphatase Assay Kit (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY). This is a complete colorimetric assay kit to measure calcineurin phosphatase activity. The Cyp-A-drug complex was allowed to form for 1h at room temperature. 1 nM of Cyp A and different concentrations of drugs were employed dissolved in deionised water. After 1h, recombinant calmodulin (0.25 μ M) and recombinant calcineurin (40 units per well) were added to the complex formed between Cyp A and *Autumnalamide* or CsA. The complex was incubated for 30 min. Next; RII phosphopeptide substrate was added at a final concentration of 0.15 mM allowing the development of the reaction for 1h at room temperature. Then 100 μ L of development reagent was added and incubated for 20 min at room temperature. Finally, the A₆₂₀ of the 96-well plate samples was measured using Multi-Mode Microplate Reader Synergy™ 4 equipment from Biotek (Winooski, VT, USA).

2.8 Western Blotting

Cells were incubated first with *autumnalamide* or CsA for 2 h after which Con A (50 μ g/mL) was added for 48 h. After incubation, T cells were centrifuged and washed twice with ice-cold saline solution (Umbreit) at 1500 rpm, 5 min and 4°C. Then, the pellet was resuspended in 50 μ L of hypotonic lysis buffer solution to extract cytosolic proteins for 15 min with the following composition mM: 20 Tris-HCl, 10 NaCl and 3 MgCl₂, 10X phosphatase inhibitors and 7X protease inhibitor. Cells were pelleted at 3000 rpm, 10 min at 4°C to remove the cytosolic protein fraction. The supernatant was collected and the pellet obtained was resuspended in 30 μ L of nuclear lysis buffer composed by: 100 mM Tris, 2 mM NaVO₄, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM Na₄P₂O₇, 1% Triton-X-100, 10% Glycerol, 0,1% SDS and 0,5% Deoxycholate Sodium containing 1 mM PMSF and 10X protease inhibitor cocktail for 30 min vortexing every 10 min. Samples were then centrifuged at 14000g at 4°C for 30 min. The supernatants of interest were collected as protein nuclear fraction. The

determination of protein concentration was done using Direct Detect (Millipore) using bovine serum albumin (BSA) as standard protein. Samples of cell lysates containing 10 μ g of nuclear fraction of total protein were used for electrophoresis. Samples for electrophoresis were dissolved in a 15-20% polyacrylamide gel and blotted to PVDF membrane by reduced SDS-PAGE. To determine the protein size and also to monitor the progress of the electrophoresis run, Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope molecular weight marker was used. Then, membranes were blocked with 0,5% BSA in washing buffer (PBS + 0.1% Tween) and incubated 10 min with primary anti-NFATc1 (1:1000). After three washes with washing buffer (PBS + 0.1% Tween 20), membranes were incubated with secondary anti-Mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase. The immunoreactive bands were detected using the Supersignal West Pico or Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce) and the Diversity GeneSnap software (Syngene). NFATc1 signal was normalized using Lamin B1 (1:1000).

2.9 Statistical analysis

All experiments were carried out by duplicate a minimum of three times. Results were analyzed by using one-way analysis of variance ANOVA with Dunnett's post hoc analysis. p values <0.05 were considered statistically significant. All results were expressed as the mean \pm SEM of 3 or more experiments.

3. Results

Considering the results obtained in a previous work, autumnalnamide was able to completely inhibit SOC channels by its effect over mitochondrion (Audoin, et al., 2014). Therefore, several additional calcium (Ca^{2+}) experiments were carried out in order to clarify the effect of autumnalnamide on Ca^{2+} fluxes different from SOC. To do this, the effect of autumnalnamide on ionomycin Ca^{2+} fluxes was studied. Ionomycin is a Ca^{2+} ionophore that induces intracellular pools depletion and allows Ca^{2+} entrance from the extracellular medium (Morgan and Jacob, 1994). Thus, autumnalnamide was added in a Ca^{2+} -free medium after ionomycin pools depletion, and a significant cytosolic Ca^{2+} influx reduction was observed after ion addition (Figure 2A). In the same way, when the compound was incubated in a Ca^{2+} -free medium before ionomycin addition, no modification on intracellular stores was observed neither on ionomycin-sensitive pools depletion. Nevertheless, once Ca^{2+} ion was restored, a significant ion-influx inhibition was obtained comparing to ionomycin (Figure 2B). Moreover, autumnalnamide did not inhibit the ion entrance once the influx is activated (Figure 2C). Thus, autumnalnamide did not affect intracellular pools modulated by ionomycin; nevertheless cytosolic Ca^{2+} entrance was reduced a 30% when the incubation with autumnalnamide was done after or before ionomycin-sensitive pools depletion. Therefore, as it was reported, the compound inhibits SOC entrance.

In order to confirm if autumnalnamide inhibits other Ca^{2+} influx different from SOC, flufenamic acid (FFA) was employed. FFA is a non-steroidal drug that acts inducing Ca^{2+} release from the mitochondrion in a Ca^{2+} free medium (Jiang, et al., 2012, Damsker, et al., 2009, Zeng, et al., 2012). Thus, when FFA was incubated in the absence of Ca^{2+} , a significant Ca^{2+} release from internal stores was induced. In addition, when Ca^{2+} was added to the medium an ion influx was observed (Figure 3A). Nevertheless, when autumnalnamide was incubated before the FFA addition, the Ca^{2+} release from mitochondrion was significantly inhibited, besides after addition of Ca^{2+} the ion reached similar levels than FFA (Figure 3A). Therefore, the compound does not affect mitochondrial Ca^{2+} influx, however the release of the ion from this organelle was largely reduced. In order to know the effect of other mitochondrial uncouplers on FFA, FCCP was employed (Ma, et al., 2012). As shown in Figure 3B, FCCP produced a small increase in Ca^{2+} levels; and the following addition of FFA did not induce a Ca^{2+}

release. Thus, after the ion addition to the bath solution, a similar Ca^{2+} influx as FFA control was observed. Therefore, as in the case of autumnalnamide, the prior incubation with FCCP inhibited the Ca^{2+} release induced by FFA without affecting the next Ca^{2+} influx. Summarizing the results described above, both, FCCP and autumnalnamide were able to decrease the release of Ca^{2+} from mitochondrion induced by FFA; nevertheless the cytosolic Ca^{2+} entrance was not blocked. In addition, autumnalnamide inhibited cytosolic Ca^{2+} influx induced by the ionophore while ionomycin-sensitive intracellular pools were not modified. Therefore, autumnalnamide targeted mitochondrion without inducing Ca^{2+} release from this organelle but inhibiting SOC influx.

In order to explain the effect of autumnalnamide on Ca^{2+} handling and since in a previous work it was observed the effect of autumnalnamide inhibiting Ca^{2+} influx, which was reverted by CsA (Audoin, et al., 2014), the structures that this drug targets were studied. With this purpose, the highly sensitive biosensor Biacore X was used to determine the binding between mitochondrial Cyp D, used as ligand, attached to the sensor surface and using autumnalnamide as ligate. First, CsA was used as control of binding for the immobilized Cyp D. As Figure 4A shows, when different concentrations of CsA (5, 10, 20 and 40 μM) were added over the immobilized Cyp D, typical association curves profiles were obtained. In the presence of 5 μM CsA the signal was 10.05 RU, while in the presence of 40 μM of CsA the response reached 31.8 RU. Individual binding curves from Figure 4A were analyzed as described in the material and methods section. K_{obs} for each concentration of CsA were obtained. When K_{obs} were represented against each CsA concentration, (Figure 4B), a linear regression with a correlation coefficient of $r = 0.97985$ for Cyp D was obtained. From this representation, K_{ass} , $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, slope, K_{diss} , s^{-1} , and Y-intercept, were obtained. Within these two values, the kinetic equilibrium dissociation constant K_{D} (Y-intercept/slope) for the CsA-Cyp D association was obtained. The value of this constant was $4.5 \times 10^{-6} \pm 3.05 \times 10^{-6} \text{ M}$ for the CsA-Cyp D binding assay (Figure 4B). After setting up these conditions the binding of Cyp D and autumnalnamide was next studied. In this case, different concentrations of autumnalnamide (30, 50, 70 and 100 μM) were dissolved in HBS-EP buffer and added onto the previously immobilized Cyp D. Thus, as Figure 4C shows, association curves for the binding of autumnalnamide with Cyp D were obtained with responses ranging from 10 RU at the lowest autumnalnamide concentration to 220 RU in the presence of

100 μM of the compound. As in the case of CsA, the interaction between autumnalnamide and Cyp D follows a pseudo-first order kinetic where K_{obs} was calculated. When each K_{obs} was represented against the corresponding concentration of autumnalnamide from Figure 4C, linear regression plots with a correlation coefficient of $r=0.98$, for the binding of autumnalnamide to Cyp D were obtained. From these representations the kinetic equilibrium constant for the binding of autumnalnamide to Cyp D was calculated. In the case of the Cyp D-autumnalnamide binding, a $K_{\text{D}}=1.51\pm 1.399 \mu\text{M}$ (Figure 4D) was obtained. Due to CyPs share a common region domain and since autumnalnamide showed good binding affinity for Cyp D, the effect of this compound over Cyp A, another important immunophilin, was also evaluated. Straightaway, the same procedure was followed for Cyp A immobilization over a CM5 chip as described in Material and Methods. Thus, when different concentrations of CsA were added over the immobilized Cyp A, typical association curves were obtained. In the presence of $5\mu\text{M}$ CsA the signal was 17.54 RU, while in the presence of $40\mu\text{M}$ of CsA the response reached 55.45 RU (Figure 5A). In this case, a K_{D} for CsA-Cyp A was $6.83\times 10^{-6}\pm 1.1\times 10^{-6} \mu\text{M}$ (Figure 5B). In the same way, different concentrations of autumnalnamide were dissolved in HBS-EP buffer and added onto the immobilized Cyp A. Thus, as Figure 5C shows, association curves for the binding of autumnalnamide with Cyp A were obtained with responses ranging from 34.11RU at the lowest concentration to 102.5 RU at the highest concentration of autumnalnamide. From the association curves a K_{D} of $8.08\pm 1.23 \mu\text{M}$ was obtained (Figure 5D). So far the results obtained here indicated that autumnalnamide showed higher affinity for Cyp D than CsA and also a good affinity for Cyp A, although slightly smaller than that of CsA.

Hence, autumnalnamide showed Cyp A binding, and also acts by inhibiting SOC influx; both targets are related with the modulation of interleukins (ILs) (Sweeney, et al., 2009, Djuric, et al., 2000), we then tested the effect of autumnalnamide on IL-2 production in human T lymphocytes. In previous work the effect of autumnalnamide in SH-SY5Y cell viability was checked for 1h, and the compound produced a 42% of decrease in cell viability at the concentration of $25\mu\text{M}$ (the highest concentration tested) (Audoin, et al., 2014). In order to develop experiments with prolonged exposure times and in different cellular model, it was necessary to check cell toxicity of autumnalnamide. To do this, different concentrations ranges of autumnalnamide were tested for 24 and 48h in human

T lymphocytes. As Figure 6 shows, the concentrations tested for the two exposure times did not produced any changes on cell viability. Once again, the concentration of 10 μ M was selected to develop the current experiments at 48h.

To develop IL-2 experiments, a control of human T lymphocytes was treated with Con A alone, to induce IL-2 release, or in combination with autumnalamide. After 48h of incubation, IL-2 release in the culture medium was measured. As Figure 7 shows, the stimulation of human T lymphocytes with Con A for 48h efficiently induces IL-2 production comparing with non-stimulated control cells from $47.72 \pm 1.58 \text{ pg mL}^{-1}$ to $742,77 \pm 152.23 \text{ pg mL}^{-1}$ respectively ($p \leq 0.001$). In this conditions, when T lymphocytes were pre-incubated for 2h with 10 μ M autumnalamide, before stimulation with ConA for 48h, a reduction from $742,77 \pm 152.23 \text{ pg mL}^{-1}$ to $111.61 \pm 3.4 \text{ pg mL}^{-1}$ ($p \leq 0.01$). The well-known IL-2 inhibitor CsA was used as positive control of IL-2 inhibition. Thus, when cells were pre-incubated with CsA 0.2 μ M for 2h before Con A stimulation, IL-2 production was significantly reduced to control values $146.25 \pm 111.34 \text{ pg mL}^{-1}$ ($p \leq 0.01$). From these results we conclude that both compounds suppressed IL-2 release from human activated T lymphocytes with a similar efficacy.

In view of these results two additional experiments were performed to evaluate the mechanisms underlying the effects of autumnalamide in IL-2 blockade. Some compounds, as in the case of CsA, act docking calcineurin phosphatase activity over NFATc1 and the next IL-2 induction due to the binary complex formed with Cyp A (Randak, et al., 1990). Therefore, in view of the binding of autumnalamide to Cyp A, the ability of autumnalamide to inhibit calcineurin phosphatase activity was next compared. In this case, a compound concentration close to the calculated K_D was used. As Figure 8 shows, when Cyp A was incubated in the presence of 6 μ M CsA a significant reduction in calcineurin phosphatase activity of $28.33 \pm 3.07\%$ ($p \leq 0.01$) was observed. In the same way, in the presence of 10 μ M of autumnalamide a significant $18.87 \pm 2.21\%$ ($p \leq 0.001$) reduction was observed over calcineurin phosphatase activity.

It is known that T lymphocyte stimulation with Con A induce a cytosolic Ca^{2+} increase (Smith-Garvin, et al., 2009). As a consequence, Cyp A forms a complex with calcineurin that binds to and dephosphorylates cytosolic NFATc1. The dephosphorylation of the nuclear factor leads to the translocation to the nucleus. The increase in the nuclear expression of NFATc1 in a transcriptionally active form leads to

the increase of IL-2 production (Liu, 2009, Xiong, et al., 2013). Therefore, the nuclear expression of NFATc1 in activated human peripheral T lymphocytes in the presence of autumnalamide was next checked and compared with the effect of CsA in the same condition. Representative western blot bands for these results are shown in Figure 9A. As shown in Figure 9B, the quantification of western blot band intensities in each condition showed that when cells were stimulated with Con A for 48h nuclear band intensity of NFATc1 exhibited a $67.21 \pm 0.12\%$ ($p \leq 0.01$) increase comparing with T cells in resting conditions. Pre-incubation of the cells with CsA before activation decreased NFATc1 band intensity close to control values, in agreement with previously reported results (Ishikawa, et al., 2003). However, autumnalamide did not significantly reduce the increase in nuclear NFATc1 in activated human T lymphocytes that reach higher levels than Con A treated cells.

Altogether, the results presented here indicate that, autumnalamide does not modify ionomycin-sensitive intracellular Ca^{2+} pools, besides confirm that the compound inhibits the SOC channels. Moreover, it binds to mitochondrion Cyp D, presents binding affinity for Cyp A and inhibits calcineurin and human IL-2 production in activated T lymphocytes but, unlike CsA, it lacks of an inhibitory effect over NFATc1.

4. Discussion

The structure of the prenylated cyclic peptide named autumnalamide was recently identified and the same paper reported the only available data on the compound, indicating that autumnalamide alters mitochondrial membrane potential in neuroblastoma cells and also induces the mPTP opening (Audoin, et al., 2014). The opening of this structure can be induced by different substances that do not necessarily target the proteins that form the mPTP structure (Tornero, et al., 2002). There are many molecules from the own organism that act as inducers of mPTP, such as β -Amyloid (β A) protein, as well as molecules with natural origin like mastoparan from the venom of *Vespula lewisii*; honokiol from *Magnolia spp.* or molecules from synthetic sources like MT-21. Nevertheless, almost no molecule acts targeting directly Cyp D, both for blocking or inducing the formation of mPTP. In the case of β A protein, it induces the production of Reactive Oxygen Species (ROS), mastoparan forms channels in the mitochondria and MT-21 directly induces the release of cytochrome c from mitochondria. All these factors lead to the opening of mPTP (Watabe, et al., 2000, Ding and Nam Ong, 2003, Du and Yan, 2010, Arora, et al., 2012). Thus, with the exception of honokiol, none of these compounds induces the mPTP opening directly by binding to a specific component of the multiproteic complex, as we observed with autumnalamide in the present paper. On the other hand, Ca^{2+} experiments reveal that autumnalamide neither modify ionomycin-sensitive intracellular Ca^{2+} pools, nor the ionomycin Ca^{2+} entrance through SOC channels once the influx is activated. Nevertheless, the Ca^{2+} profiles obtained from the present study show that the FFA-induced Ca^{2+} release in SH-SY5Y is inhibited by pre-treatment with FCCP, which collapse the mitochondrial membrane potential that normally drives the Ca^{2+} into the mitochondrion (Collins, et al., 2000). The effect of autumnalamide over FFA may be achieved through either a protonophore-like effect, similar to FCCP, or the induction of the mPTP, as previously described (Audoin, et al., 2014). Thus, in the case of FCCP in SH-SY5Y cells, the uncoupling of the mitochondrial transport chain produced in mitochondria, substantially inhibits Ca^{2+} release induced by FFA probably because both FCCP and FFA act by disrupting mitochondrial membrane potential, and one drug blocks the effect of the other (Chi, et al., 2011). Moreover, CsA abolished the effect of autumnalamide efficiently in comparison with FCCP on SOC Ca^{2+} influx (Audoin, et al., 2014). In

accordance with these previous results and due to the effect observed over mPTP by autumnalnamide, the binding of the prenylated cyclic peptide from the cyanobacterium *Phormidium autumnale* was tested on Cyp D, an essential component of the mPTP. Biosensor data analysis indicates that the compound binds with good affinity to mitochondrial Cyp D. Autumnalnamide almost shows 3 times more affinity for mitochondrial Cyp D than CsA. Moreover, due to the findings observed by SPR and taking into account the results observed on mPTP besides the uncoupling effect (Audoin, et al., 2014), this effect could be related with the interaction between autumnalnamide and mitochondrial Cyp D in a more specific way than in the case of FCCP or FFA that is produced mainly by the disruption of membrane potential. Cytochromes share a common domain; therefore compounds that bind to one of this protein family usually show binding affinity for other Cytochromes as CsA display (Kumari, et al., 2013). Thus, autumnalnamide also shows, as CsA, Cyp A binding affinity. This cytosolic protein plays a central pathway of many physiological and pathological processes in the cells such as inflammation, cardiovascular diseases, immunomodulation or sepsis among others (Nigro, et al., 2013). In the case of CsA, once the complex between Cyp A- CsA is formed, calcineurin phosphatase activity is blocked and the translocation of NFAT to the nucleus is avoided, inhibiting the transcription activity over genes that encodes for IL-2 (Fruman, et al., 1992). Autumnalnamide reduces calcineurin phosphatase activity, while NFAT was not reduced after the binding to Cyp A, nevertheless, autumnalnamide, as CsA, reduces IL-2 production in T lymphocytes. While CsA exerts its effect through the docking of calcineurin (Naesens, et al., 2009), the inhibition of IL-2 produced by autumnalnamide probably occurs partially by a calcineurin-independent pathway since the nuclear entry of the NFATc1 is closely linked to its dephosphorylation and the nuclear levels of this transcription factor are not blocked after autumnalnamide treatment. Molecules that inhibit CRAC channels are also expected to reduce IL-2 production (Sweeney, et al., 2009, Djuric, et al., 2000). As FFA or BTP2, two compounds that modulate SOC channels, act by reducing the production of this IL in white blood cells, being Ca^{2+} an essential signal for its production (Kankaanranta, et al., 1996, Cardenas and Heitman, 1995). In the case of autumnalnamide, the indirect blockade produced on SOC channels, the main Ca^{2+} entrance in T cells, due to the effects that produce in mitochondrion, could explain the

effect over IL-2 inhibition, although it does not block NFAT translocation. Then, other transcription factors or mitogen-activated protein kinases (MAPK) could be related with the modulation of interleukins (ILs) by autumnalamide where the restriction of cytosolic Ca^{2+} induced by the compound may be essential (Audoin, et al., 2014, Cardenas and Heitman, 1995, Kar, et al., 2011). On the other hand, autumnalamide can be a useful tool to study molecules that targeted Cyp D, other applications could be attributed to autumnalamide due to the binding to Cyp A. This effort mainly led to the development of compounds with immunosuppressive or anti-inflammatory effects.

As a conclusion, we have a drug that has good affinity for two important immunophilins engaged in many diseases and produces an effective blockade on IL-2 production and low toxicity. Due to the multi-functional properties of Cyp A and the functions where it is involved, such as protein folding, trafficking, assembly or cell signaling, autumnalamide could open a new window to improve the treatment of many diseases where Cyp A is a key player (Nigro, et al., 2013). With respect to Cyp D, the fact that mPTP is a process regulated by a wide type of stimulus, it makes this multiproteic complex an ideal pharmacological target implicated in multiple processes, where autumnalamide directly binds to (Tornero, et al., 2002).

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the following FEDER cofounded-grants. From CDTI and Technological Funds, supported by Ministerio de Economía y Competitividad, AGL2012-40185-CO2-01, AGL2014-58210-R, and Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, GRC2013-016, and through Axencia Galega de Innovación, Spain, ITC- 20133020 SINTOX. From CDTI under ISIP Programme, Spain, IDI-20130304 APTAFOOD.

From the European Union's Seventh Framework Programme managed by REA – Research Executive Agency (FP7/2007-2013) under grant agreement 312184 PHARMASEA. We wish to thank the Clínica Losada Arránz, especially Ms. Paula López Arránz for providing the human blood samples for T cells purification. Jon Andoni Sánchez is supported by a fellowship from Plan Galego de Investigación e Crecemento, Xunta de Galicia, Spain.



Figure Legends

Figure 1. Autumnalamide chemical structure.

Figure 2. Effects of autumnalamide and ionomycin cytosolic Ca^{2+} profile in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **A.** First arrow indicates the addition of $2\mu\text{M}$ ionomycin. Second arrow shows addition of $10\mu\text{M}$ of autumnalamide. The third arrow indicates the addition of Ca^{2+} 1 mM to the bath solution **B.** Cytosolic Ca^{2+} profile in cells first pre-incubated with $10\mu\text{M}$ autumnalamide (first arrow) followed by ionomycin $2\mu\text{M}$ (second arrow). The third arrow indicates 1 mM of Ca^{2+} addition to the bath solution. **C.** The first arrow shows the ionomycin addition. The second arrow shows the Ca^{2+} addition to the medium and the third the addition of $10\mu\text{M}$ of autumnalamide. The experiments were performed in duplicate. The results of each replica are mean of 20 cells. Mean \pm SEM of three independent experiments.

Figure 3. Effect of FCCP or autumnalamide and FFA on cytosolic Ca^{2+} profile in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **A.** First arrow indicates autumnalamide addition and the second arrow the FFA addition. The third arrow indicates the addition of Ca^{2+} . **B.** The FCCP addition to the medium (first arrow) prior to FFA addition (second arrow). The third arrow indicates the addition of the ion to the Ca^{2+} -free bathed solution. The experiments were performed in duplicate. The results of each replica are mean of 20 cells. Mean \pm SEM of three independent experiments.

Figure 4. CsA/autumnalamide association curves and ligand binding analysis. **A. Cyp D-CsA association:** association curves after addition of different amounts of CsA to immobilized Cyp D. Different CsA concentrations were injected using HBS-EP as running buffer and a flow rate of $10\mu\text{g mL}^{-1}$. The association curves were obtained after subtraction of their respective solvent control. **B. Analysis of ligand binding:** kinetic plot of apparent association rate constant K_{obs} (s^{-1}) obtained from plot A (calculated by BiaEvaluation software) versus CsA concentration. **C. Cyp D-autumnalamide association:** association curves after addition of different amounts of autumnalamide to immobilized Cyp D. Different autumnalamide concentrations were injected using HBS-EP as running buffer and a flow rate of $10\mu\text{g mL}^{-1}$. The association curves were obtained after subtraction of their respective solvent control. **D. Analysis of ligand**

binding: kinetic plot of apparent association rate constant K_{obs} (s^{-1}) obtained from plot C (calculated by BiaEvaluation software) versus autumnalamide concentration. Representative experiment of $n=3$.

Figure 5. CsA/ autumnalamide association to immobilized Cyp A and ligand binding analysis. A. Cyp A-CsA association: association curves after addition of different amounts of CsA to immobilized Cyp A. Different CsA concentrations were injected using HBS-EP as running buffer and a flow rate of $10\mu g mL^{-1}$. The association curves were obtained after subtraction of their respective solvent control. **B. Analysis of ligand binding:** kinetic plot of apparent association rate constant K_{obs} (s^{-1}) obtained from plot A (calculated by BiaEvaluation software) versus CsA concentration. **C. Cyp A-autumnalamide association:** association curves after addition of different amounts of autumnalamide to immobilized Cyp A. Different autumnalamide concentrations were injected using HBS-EP as running buffer and a flow rate of $10\mu g mL^{-1}$. The association curves were obtained after subtraction of their respective solvent control. **D. Analysis of ligand binding:** kinetic plot of apparent association rate constant K_{obs} (s^{-1}) obtained from plot C (calculated by BiaEvaluation software) versus autumnalamide concentration. Representative experiment of $n=3$.

Figure 6. Effect of autumnalamide over T lymphocytes cell viability. T lymphocytes cells were incubated for 24 and 48h with autumnalamide at the concentration range from 1 nM to 10 μM . Bar columns represent the different concentrations for each times. Effect on cell viability tested by MTT test. Data are mean \pm SEM of 3 independent experiments. Data are mean \pm SEM of 3 independent experiments.

Figure 7. Effect of CsA or autumnalamide on IL-2 production in human T lymphocytes stimulated with Con A. Human T lymphocytes were pre-treated for two hours with CsA (0.2 μM) or autumnalamide (10 μM) and then with Con A (50 $\mu g mL^{-1}$) for 48h. Mean \pm SEM of three experiments. All values are shown in percentage to the Con A treated cells. ** Significant differences between autumnalamide or CsA treated cells with respect to cells treated with Con A ($p<0.01$). # Significant differences

between Con A treated cells and control ($p < 0.001$). Mean \pm SEM of 3 independent experiments.

Figure 8. Effect of autumnalamide or CsA on Ca^{2+} / calmodulin-dependent on Phosphatase Activity of Calcineurin. Phosphatase activity of calcineurin determined after pre-incubation with Cyp A or Cyp A + CsA (6 μ M)/ autumnalamide (10 μ M). All values are shown in percentage with respect to Cyp A control. **Significant differences between Cyp A control and Cyp A + CsA ($p \leq 0.01$). ***Significant differences between Cyp A control and Cyp A + autumnalamide ($p \leq 0.001$). Data are mean \pm SEM of 3 independent experiments.

Figure 9. Effect of CsA or autumnalamide over NFATc1 nuclear levels in human T lymphocytes activated with Con A. A. NFATc1 levels were studied as nuclear fraction after 48h incubation with compounds. Human T lymphocytes were pre-treated for 2 h with CsA (0.2 μ M) or autumnalamide (10 μ M) and afterward incubated with Con A (50 μ g.mL⁻¹) for 48h. A. Representative image of one experiment. B. Mean of the ratio of the nuclear NFATc1/ lamin B1 band intensity. All results are presented as the percentage of NFATc1 in the nucleus. ##Significant differences with respect to control cells ($p \leq 0.01$). **Significant differences with respect to Con A treated cells ($p < 0.01$). Data are mean \pm SEM of three experiments.

Figure 3

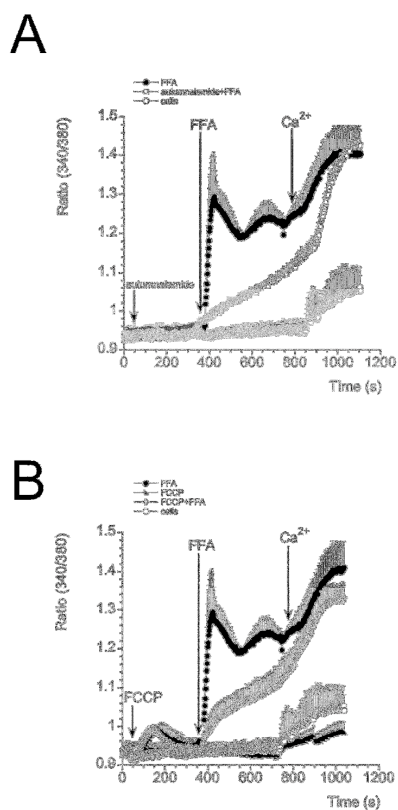


Figure 4

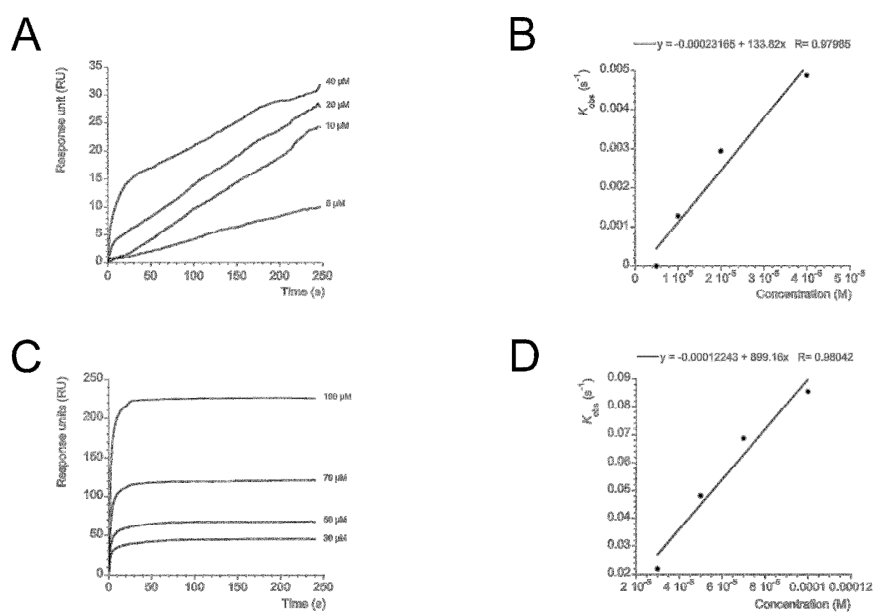


Figure 5

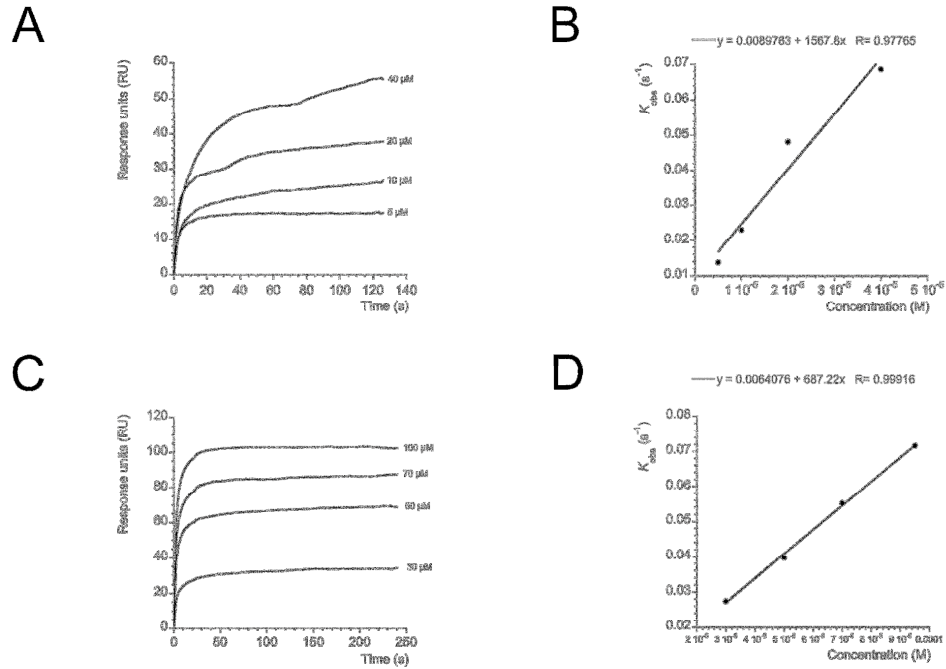


Figure 6

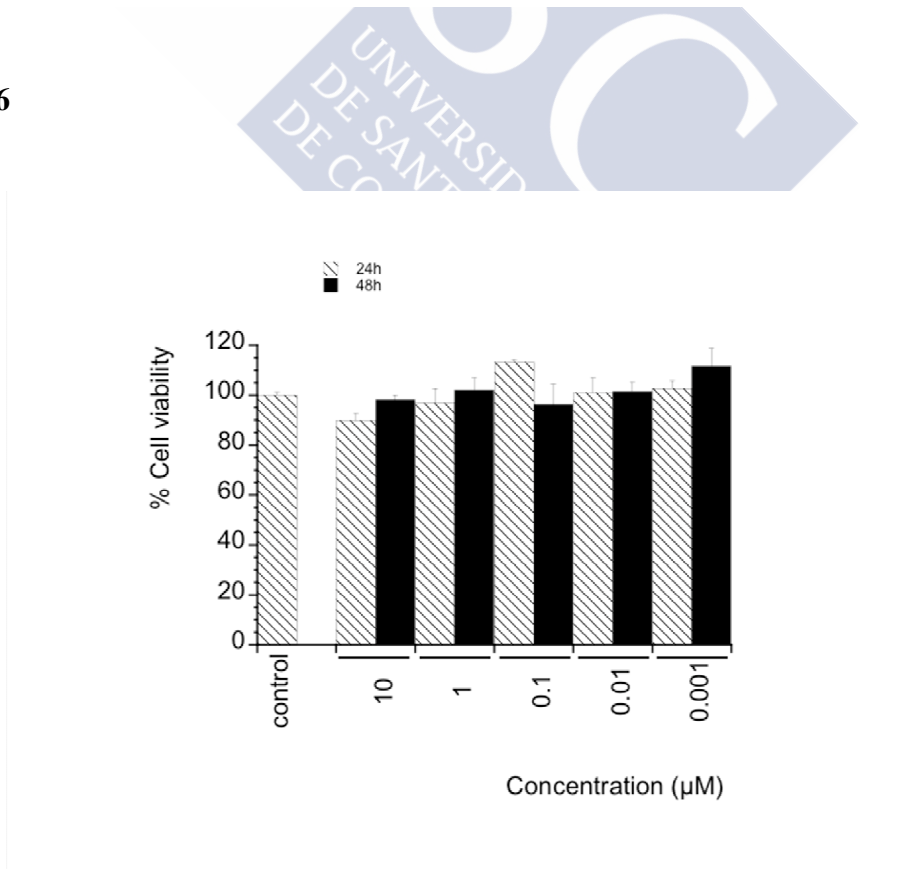


Figure 7

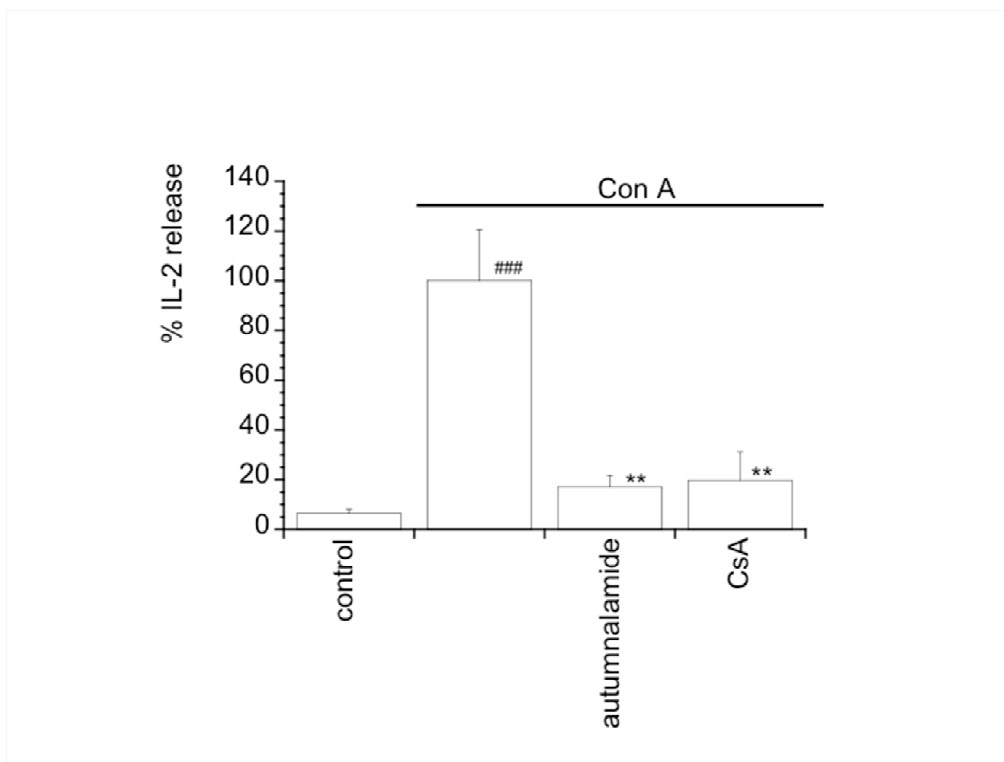


Figure 8

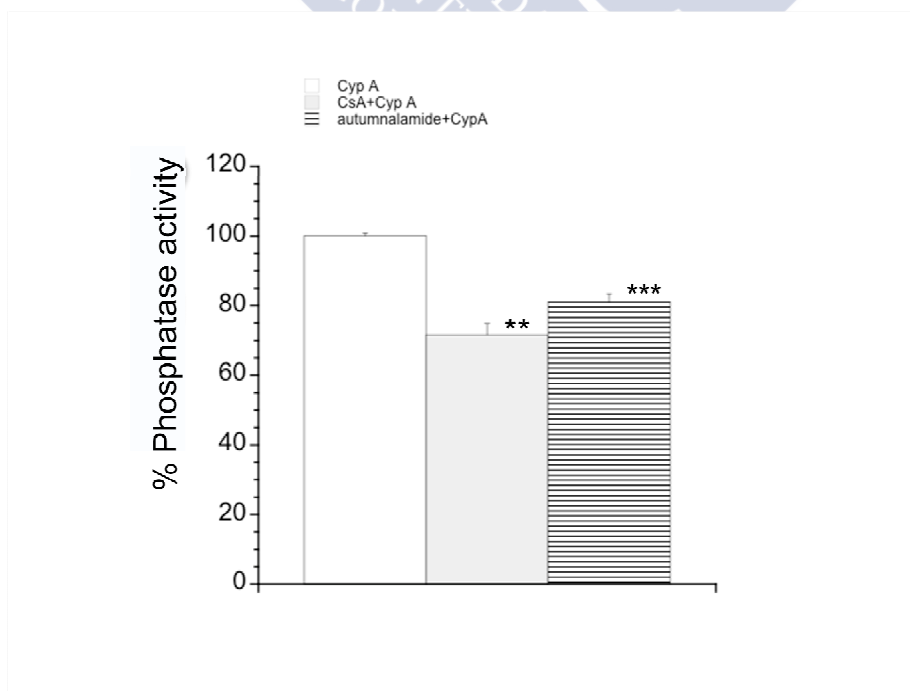
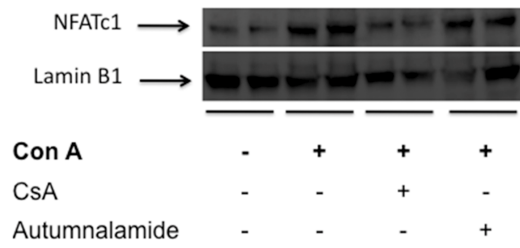
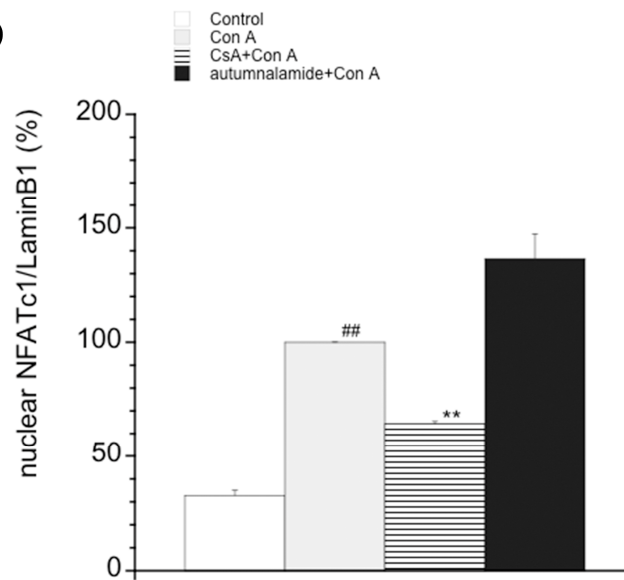


Figure 9

A



B



References

- Markou, G., Georgakakis, D. 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy* 88, 3389.
- Coates, R.C.T., E.; Gerwick, W. H. 2013. *Bioactive and Novel Chemicals from Microalgae.*, Oxford, UK.
- Audoin, C., Sanchez, J.A., Genta-Jouve, G., Alfonso, A., Rios, L., Vale, C., Thomas, O.P., Botana, L.M. 2014. Autumnalamide, a prenylated cyclic peptide from the cyanobacterium *Phormidium autumnale*, acts on SH-SY5Y cells at the mitochondrial level. *J Nat Prod* 77, 2196.
- Komárková, J.K.a.J. 2003. *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification.*
- Elrod, J.W., Molkenin, J.D. 2013. Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore. *Circ J* 77, 1111.
- Javadov, S., Kuznetsov, A. 2013. Mitochondrial permeability transition and cell death: the role of cyclophilin d. *Front Physiol* 4, 76.
- Hoppert, M., Gentsch, C., Schorgendorfer, K. 2001. Structure and localization of cyclosporin synthetase, the key enzyme of cyclosporin biosynthesis in *Tolypocladium inflatum*. *Arch Microbiol* 176, 285.
- Wang, P., Heitman, J. 2005. The cyclophilins. *Genome Biol* 6, 226.
- Fruman, D.A., Burakoff, S.J., Bierer, B.E. 1994. Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J* 8, 391.
- Lee, J., Kim, S.S. 2010. An overview of cyclophilins in human cancers. *J Int Med Res* 38, 1561.
- Kofron, J.L., Kuzmic, P., Kishore, V., Colon-Bonilla, E., Rich, D.H. 1991. Determination of kinetic constants for peptidyl prolyl cis-trans isomerases by an improved spectrophotometric assay. *Biochemistry* 30, 6127.
- Davis, T.L., Walker, J.R., Campagna-Slater, V., Finerty, P.J., Paramanathan, R., Bernstein, G., MacKenzie, F., Tempel, W., Ouyang, H., Lee, W.H., Eisenmesser, E.Z., Dhe-Paganon, S. 2010. Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases. *PLoS Biol* 8, e1000439.
- Kumari, S., Roy, S., Singh, P., Singla-Pareek, S.L., Pareek, A. 2013. Cyclophilins: Proteins in search of function. *Plant Signal Behav* 8.
- Alfonso, A., Botana, M.A., Vieytes, M.R., Botana, L.M. 2001. Prolactin induces calcium influx and release from intracellular pools in human T lymphocytes by activation of tyrosine kinases. *Cell Signal* 13, 819.
- Sanchez, J.A., Alfonso, A., Leiros, M., Alonso, E., Rateb, M.E., Jaspars, M., Housen, W.E., Ebel, R., Botana, L.M. 2015. *Spongionella* Secondary Metabolites Regulate Store Operated Calcium Entry Modulating Mitochondrial Functioning in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Cell Physiol Biochem* 37, 779.
- Alfonso, A., Pazos, M.J., Fernandez-Araujo, A., Tobio, A., Alfonso, C., Vieytes, M.R., Botana, L.M. 2014. Surface plasmon resonance biosensor method for palytoxin detection based on Na⁺,K⁺-ATPase affinity. *Toxins (Basel)* 6, 96.
- Morgan, A.J., Jacob, R. 1994. Ionomycin enhances Ca²⁺ influx by stimulating store-regulated cation entry and not by a direct action at the plasma membrane. *Biochem J* 300 (Pt 3), 665.

Jiang, H., Zeng, B., Chen, G.L., Bot, D., Eastmond, S., Elsenussi, S.E., Atkin, S.L., Boa, A.N., Xu, S.Z. 2012. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and new fenamate analogues on TRPC4 and TRPC5 channels. *Biochem Pharmacol* 83, 923.

Damsker, J.M., Okwumabua, I., Pushkarsky, T., Arora, K., Bukrinsky, M.I., Constant, S.L. 2009. Targeting the chemotactic function of CD147 reduces collagen-induced arthritis. *Immunology* 126, 55.

Zeng, B., Chen, G.L., Xu, S.Z. 2012. Store-independent pathways for cytosolic STIM1 clustering in the regulation of store-operated Ca(2+) influx. *Biochem Pharmacol* 84, 1024.

Ma, T., Gong, K., Yan, Y., Song, B., Zhang, X., Gong, Y. 2012. Mitochondrial modulation of store-operated Ca(2+) entry in model cells of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 426, 196.

Sweeney, Z.K., Minatti, A., Button, D.C., Patrick, S. 2009. Small-molecule inhibitors of store-operated calcium entry. *ChemMedChem* 4, 706.

Djuric, S.W., BaMaung, N.Y., Basha, A., Liu, H., Luly, J.R., Madar, D.J., Sciotti, R.J., Tu, N.P., Wagenaar, F.L., Wiedeman, P.E., Zhou, X., Ballaron, S., Bauch, J., Chen, Y.W., Chiou, X.G., Fey, T., Gauvin, D., Gubbins, E., Hsieh, G.C., Marsh, K.C., Mollison, K.W., Pong, M., Shaughnessy, T.K., Sheets, M.P., Smith, M., Trevillyan, J.M., Warrior, U., Wegner, C.D., Carter, G.W. 2000. 3,5-Bis(trifluoromethyl)pyrazoles: a novel class of NFAT transcription factor regulator. *J Med Chem* 43, 2975.

Randak, C., Brabletz, T., Hergenrother, M., Sobotta, I., Serfling, E. 1990. Cyclosporin A suppresses the expression of the interleukin 2 gene by inhibiting the binding of lymphocyte-specific factors to the IL-2 enhancer. *EMBO J* 9, 2529.

Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., Jordan, M.S. 2009. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 27, 591.

Liu, J.O. 2009. Calmodulin-dependent phosphatase, kinases, and transcriptional corepressors involved in T-cell activation. *Immunol Rev* 228, 184.

Xiong, Y., Zhang, S., Xu, L., Song, B., Huang, G., Lu, J., Guan, S. 2013. Suppression of T-cell activation in vitro and in vivo by cordycepin from *Cordyceps militaris*. *J Surg Res* 185, 912.

Ishikawa, J., Ohga, K., Yoshino, T., Takezawa, R., Ichikawa, A., Kubota, H., Yamada, T. 2003. A pyrazole derivative, YM-58483, potently inhibits store-operated sustained Ca²⁺ influx and IL-2 production in T lymphocytes. *J Immunol* 170, 4441.

Tornero, D., Cena, V., Gonzalez- Garcia, C., Jordan, J. 2002. [The role of the mitochondrial permeability transition pore in neurodegenerative processes]. *Rev Neurol* 35, 354.

Watabe, M., Machida, K., Osada, H. 2000. MT-21 is a synthetic apoptosis inducer that directly induces cytochrome c release from mitochondria. *Cancer Res* 60, 5214.

Ding, W.X., Nam Ong, C. 2003. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. *FEMS Microbiol Lett* 220, 1.

Du, H., Yan, S.S. 2010. Mitochondrial permeability transition pore in Alzheimer's disease: cyclophilin D and amyloid beta. *Biochim Biophys Acta* 1802, 198.

Arora, S., Singh, S., Piazza, G.A., Contreras, C.M., Panyam, J., Singh, A.P. 2012. Honokiol: a novel natural agent for cancer prevention and therapy. *Curr Mol Med* 12, 1244.

Collins, T.J., Lipp, P., Berridge, M.J., Li, W., Bootman, M.D. 2000. Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release is inhibited by mitochondrial depolarization. *Biochem J* 347, 593.

- Chi, Y., Li, K., Yan, Q., Koizumi, S., Shi, L., Takahashi, S., Zhu, Y., Matsue, H., Takeda, M., Kitamura, M., Yao, J. 2011. Nonsteroidal anti-inflammatory drug flufenamic acid is a potent activator of AMP-activated protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 339, 257.
- Nigro, P., Pompilio, G., Capogrossi, M.C. 2013. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell Death Dis* 4, e888.
- Fruman, D.A., Klee, C.B., Bierer, B.E., Burakoff, S.J. 1992. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3686.
- Naesens, M., Kuypers, D.R., Sarwal, M. 2009. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 4, 481.
- Kankaanranta, H., Luomala, M., Kosonen, O., Moilanen, E. 1996. Inhibition by fenamates of calcium influx and proliferation of human lymphocytes. *Br J Pharmacol* 119, 487.
- Cardenas, M.E., Heitman, J. 1995. Role of calcium in T-lymphocyte activation. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 30, 281.
- Kar, P., Nelson, C., Parekh, A.B. 2011. Selective activation of the transcription factor NFAT1 by calcium microdomains near Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels. *J Biol Chem* 286, 14795.



III. *Spongionella* Secondary Metabolites Regulate Store Operated Calcium Entry Modulating Mitochondrial Functioning in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells

Resumen

Antecedentes/Objetivos: Se estudió el efecto de cuatro metabolitos secundarios aislados de la esponja *Spongionella*, gracilina H, A, L y tetrahidroaplisulfurina-1 en los flujos de ion calcio (Ca^{2+}) en las células de neuroblastoma SH-SY5Y. **Métodos y resultados:** Estos compuestos no modificaron los niveles citosólicos basales de Ca^{2+} . Sin embargo, cuando la entrada de Ca^{2+} fue estimulada a través de los canales de calcio dependientes de reservorio (canales SOC) con Tapsigargina (Tg), se observó una fuerte inhibición en presencia de la gracilina A, la gracilina L y la tetrahidroaplisulfurina-1. Dado que estos compuestos fueron capaces de proteger a las mitocondrias del estrés oxidativo, se estudió el papel de esta organela en la inhibición de la entrada de Ca^{2+} . Para ello, se usó el carbonilo cianida 4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) y la ciclosporina A (CsA). Sorprendentemente, tanto el efecto inhibitorio sobre los reservorios sensibles a Tg como la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC producido por el FCCP, fue abolido con diferentes potencias por los compuestos de *Spongionella* de una manera similar a la CsA. La CsA es capaz de evitar la apertura del Poro de Permeabilidad Transitoria (mPTP). Al igual que la CsA, los compuestos de *Spongionella* revirtieron la apertura del mPTP inducida por el FCCP. En el caso de la CsA el bloqueo del mPTP es debido a la unión directa a la ciclofilina D (Cyp D), una proteína de la matriz mitocondrial. Esta unión también se observó entre la gracilina L y la tetrahidroaplisulfurina y la Cyp D. Además, los compuestos de *Spongionella* modulan la función mitocondrial previniendo la apertura del mPTP al unirse a la Cyp D. **Conclusiones:** Estos efectos hacen de los compuestos de *Spongionella* una nueva familia de compuestos con actividades prometedoras en enfermedades humanas relacionadas con alteraciones mitocondriales.

***Spongionella* Secondary Metabolites Regulate Store Operated Calcium Entry Modulating Mitochondrial Functioning in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells**

Jon Andoni Sánchez^a, Amparo Alfonso^a, Marta Leirós^a, Eva Alonso^a, Mostafa E. Rateb^{b,c}, Marcel Jaspars^b, Wael E. Houssen^{b,d}, Rainer Ebel^b, Luís M. Botana^a

^aDepartamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain.

^bMarine Biodiscovery Centre, Department of Chemistry, University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland, UK.

^cPharmacognosy Department, Faculty of Pharmacy, Beni-Suef University, Beni-Suef, Egypt; ^dInstitute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, Scotland, UK.

Key Words

Calcium • SOC Channels • Mitochondria • Cyclophilin D • Cyclosporine A • *Spongionella* sp.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26356268>

IV. Identification of *Spongionella* compounds as cyclosporine A mimics

Resumen

Las esponjas marinas son una fuente muy amplia de compuestos bioactivos con diferentes efectos tales como antiinflamatorios o anticancerígenos entre otros. La ciclofilina A (Cyp A) es una proteína implicada en el mecanismo de acción de compuestos inmunosupresores tales como la ciclosporina A (CsA). En la presente publicación estudiamos la unión entre 4 compuestos de *Spongionella* (Gracilina H, A, L y Tetrahidroaplisulfurina-1) y la Cyp A inmovilizada sobre la superficie de un chip CM5. Así, encontramos que los compuestos de *Spongionella* mostraron tener unas afinidades de unión similares a la de la CsA con una constante de disociación en el equilibrio en el rango nanomolar. El efecto de los compuestos aislados de *Spongionella* fue probado sobre la actividad fosfatasa de la calcineurina. Al igual que la CsA, la Gracilina H, A y la Tetrahidroaplisulfurina-1 fueron capaces de inhibir la actividad fosfatasa una vez que el complejo entre la Cyp A-CsA/compuestos *Spongionella* se había formado. La capacidad para evitar la defosforilación del NFATc1 se testó en células T humanas aisladas de sangre periférica. En primer lugar, las células se preincubaron con los compuestos de *Spongionella* o la CsA seguido de la estimulación con concanavalina A (Con A). En estas condiciones, los niveles nucleares de NFATc1 disminuyeron tanto por el tratamiento con CsA como por la Gracilina A, L y la Tetrahidroaplisulfurina-1. Además, como ocurre con la CsA, debido a la inhibición del NFATc1, la liberación de interleucina 2 (IL-2) al medio de cultivo se redujo significativamente con todos los compuestos de *Spongionella*. Con estos resultados se concluye que los compuestos derivados de *Spongionella* evitan la activación de los linfocitos modulando la misma ruta que la CsA. Así, este mecanismo de acción sugiere que estos compuestos podrían ser interesantes candidatos en el desarrollo de fármacos inmunosupresores o antiinflamatorios.

Identification of *Spongionella* compounds as cyclosporine A mimics

Jon Andoni Sánchez^a, Amparo Alfonso^a, Marta Leirós^a, Eva Alonso^a, Mostafa E. Rateb^{bc}, Marcel Jaspars^b, Wael E. Houssen^{bd}, Rainer Ebel^b, J. Tabudravu^b, Luís M. Botana^{a*}

^a Departamento de Farmacología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela, Lugo 27002, Spain: E-Mails: jonandoni.sanchez@rai.usc.es (J.A.S.); amparo.alfonso@usc.es (A.A.); Marta.leiros@usc.es (M.L.); Eva.alonso@usc.es (E.A.)

^b Marine Biodiscovery Centre, Department of Chemistry, University of Aberdeen, Meston Walk, Aberdeen AB24 3UE, Scotland, UK E-Mails : mostafa19772002@yahoo.com (M.E.R); w.houssen@abdn.ac.uk (W.E.H.); e.ebel@abdn.ac.uk (R.E); m.jaspars@abdn.ac.uk (M.J.); j.tabudravu@abdn.ac.uk (J.T.)

^c Pharmacognosy Department, Faculty of Pharmacy, Beni-Suef University, Beni-Suef 32514, Egypt

^d Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Ashgrove Road West, Aberdeen AB25 2ZD, Scotland, UK

- Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: Luis.Botana@usc.es; Tel./Fax: +34-982-822-233

Keywords: calcineurin; NFATc1; T lymphocyte; *Spongionella*; Cyclophilin A; IL-2.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27041481>

V. *Spongionella* secondary metabolites as promising modulators of immune response

Resumen

La modulación farmacológica del sistema inmune puede tener múltiples aplicaciones para el tratamiento del cáncer y un amplio número de procesos relacionados con la inflamación. El phylum Porifera, en el cual se encuentra incluido *Spongionella*, es el mayor productor de compuestos bioactivos de origen marino. La implicación de la ciclofilina A (Cyp A) como un potente agente quimiotáctico fue descrita en varios estudios. La unión de cuatro metabolitos secundarios de *Spongionella* (Gracilina H, A, L y Tetrahidroaplisulfurina-1) a la Cyp A ha sido descrita recientemente. En este artículo estudiamos el efecto de estos compuestos sobre la expresión del receptor de membrana CD147, receptor extracelular de la Cyp A, en linfocitos T activados con Con A. De manera similar a la ciclosporina A (CsA), un conocido fármaco inmunosupresor, la Gracilina H, A y L fueron capaces de reducir la expresión del CD147 en la membrana plasmática. Previamente, estos metabolitos secundarios se describieron como activadores de los mecanismos de defensa intracelulares frente a las especies reactivas de oxígeno. También se testó el efecto de los compuestos sobre la Cyp A liberada al medio en linfocitos T activados con Con A. Observamos que a excepción de la Tetrahidroaplisulfurina-1, todos los compuestos bloquearon la liberación de la proteína al medio. Además, se hizo un ensayo de migración de células T. En este ensayo la Gracilina A y la Gracilina L fueron capaces de inhibir la migración de las células previamente activadas usando la Cyp A como agente quimiotáctico. Estos resultados positivos nos llevaron a testar la Gracilina H y la L en un ensayo *in vivo* en un modelo de animal de inducción de reacción de hipersensibilidad retardada. Así, ambas Gracilinas redujeron eficientemente la inflamación de la oreja al igual que el infiltrado de células inflamatorias. Estos resultados aportan más evidencias del potencial terapéutico de los compuestos de *Spongionella* en enfermedades relacionadas con el sistema inmune.

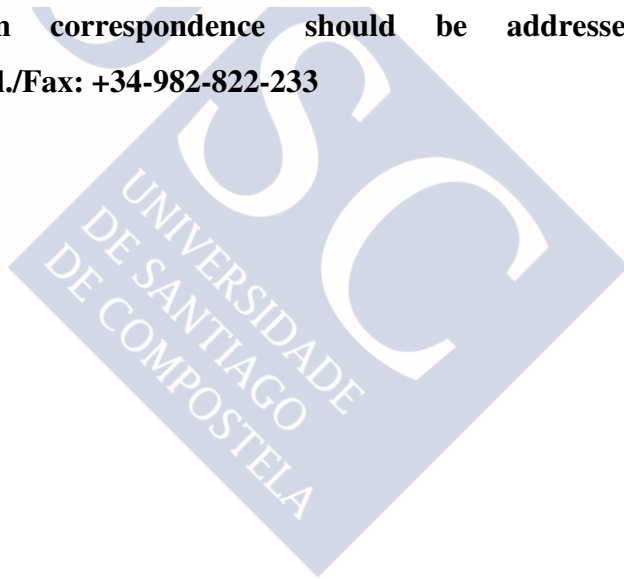
Spongionella secondary metabolites as promising modulators of immune response

Jon Andoni Sánchez^a, Amparo Alfonso^a, Ines Rodriguez^a, Eva Alonso^a, José Manuel Cifuentes^b, Roberto Bermudez^b, Luís M. Botana^{a*}

^a Departamento de Farmacología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela, Lugo 27002, Spain: E-Mails: jonandoni.sanchez@rai.usc.es (J.A.S.); amparo.alfonso@usc.es (A.A.); Ines.rodriguez@rai.usc.es (I.R.); Eva.alonso@usc.es (E.A.)

^b Departamento de Anatomía, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo 27002, Spain: E-Mails: m.cifuentes@usc.es (J.M.C.); roberto.bermudez@usc.es (R.B)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: Luis.Botana@usc.es; Tel./Fax: +34-982-822-233



Abstract

The modulation of the immune system can have multiple applications such as cancer treatment, and a wide type of processes involving inflammation. The Porifera phylum, in which *Spongionella* is encompassed, is the main producer of marine bioactive compounds. The implication of cyclophilin A (Cyp A) as a potent chemotactic agent was described by many researches. Moreover, four *Spongionella* secondary metabolites (Gracilin H, A, L and Tetrahydroaplysulphurin-1) were described to hit Cyp A. In the present paper we studied the effect of these four compounds in concanavalin (Con A)-activated T lymphocytes over the surface membrane receptor CD147 expression, the extracellular receptor of Cyp A. Similarly to a well known immunosuppressive agent cyclosporine A (CsA), Gracilin H, A and L were able to reduce the CD147 membrane expression. In previous papers, these secondary metabolites were described to activate intracellular cell defence mechanisms against reactive oxygen species. Here, the effect of compounds over Cyp A released to the medium was also tested in Con A-activated T cells. We observed that with the exception of Tetrahydroaplysulphurin-1, all the compounds blocked the release of the protein to the medium. Besides, T cell migration assay was carried out. In this assay Gracilin A and Gracilin L were able to inhibit the migration of the cells previously activated using Cyp A as chemotactic agent. These positive results lead us to test Gracilin H and L in *in vivo* mouse ear delayed hypersensitive reaction. Thus, both Gracilins efficiently reduce the ear swelling as well as the inflammatory cell infiltration. These results provide more evidence for their potential therapeutic application in immune related diseases of *Spongionella* compounds.

Keywords: *Spongionella sp.*, CD147, cyclophilin A, PPIase activity, inflammation.

1. Introduction

Cyclophilins (CyPs) are proteins ubiquitously distributed intracellularly in all prokaryotic and eukaryotic cells. The story of cyclophilin (Cyp) inhibitors began in 1970 when cyclosporine A (CsA) was isolated from the fungus *Tolypocladium inflatum* and its inhibitory effect over T-cell reactivity was found. Nevertheless, it was not until 1984 when the first Cyp, specifically cyclophilin A (Cyp A), was purified from bovine thymocytes and it was confirmed as the primary intracellular receptor of the immunosuppressive drug CsA (1). This protein family has been shown to possess peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase (PPIase) activity and plays an important role intracellularly in protein folding and trafficking (2). Although it was initially believed that cyclophilins (CyPs) exist only as intracellular proteins, actually it is known that some members of this family can be secreted to the extracellular media where they play different functions as mediators of intra and intercellular communication. The first Cyp discovered in extracellular fluids was Cyclophilin B, specifically in milk and plasma (3). Shortly after, it was discovered that Cyp A is secreted to extracellular media in response to inflammatory stimuli (4).

Leukocyte trafficking and recruitment is a critical component in host immune surveillance and inflammation-mediated pathology. The main regulators of leukocyte trafficking are chemokines, a family of chemoattracting cytokines that control cell migration and adhesion (5). However, other factors like extracellular Cyp A have been described by different reports as a potent chemotactic response inducers in human monocytes, neutrophils, eosinophils and in T cells in *in vitro* and *in vivo* assays (6). Secreted Cyp A can initiate signalling response in target cells. The binding protein receptor that transduces the signal into target cells is the CD147 receptor also called extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) or Basigin (7). Moreover, Cyp A is not only the ligand for CD147 receptor but also is the responsible for the CD147 transport to the membrane surface (8).

Although CD147 receptor is expressed in leukocytes and its implication has been investigated in deep in inflammatory response, it is ubiquitously expressed in almost all studied cell types such as haematopoietic, epithelial, endothelial or tumour cells in different levels. In the case of tumour cells, CD147 has multiple functions related with metastasis or angiogenesis while in normal cells it is related with a wide range of

processes as immune/inflammatory response (9). In an inflammatory process, the expression of CD147 is up regulated (10-12). The expression of this receptor can also be induced *in vitro* whether T cell is activated through its TCR by mitogens such as lectins (13).

The main effect of CsA is the blockade of calcineurin by forming a complex with Cyp A. As in the case of *Spongionella* compounds, CsA binds to Cyp A and regulates a transcriptional factor that regulates the production of interleukin 2 (IL-2) (14). Besides, the effect related to Cyp A, the antioxidant effect previously observed, as well as the effect over mitogen activated protein kinases (MAPK) (15, 16). Thus, in this paper we study how four *Spongionella* isolated compounds modulates other functions of Cyp A in the cell different from the effect described over calcineurin.

2. Material and Methods

2.1 Chemicals

Human Cyclophilin A Elisa kit was purchase from Novateinbio (Woburn, USA); FITC Anti-Human CD147 was from Immunostep (Salamanca, Spain). QCMTM Chemotaxis 5µm 96-Well Cell Migration Assays was from Millipore (Germany). Percoll was obtained from Pharmacia (Uppsala, Sweden). Plastic tissue-culture dishes were from Falcon (Madrid, Spain). RPMI and Foetal calf serum (FBS) were bought from Gibco (Glasgow, UK). Methanol (HPLC grade) was supplied by Merk (Barcelona, Spain). The Pan T cell Isolation Kit (human) and the monoclonal antibody to human CD3, clone BW264/56, FITC were purchased from Miltenyi Biotec (Germany). Human IL-2 ELISA kit was obtained from Invitrogen. Active human Cyp A full-length protein was from Abcam. Paraformaldehyde (PFA) was from Aname (Madrid, Spain). CsA (purity ≥ 98.5%), 1-Fluoro-2, 4-dinitrobenzene (DNFB), poly-L-lisine and the rest of chemicals and reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). The composition of saline solution (PBS) used for human T lymphocytes purification was (mM): 137 ClNa, 8.2 Na₂HPO₄, 1.5 KH₂PO₄, 3.2 KCl and 2 EDTA. The composition of Umbreit saline solution was (mM): NaCl 119, Mg (SO₄) 1.2, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 22.85, KCl 5.94, CaCl₂ 1. Glucose 1g/L was added to the medium. The pH was equilibrated between 7.2-7.3. Stock solutions of drugs were done in dimethylsulphoxide (DMSO).

Acetonitrile and methanol were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). All solvents employed in this work were HPLC or analytical grade and the water was distilled and passed through a water purification system (Milli-Q, Millipore, Spain). Formic acid was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ammonium acetate was from Fluka (Sigma-Aldrich, Spain).

2.2 Chemotaxis assays

The chemotaxis assays were conducted using purified human T lymphocytes. The chemotactic activity was assessed using QCMTM Chemotaxis 5 μ m 96-Well Cell Migration Assays (Millipore) composed by two compartments separated by a 5 μ m membrane. Treated cells were located on the top of the insert membrane in RPMI-1640 culture medium in the absence of FBS for 24h at 37°C and 5%CO₂. During this time, cells can migrate to the feed chamber, located under the insert membrane, where the medium contains the chemotractant human recombinant Cyp A (50 ng/mL). After 24h, the migratory cells were collected from the 150 μ L that contains the feed chamber plus migratory cells on the bottom of the insert membrane (cells that cross the membrane but stay adhered to the bottom part) that are dissociated from the membrane when incubated for 30 min at 37°C with 150 μ L of Cell Detachment Buffer. A volume of 75 μ L of dissociated cells plus 75 μ L of cells from the migration feeder are mixed. These cells are subsequently incubated for 15 min at room temperature with Lysed buffer that contains the CyQuant GR dye. After this time, the fluorescence of lysed T cells was determined in a microplate reader at 480 nm excitation and 520 nm emission in a spectrophotometer plate reader.

2.3 Human T lymphocytes isolation

Peripheral lymphocytes were isolated from human fresh heparinised blood from healthy volunteers as previously described (17). The blood was diluted in the same proportion with PBS plus EDTA 2 mM previously equilibrated at room temperature. 4 mL of diluted blood were placed over 3 mL of isotonic percoll (57,5%) carefully avoiding the mixture of this two phases. Once the tubes were prepared they were centrifuged at 3000 rpm, 25 min at room temperature. After centrifugation, different phases were obtained and only the fraction that contained the population of lymphocytes was collected and

washed three times with PBS-EDTA to removed percoll at 1500 rpm, 10 min, room temperature. Lymphocyte purity was always higher than 80%. T lymphocytes were purified from this population with a Pan T cell Isolation Kit. This is an indirect magnetic labelling system for the isolation of untouched T cells. T cell purity was always higher than 95%. Assessment of cell purity was performed by flow cytometry by using a monoclonal antibody to human CD3 labelled with FITC. Viability (>95%) was determined by trypan blue exclusion. Pure T cells were maintained in RPMI 1640 plus 10% FBS and plated in 24 plastic tissue-culture dishes in humidified 5% CO₂ and 95% air atmosphere at 37°C.

2.4 CD147 receptor expression in T lymphocytes

For CD147 measurements T cells were previously treated with *Spongionella* compounds or CsA 2h before Con A (50 µg/ mL) stimulation for 48h. After this, cells were centrifuged at 2000 rpm, 5 min and 4°C to remove RPMI 1640 culture medium. Next, cells were washed twice with PBS-BSA 2% (2000 rpm, 5min, 4°C) and a final concentration of 1.10⁶ cells in 50 µL were incubated with 20 µL of FITC Anti-Human CD147 for 90 min in darkness and at 4°C in a automatic shaker. After this time, T cells were washed twice with PBS to remove the dye (2000 rpm, 5min, 4°C) and resuspended in a final volume of 60 µL of PBS with 1% paraformaldehyde and keep on ice until use. Cells were attached onto 22 mm glass coverslips treated with poly-L-lysine for ten minutes. FITC excitation and emission are 494/ 520 nm, respectively. Lasers used for excitation and emission were 476 and 510 with the confocal laser-scanning microscope Nikon D-Eclipse C1. The images were collected using the 40X immersion objective (Nikon).

2.5 Cyclophilin A release measurements

For Cyp A measurements, 2.10⁶ cells in a volume of 200 µL were seeded in a 96 well plate. Human T cells were pre-treated with *Spongionella* compounds for 2h. Then, cells were stimulated with Con A at 50 µg.mL⁻¹ for 48h to induce Cyp A release to the culture medium. After the incubation time, cells were centrifuged and the cell culture was collected and assayed immediately by using Human Cyclophilin A Elisa kit. The

amount of Cyp A present in the culture medium was measured in a spectrophotometer at the wavelength of 450 nm.

2.6 Pharmacokinetic assays

The colonies were bred in Universidad de Santiago de Compostela animal care facilities. All animal protocols were carried out following the principles approved by the Institutional Animal Care Committee of the Universidad de Santiago de Compostela. For the experiments, 3 animals per group were used. Mice were kept in the facilities of the animal care centre of Universidad de Santiago de Compostela (Spain). The animals were fed ad-libitum and maintained under controlled conditions with a temperature of 24 °C, humidity 40-80%, and 12h light and dark cycle. All procedures were in strict accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All specimens were about 12 weeks old and weighed 20-25g.

Mice were intraperitoneally (IP) injected with CsA or *Spongionella* compounds at 0.4 mg . Kg⁻¹ and were housed in a metabolic cage where the urine and faeces were collected after 10 min, 1h and 24h. Then, animals were sacrificed and blood samples and brain was collected.

2.7 Sample extraction

Whole blood samples Swiss mice were collected on tubes, stored at -80 °C until analysis and thawed to room temperature before use. Tissue samples (brain) were weighed and homogenized in 1 mL of phosphate buffered saline 10 mM (PBS) using a manual homogenizer and centrifuged at 10000 x g for 10min. The supernatant was separated from the pellet and stores frozen at -80 °C until analysis and thawed to room temperature before use. In the case of faeces 1 mL of PBS was added to the samples and were mixed for 2 min to homogenate it with the PBS. After these, faeces were centrifuged at 10 000 x g and the supernatant was store at -80°C. In the case of urine, per 100µL of sample, 20 µL of methanol was added and also were stored at -80°C. Afterward, all samples were processed with the same method. To 100 µL of mixture were added 40 µL of methanol and vortex-mixed for 30 s. Then, 10 µL of 10% trichloroacetic acid aqueous solution were added and vortex-mixed for 30 s. Later, 50 µL of acetonitrile were added to the mixture and vortex-mixed 1 min. Samples were

centrifuged at 14500 x g for 15 min and the supernatant was filtered with 0.22 μm filter and injected 5 μL in the LC column.

The recuperation rate of the method was calculated with a 83% recovery of CsA and 84% recovery of Gracilin H and L except for blood with a 60% recovery.

2.8 LC-MS/MS analysis

For the analysis, a 1290 Infinity ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) system coupled to a 6460 Triple Quadrupole mass spectrometer (both Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was used. Chromatographic separation was performed at 50°C, the injection volume was 5 μl and flow rate of 0.4 mL/min using a column AQUITY UPLC BEH C18 (2.1x100mm, 1.7 μm , Waters, Spain). The nitrogen generator is a Nitrocraft NCLC/MS from Air Liquid (Spain). The mobile phase A was water with 0.1% formic acid and 2 mM ammonium acetate and the mobile phase B was methanol. Chromatographic separation was performed by gradient elution starting with 80% B for 1.2 min, then increasing to 95%B for 4 min., this condition was hold for 5 min and reducing afterward to 80% B over 0.2min. This proportion was maintained 1.8 min. until the next injection to equilibrate the system. Source conditions were optimized to achieve the best sensitivity for CsA. A drying gas temperature of 250 °C and a flow gas of 5 L/min, sheath gas temperature of 250 °C, a sheath gas flow of 11 L/min, nebulizer gas pressure of 30 psi were used. The capillary voltage was set to 4500 V with a nozzle voltage of 500 V. The fragmentor was 165 for m/z 1219.87 and 140 m/z 601.93 and the cell accelerator voltage was 4 V. The collision energy, optimized using MassHunter Optimizer software, was 12 V for m/z 1219.87 and 32 and 60 V for m/z 601.93. Analysis was carried out using electrospray ionisation (ESI) and multiple reaction monitoring (MRM) in positive mode (Table I). Three product ions were analyzed, one for quantification and another for confirmation. The transitions employed were m/z 1219.87 > 1202.8, m/z 601.93 > 156.1/100.1. For CsA standard, a eight-points calibration curve among the range 3.91-500 ng/mL was done. The limit of detection (LOD) was 3.91 ng/mL and the limit of quantification (LOQ) was 7.81 ng/mL.

2.9 LC-PDA-IT-TOF analysis

The UPLC system, from Shimadzu (Kyoto, Japan) consists of two pumps (LC-30AD), autoinjector (SIL-10AC) with refrigerated rack, degasser (DGU-20A), column oven (CTO-10AS) and a system controller (SCL-10Avp). The system is coupled to an IT-TOF-MS system with an electrospray ionization (ESI) interface (Shimadzu, Kyoto, Japan) and Photodiode Array UV-Vis detector (SPD-M20A). The nitrogen generator is a Nitrocrafter NCLC/MS from Air Liquid (Spain). The molecules were separated using a column AQUITY UPLC BEH C18 (2.1x100mm, 1.7 μ m, Waters, Spain) at 35 °C. Mobile phase A was 100% water with 0.1% formic acid. Mobile phase B was acetonitrile 100%, containing 0.1% formic acid. The gradient run started at 50% B (0-7 min), raised to 100% B (7-8 min), held to 100% B (8-9 min), returned to 50% B (9-9.5 min) and held to 50% B (9.5-12 min). The samples in the autosampler were cooled to 4 °C and injection volume was 5 μ L. The MS method was operated in positive mode with the following ESI source conditions: nebulizing gas flow, 1.5 L/min, heat block temperature and CDL temperature, 200 °C and detector voltage, 1.65 kV. The molecules were analysed using an ion accumulation time of 50 msec. The cell of PDA detector maintained at 30 °C. The range of wavelength of the PDA detector was set at 190-600 nm because of the deuterium (D_2) lamp was used.

For Gracilin H and Gracilin L standard, a eight-points calibration curve among the range 3.91-500 ng/mL was done. The limit of detection (LOD) was 3.91 ng/mL and the limit of quantification (LOQ) was 7.81 ng/mL.

2.10DNFB-induced delayed-type hypersensitivity reaction

The DNFB-induced delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction assay was performed as previously described (18). On days 0 and 1, mice were sensitized by skin painting on the abdomen with 25 μ L of 0.5% DNFB dissolved in acetone-olive oil (4:1). Vehicle, CsA (used as the positive reference substance) or *Spongionella* compounds were IP administered to each group (n=3) on five consecutive days (day 2-day 6) at 0.4 mg.Kg⁻¹. On day 6, mice were challenge by application of 20 μ L of 0.2% DNFB on inner and outer surface of the right ear, the left ear was used as control of normal tissue. After 24h, the difference in thickness between the left and the right constant area of the ear was measured with a caliper. The increment rate of ear swelling was expressed as follow: % of increment = ((thickness of the right ear – thickness of the left ear)/

thickness of the left ear)* 100. Mice were sacrificed and right ear tissue was fixed by immersion in 10% buffered formalin solution. Then, samples were embedded in paraffin according to standard laboratory procedures, and (3 μ m) sections were mounted onto silanized slides and dried overnight at 37°C. Tissue sections were routinely stained with Mayer's haematoxylin and eosin (H-E) following standard procedures for routine histological evaluations.

2.11 Statistical analysis

All experiments were carried out by duplicate a minimum of three times. Results were analysed by using one-way analysis of variance ANOVA with Dunnett's post hoc analysis. *p* values <0.05 were considered statistically significant. All results were expressed as the mean \pm SEM of 3 or more experiments.

3. Results

In a previous work we demonstrated that Gracilin H, A, L and Tetrahydroaplysulphurin-1 were able to form a complex with intracellular Cyp A. All *Spongionella* compounds showed a K_D in the μ M range, similar to that observed with CsA, a well-known Cyp A binder (14). Thus, considering that these four compounds act as binders of Cyp A we studied in which extent they modulate other functions such as extracellular Cyp A and CD147 related functions.

In normal tissues T lymphocytes ubiquitously express CD147 receptor. Nevertheless, under pathological situations T cells can overexpress this receptor on its surface (19). The increase of CD147 expression can also be induced in *in vitro* assays. In initial studies, we first measured the baseline expression of CD147 on non-activated versus activated T lymphocytes. As Figure 1H shows, while in resting cells the average of fluorescence intensity corresponding to CD147 expression was 225 ± 22.4 fluorescence intensity units, in Con A activated T cells after 48h stimulation the increase of CD147 significantly increased to 550.79 ± 73.1 fluorescence intensity units (*p* < 0.05). The fluorescence intensity units increased 2.44 times comparing with cells at resting conditions. Therefore, *in vitro* Con A activated T cells express higher levels of CD147 than resting cells. A representative microscopy image collected showed the difference in fluorescence intensity in activated (brightly fluorescent) (Figure 1B), versus non-

activated T cells (Figure 1A). It was described that the treatment with CsA before the activation of cells with Con A reduce the expression of CD147 receptor. Then, the next step was to confirm if CsA produce such reduction over CD147 in T cells. With this purpose, cells were pre-treated with CsA (used as positive control) 2h before Con A stimulation for 48h. As Figure 1H shows, the fluorescence intensity units decreased from 550 ± 73.1 to 185.7 ± 1.98 ($p < 0,001$) comparing with Con A activated cells. That is, the CD147 expression decreases to similar levels that cells at resting. Straightaway, the effect of *Spongionella* compounds pre-treatment before Con A activation was also tested. Here, with similar potency than CsA, all compounds were able to reduce the fluorescence intensity to levels of control cells; Gracilin H, A, L and Tetrahydroaplysulphurin-1 decreased the fluorescence intensity unit values to 206.23 ± 25.2 ($p < 0,01$), 206.24 ± 28.3 ($p < 0,001$), 201.34 ± 32.28 ($p < 0,001$) and 255.27 ± 11.6 ($p < 0,01$) respectively (Figure H). Therefore, all compounds were able to efficiently reduce the expression of CD147. As Figure 1D-G shows, as in the case of CsA, all the compounds produce a reduction in the fluorescence intensity comparing with Con A stimulated cells.

Cyp A acts as a strong chemotactic substance. In the case of inflammatory cells, under pathological situations, they can secrete this protein to the medium (6). Once in the extracellular medium, Cyp A acts recruiting and attracting to the damage tissues the inflammatory cells where they develop their functions. This protein acts as binder of CD147 receptor (20). As we demonstrated above, the CD147 receptor increases when T cells are activated. Due to this, the CD147 receptor can act as target of Cyp A. We first checked the differences in secretion of Cyp A to the extracellular medium between activated and resting T cells. As Figure 2 shows, we detect that there is a significant increase in the Cyp A release from activated T cells to the medium, 1.94 times higher than T lymphocytes at resting conditions. Therefore, the next step was to determine how *Spongionella* compounds acts over Cyp A release to the extracellular medium. In order to do this, T cells were first pre-treated 2h with CsA, used as positive control, or *Spongionella* compounds before Con A stimulation for 48h. Considering Con A as the maximum Cyp A release, CsA reduced a $85.42\% \pm 11.39$ ($p < 0.01$) the secretion of Cyp A to the extracellular medium. In the case of Gracilins, the most potent compound,

Gracilin A, showed an inhibition similar to CsA, a $85.09\% \pm 2.87$ ($p < 0.05$). In the case of Gracilin H and Gracilin L, a $65.91\% \pm 14.09$ ($p < 0.05$) and a $72.14\% \pm 14.51$ ($p < 0.05$) of inhibition was observed respectively. Nevertheless, Tetrahydroaplysulphurin-1 does not produce the inhibition of Cyp A to the extracellular environment.

The next question was to address the correlation between CD147 expression and the Cyp A mediated response. Thus, we compared the capacity of human Cyp A to induce migration in populations of resting T lymphocytes versus populations with high CD147 expression in its membrane surface. For these studies, human T lymphocytes from healthy donors were stimulated *in vitro* with Con A for 48h to generate populations containing a high CD147 expression T cells. After activation, T cells were placed in the upper part of the migration chamber in the presence of human Cyp A (50 ng.mL^{-1}). Thus, as Figure 3 shows, non-stimulated cells in the presence of Cyp A migrated a $69.53\% \pm 5.02$ versus stimulated cells that experimented a migration increase of $30.47\% \pm 4.54$ comparing with cells at resting after 24h. Considering Con A stimulated cells as the 100% of cell migration, when CsA is pre-incubated before Con A stimulation, the migration of T cells was completely abolished. Once we check that CsA significantly reduced the T cell migration, *Spongionella* compounds were tested. Gracilin H and Tetrahydroaplysulphurin-1 did not produce a significantly reduction of T cells migration. Nevertheless, cells pre-treated with Gracilin A were inhibited a $65.41\% \pm 4.34$ ($p < 0.05$), while the highest inhibition was for Gracilin L that completely abolished T cell migration (Figure 3).

Next, we tested the effects of CsA and two *Spongionella* compounds in *in vivo* assays. The choice of compounds was done according to the results obtained in the migration assays. Gracilin H with no effect over T cell migration assays and Gracilin L with complete inhibition over this response were chosen. First, we studied the pharmacokinetic of Gracilin H and L as well as CsA. As table II shows, CsA is detected in blood samples at 1h after in a high concentration ($640.7 \pm 37.1 \text{ ng/mL}$), while in brain the concentration detected is near to LOQ. Moreover, in our results we observe that the compound is observed in urine also at 1h in a concentration of CsA of $223.3 \pm 36.2 \text{ ng/mL}$ while in the faeces the quantity is almost insignificant. In the case of Gracilins, we observed that 1h and 24h after administration both compounds are present in the

urine although in LOQ or in a low concentration. Nevertheless, in the case of blood and brain samples there are no residues of the compounds at these two times. Due to this, we repeat the experiments at 10 min and 30 min in case of a fast absorption. In this case, as for 1h and 24h, the gracilins were not detected in blood or brain matrixes. However, the compounds were present in urine in the LOQ as before. Next, CsA and both Gracilins were tested on ear swelling in DTH reaction. We observed that after 4-8h from the last sensitization, DNFB treated animals experiment marked oedema and vasodilatation on the sensitized ear (data not shown). 24h after challenging all animals were sacrificed. As shows Figure 4, DNFB treated animals were considered as the maximum % of ear swelling. Comparing CsA, Gracilin H or L treated animals plus DNFB versus DNFB group we observed different responses on the % of ear swelling. Thus, the ear swelling was reduced in the presence of CsA in a $78.86\% \pm 16.07$ ($p < 0.05$), similarly to the effect observed with Gracilin L that reduce the ear swelling in a $88.37\% \pm 5.73$ ($p < 0.05$), while the smaller effect was observed with Gracilin H that produced a reduction of a $64.75\% \pm 2.79$ ($p < 0.05$). Furthermore, histological changes in ear tissues were also checked. Swelling of hypodermal tissue and the infiltration of inflammatory cells were observed in the ear section by histological analysis of H-E staining. As Figure 5B and 5B' shows DNFB treated cells significantly increased the ear thickness comparing to non-sensitized animal (Figure 5A and 5A') as well as the number of inflammatory cells. Nevertheless, CsA treated animals (Figure 5C and C') mitigated DNFB-induced ear swelling and inflammatory cells infiltration. In a similar manner, mouse treated with Gracilin H (Figure 5 D and D') and Gracilin L (Figure E and E') undergone a reduction of ear inflammation as well as inflammatory cell infiltrates comparing to DNFB-treated animals.

4. Discussion

In previous results we observed that the four *Spongionella* isolated compounds bind to Cyp A with a similar binding affinity than CsA, mimicking the mechanism of action of this calcineurin inhibitor (21). Cyp A is a protein implicated in multiple processes such as protein folding, trafficking and transport (8). All these functions are related with the PPIase activity and are showed by all family members of Cyps (22). Thus, the expression of different type of membrane receptors such as asialoglycoprotein receptor, insulin receptor or receptor-type tyrosine-protein kinase are regulated by this protein (23-26). The PPIase function of Cyp A is well documented for being inhibited by CsA (27). In this way, the transport and the expression of the surface membrane receptors aforementioned were greatly reduced in different reports by CsA treatment (19). Because *Spongionella* compounds directly targeted Cyp A (14), we point out the effect of the four compounds over the inhibition of Cyp A-PPIase activity as the possible mechanism of action that reduces the expression of the surface membrane receptor CD147 in T cells. In accordance with other reports it was proved the existence of a Cyp A binding site in the transmembrane region at the residue Pro²¹¹ of CD147 that is the responsible of the receptor transport to the surface (8, 13, 20, 28). In the case of *Spongionella* compounds, once binded to Cyp A and inhibited the PPIase activity they probably are able to modulate the trafficking of CD147 in a similar manner than CsA. On the other hand, it is well documented that Cyp A can be secreted to the extracellular medium as a response of the cell to stress (29, 30). In *in vitro* conditions the release of Cyp A from the cytosol can be induced with lectins by activating the intracellular machinery of the T cells (29). Thus, we observed that once T cells were stimulated with Con A, they release Cyp A to extracellular medium. Nevertheless, with the exception of Tetrahydroaplysulphurin-1, Gracilins H, A and L were able to efficiently reduce the secretion of Cyp A to extracellular environment. Reactive Oxygen Species (ROS) induce stress stimulus in the T cell, and therefore can induce Cyp A secretion as described by many researches (29, 31). In accordance to previous results published with mouse cortical neurons, all *Spongionella* compounds were able to protect the cell against ROS insults by increasing nuclear factor E-related factor 2 levels in the nucleus and consequently the antioxidant pathway that protect the cell is activated (16). Thus, such reduction of Cyp A secretion could be explained by the protective effects of these

compounds stimulating different enzymatic cell defence mechanisms. Moreover, in *in vitro* and *in vivo* assays all *Spongionella* compounds had the ability to inhibit extracellular signal regulated kinases (ERK), directly related with the inhibition of Cyp A secretion (15, 29). Besides, the implication of Cyp A in the CD147 transport to the plasma membrane, Gracilin A and Gracilin L efficiently avoid the T cell migration in the presence of Cyp A. The effect of both compounds can be mainly attributable to the effect produced at intracellular level by reducing the expression of CD147 in the T cell surface and therefore decreasing the chemotactic effect for Cyp A when it is present in the extracellular medium. In the case of Gracilin L, it showed approximately two times less affinity than Gracilin H for the same target (14). Nevertheless, the full inhibition observed with Gracilin L over T cell migration comparing to the absence of effect of Gracilin H could be associated with the effect over the PPIase activity and it would not necessarily be associated with the affinity for the Cyp A, considering that we check the binding capacity with SPR over Cyp A, nevertheless, with this technique we cannot know the region where the compounds exactly binds to. Moreover, in *in vivo* experiments both compounds disclosed a similar effect over ear swelling. This result can be explained by the effect of Gracilin H over other Cyps like Cyp B that is also involved in the inflammatory process (32). However, the effect of Gracilin H over other enzymes, transcription factors or adaptor proteins which induce a cascade of metabolic events result in the transcriptional activation of a large number of different proinflammatory genes (33). In fact, Gracilin H as well as Gracilin L reduced the expression of phosphorylated ERK in *in vivo* assays (15). In pharmacokinetics studies, we observed that CsA do not efficiently cross haemathoencephalic barrier, in accordance with other researches, but it is detected 1h after administration in a low concentration,. However, in the case of gracilin H and L, the absence of both compounds in blood could be explained by the association of the compounds to plasmatic proteins. With the IT-TOF technique the masses range is m/z 50-5000, thus we could not detect the posible complex formed. Nevertheless, the presence in urine of Gracilin H as well as Gracilin L may point out a previously absorption and incorporation of the molecules to the bloodstream to reach the kidneys where in order to being eliminated they have to dissociate from the binded protein and are again in the equipe mass range. The DTH reaction is usually regarded as a cell-mediated immune response and plays an essential role in the immune diseases, and

this is a cell-mediated pathologic response involving T cell activation and the production of many cytokines (34). Immunosuppressive drugs possess a strong anti-DTH reaction activity. In previous papers we observed that *Spongionella* compounds mimic the effect of CsA over calcineurin and the translocation of NFAT to the nucleus. NFAT is one of the transcriptional factors that induce a cascade of metabolic events, resulting in the transcriptional activation of a large number of different genes (33). In this way, they prevent the production of interleukin 2 (IL-2). These findings pointed out *Spongionella* compounds as possible anti-inflammatory or immunosuppressive agents (14). In the present study, we have shown that gracilin H and gracilin L efficiently reduced, as to CsA, the DHT reaction. The effect of both compounds on ear swelling was further supported by histological analysis, which showed that DNFB-induced increase in ear thickness and infiltration of white cells were decreased by CsA and also by both compounds. Thus, this effect can be produced by several mechanisms, such as the reduction of cytosolic calcium increase or the translocation inhibition of NFAT to the nucleus, both effects that lead to IL-2 inhibition (14, 35), by the reduction of CD147 expression in the cell surface and therefore reducing the inflammatory cells activation and proliferation and also by the reduction of Cyp A secretion due to the activation of antioxidant defence mechanisms of the cell avoiding the cell migration previously described (15, 16).

In this report we show the ability of *Spongionella* compounds to reduce the cell membrane expression of CD147 receptor, the inhibition of Cyp A secretion and the blockade of cell migration in the presence of Cyp A chemotactic stimulus. *In vivo* experiments confirmed the capacity of Gracilin H and Gracilin L to reduce mouse ear swelling, oedema, as well as the early inflammatory cells and among them T cells. The antioxidant and anti-inflammatory/immunosuppressive abilities described in previous works (14, 16) and the results obtained in the present research are good starting points for the promotion of Gracilins as a valuable option for synthetic drug development in order to obtain new drugs and stem the problems that present some of the available drugs used with anti-inflammatory and immunosuppressive purpose.

Acknowledgements

The research leading to these results has received funding from the following FEDER cofounded-grants. From CDTI and Technological Funds, supported by Ministerio de Economía y Competitividad, AGL2012-40185-CO2-01, AGL2014-58210-R, and Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, GRC2013-016, and through Axencia Galega de Innovación, Spain, ITC-20133020 SINTOX. From CDTI under ISIP Programme, Spain, IDI-20130304 APTAFOOD.

From the European Union's Seventh Framework Programme managed by REA – Research Executive Agency (FP7/2007-2013) under grant agreement 312184 PHARMASEA. We wish to thank the Clínica Losada Arránz, especially Ms. Paula López Arránz for providing the human blood samples for T cells purification. Jon Andoni Sánchez is supported by a fellowship from Plan Galego de Investigación e Crecemento, Xunta de Galicia, Spain.



Figure legends

Figure 1. Effect of CsA or *Spongionella* compounds on CD147 receptor expression levels in human T lymphocytes stimulated with Con A. Confocal microscopy representative images from the experiments that correspond to (A) untreated control cells, (B) Human T lymphocytes stimulated with Con A ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 48h, (C) human T lymphocytes pre-treated for 2h with CsA ($0.2\mu\text{M}$) before Con A stimulation for 48 h, (D) or Gracilin H ($1\mu\text{M}$), (E) gracilin A ($1 \mu\text{M}$), (F) gracilin L ($1 \mu\text{M}$), (G) or Tetrahydroaplysulphurin-1 ($1\mu\text{M}$), (H) Fluorescence intensity of human T lymphocytes pre-treated for two hours with CsA ($0.2 \mu\text{M}$), Gracilin H ($1 \mu\text{M}$), Gracilin A ($1 \mu\text{M}$), Gracilin L ($1\mu\text{M}$) or Tetrahydroaplysulphurin-1 ($1 \mu\text{M}$) and then with Con A ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 48h. All values are presented as the mean fluorescence intensity and are compared to that of T lymphocytes treated with Con A $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ alone by ANOVA statistical analysis followed by post hoc Dunnet's *t-test*. *($p<0.05$), **($p<0.01$), ***($p<0.001$), or between control cells and Con A treated cells # ($p<0.05$). Data are the mean \pm SEM of 3 independent experiments carried out by duplicate.

Figure 2. Effect of CsA or *Spongionella* compounds on Cyp A release in human T lymphocytes stimulated with Con A. Human T lymphocytes were pre-treated for two hours with CsA ($0.2 \mu\text{M}$), Gracilin H ($1 \mu\text{M}$), Gracilin A ($1 \mu\text{M}$), Gracilin L ($1 \mu\text{M}$) or Tetrahydroaplysulphurin-1 ($1 \mu\text{M}$) and then with Con A ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 48h. All values are shown in percentage with respect to Con A treated cells and compared to cells treated with CsA or *Spongionella* compounds by ANOVA statistical analysis followed by post hoc Dunnet's *t-test*. *($p<0.05$), **($p<0.01$). Mean \pm SEM of 3 independent experiments.

Figure 3. Cyp A-mediated migration of human T lymphocytes treated with CsA or *Spongionella* compounds before stimulation with Con A. All values are shown in percentage with respect to Con A treated cells and compared to cells treated with CsA or *Spongionella* compounds by ANOVA statistical analysis followed by post hoc Dunnet's *t-test*. *($p<0.05$), ***($p<0.001$) or Con A treated cells versus non-stimulated cells #($p<0.05$). Mean \pm SEM of 3 independent experiments.

Figure 4. *In vivo* effect of CsA or *Spongionella* compounds on the ear thickness 24 h after DNFB challenge. Mouse ear thickness calculated as the percentage of increment rate (thickness of the challenged ear minus the baseline thickness of the unchallenged ear) of ear swelling of DNFB sensitized animals and compared to CsA (0.4 mg.kg⁻¹), Gracilin H (0.4 mg.kg⁻¹) or Gracilin L (0.4 mg.kg⁻¹) treated animals. *(p<0.05). Data are mean ± SEM of 3 mice per group.

Figure 5. Histological changes of CsA or *Spongionella* compounds treatment 24h after DNFB-DTH treated ear. Ear tissues were stained with H-E and observed using a microscope. The observations were made at a magnification of x4 for figures A, B, C, D and E and x40 for figures A', B, C, D' and E'. Microphotographs are representative from one animal. **A-A'**, non-challenged control group. **B-B'**, DNFB-sensitized group. **C-C'**, 0.04 mg.kg⁻¹ CsA treated animals **D-D'**, 0.04 mg.kg⁻¹ Gracilin H treated group **E-E'**, 0.04 mg.kg⁻¹ Gracilin L treated group.



Table legends

Table I. MRM transitions and MS settings for CsA.

Table II. Quantification of CsA, Gracilin H and Gracilin L obtained by UPLC-MS method in 4 matrixes of blood, brain, urine and faeces at 10 min, 30 min, 1h and 24 hours after ip injection. (LOQ): limit of quantification, (nd): no detected.



Figures

Figure 1

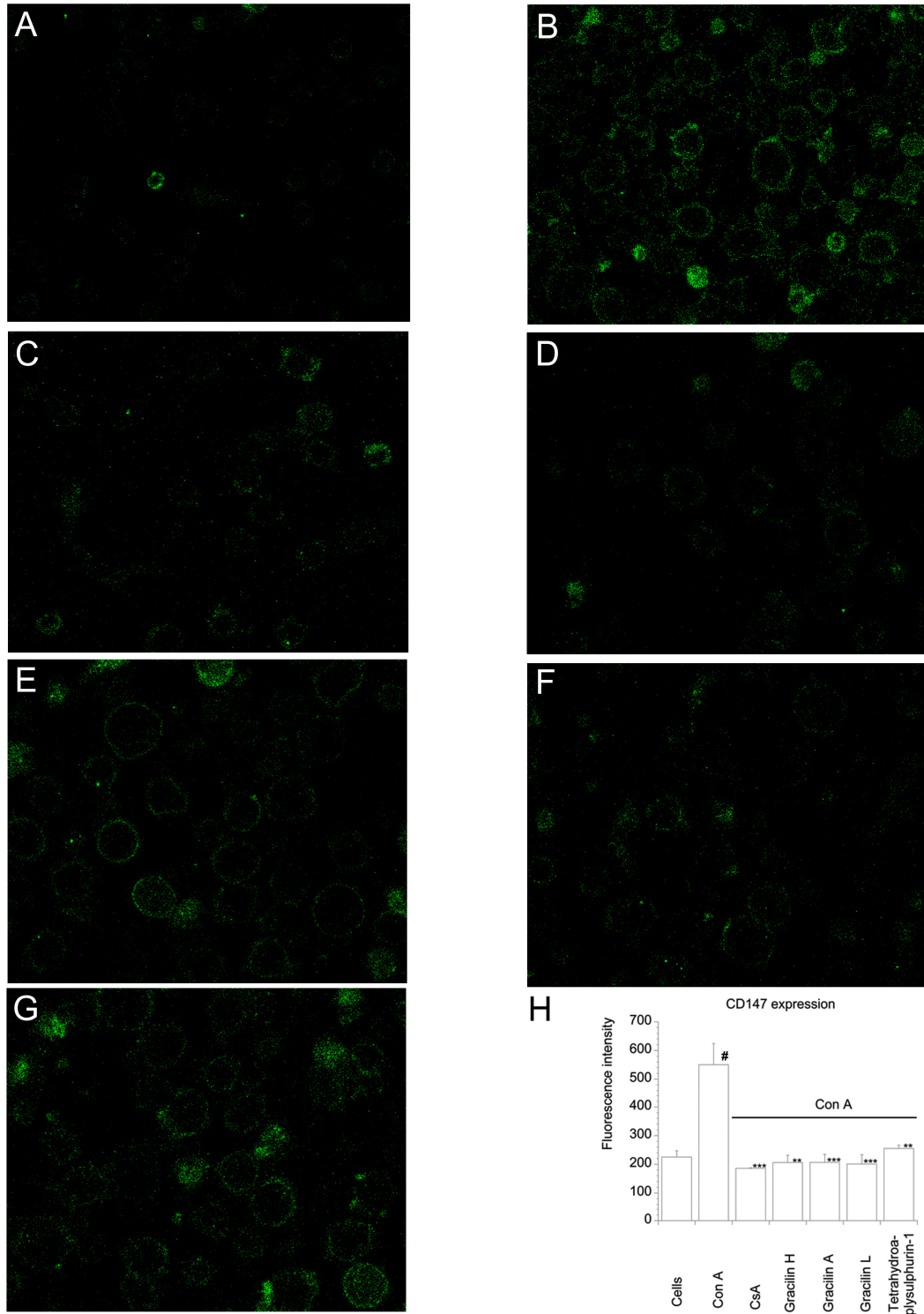


Figure 2

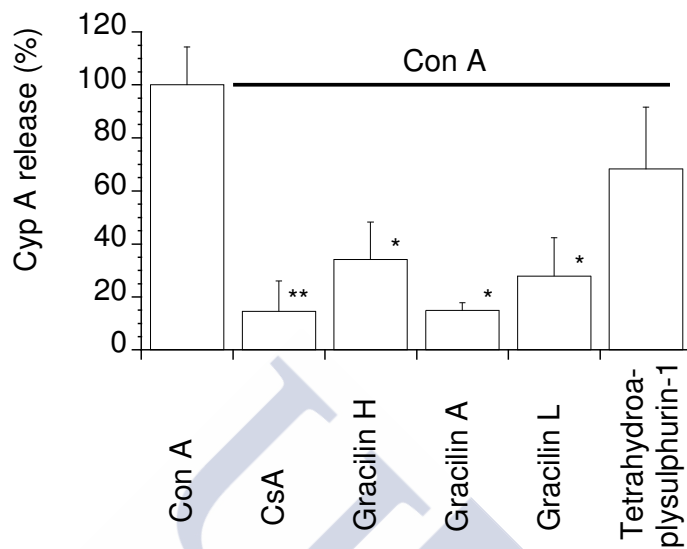


Figure 3

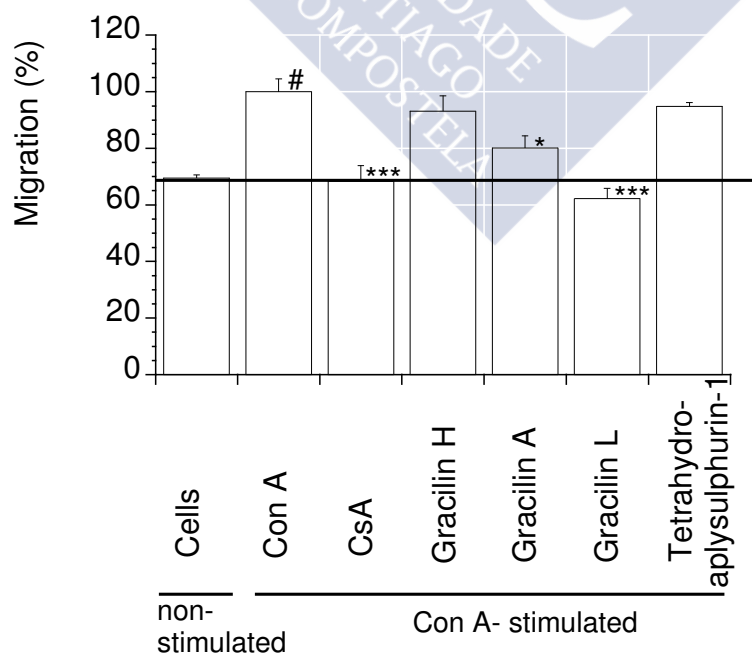


Figure 4

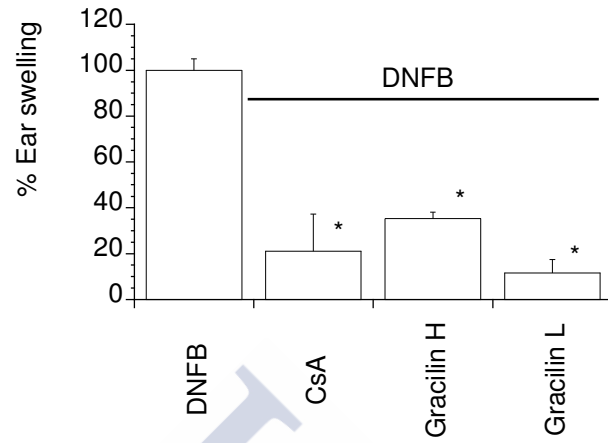


Figure 5

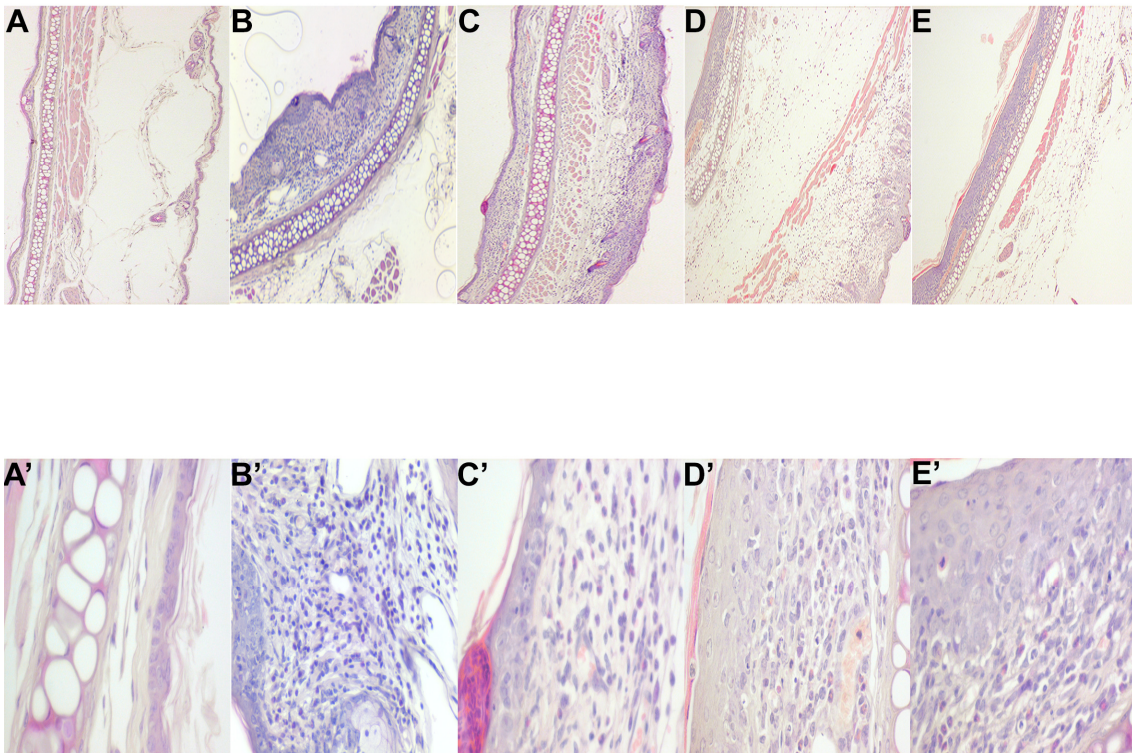


Table I

Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage
CsA [M+NH₄]⁺	1219.87	1202.8	165	12	4
CSA [M+2H]²⁺	601.93	156.1	140	32	4
	601.93	100.1	140	60	4

Table II

	Blood		Brain		Urine		Faeces	
	1h	24h	1h	24h	1h	24h	1h	24h
CsA (ng/mL)	640.7±37.1	9.8±1.8	16.9±2.3	nd	223.3±36.2	31.9±6.3	< LOQ	14.1±2.2
Gracilin H (ng/mL)	nd	nd	nd	nd	< LOQ	< LOQ	nd	nd
Gracilin L (ng/mL)	nd	nd	nd	nd	18.6±10.7	< LOQ	nd	< LOQ

	Blood		Brain		Urine		Faeces
	10min	30min	10min	30min	10min	30min	30min
Gracilin H (ng/mL)	nd	nd	nd	nd	nd	< LOQ	nd
Gracilin L (ng/mL)	nd	nd	nd	nd	< LOQ	< LOQ	nd

References

1. R.E. Handschumacher, M.W. Harding, J. Rice, R.J. Drugge, and D.W. Speicher. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science*. 226:544-547 (1984).
2. G. Fischer, B. Wittmann-Liebold, K. Lang, T. Kiefhaber, and F.X. Schmid. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*. 337:476-478 (1989).
3. G. Spik, B. Haendler, O. Delmas, C. Mariller, M. Chamoux, P. Maes, A. Tartar, J. Montreuil, K. Stedman, H.P. Kocher, and et al. A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP). *The Journal of biological chemistry*. 266:10735-10738 (1991).
4. B. Sherry, N. Yarlett, A. Strupp, and A. Cerami. Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89:3511-3515 (1992).
5. E.J. Fernandez and E. Lolis. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 42:469-499 (2002).
6. K. Arora, W.M. Gwinn, M.A. Bower, A. Watson, I. Okwumabua, H.R. MacDonald, M.I. Bukrinsky, and S.L. Constant. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses. *Journal of immunology*. 175:517-522 (2005).
7. V. Yurchenko, G. Zybarth, M. O'Connor, W.W. Dai, G. Franchin, T. Hao, H. Guo, H.C. Hung, B. Toole, P. Gallay, B. Sherry, and M. Bukrinsky. Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147. *The Journal of biological chemistry*. 277:22959-22965 (2002).
8. V. Yurchenko, T. Pushkarsky, J.H. Li, W.W. Dai, B. Sherry, and M. Bukrinsky. Regulation of CD147 cell surface expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain. *The Journal of biological chemistry*. 280:17013-17019 (2005).
9. U.H. Weidle, W. Scheuer, D. Eggle, S. Klostermann, and H. Stockinger. Cancer-related issues of CD147. *Cancer genomics & proteomics*. 7:157-169 (2010).

10. J. Landskron and K. Tasken. CD147 in regulatory T cells. *Cellular immunology*. 282:17-20 (2013).
11. S. Chiampanichayakul, P. Peng-in, P. Khunkaewla, H. Stockinger, and W. Kasinrerak. CD147 contains different bioactive epitopes involving the regulation of cell adhesion and lymphocyte activation. *Immunobiology*. 211:167-178 (2006).
12. A. Trachtenberg, T. Pushkarsky, S. Heine, S. Constant, B. Brichacek, and M. Bukrinsky. The level of CD147 expression correlates with cyclophilin-induced signalling and chemotaxis. *BMC research notes*. 4:396 (2011).
13. J.M. Damsker, M.I. Bukrinsky, and S.L. Constant. Preferential chemotaxis of activated human CD4+ T cells by extracellular cyclophilin A. *Journal of leukocyte biology*. 82:613-618 (2007).
14. J.A. Sanchez, A. Alfonso, M. Leiros, E. Alonso, M.E. Rateb, M. Jaspars, W.E. Houssen, R. Ebel, J. Tabudravu, and L.M. Botana. Identification of Spongionella compounds as cyclosporine A mimics. *Pharmacological research*(2016).
15. M. Leiros, E. Alonso, M.E. Rateb, W.E. Houssen, R. Ebel, M. Jaspars, A. Alfonso, and L.M. Botana. Gracilins: Spongionella-derived promising compounds for Alzheimer disease. *Neuropharmacology*. 93:285-293 (2015).
16. M. Leiros, J.A. Sanchez, E. Alonso, M.E. Rateb, W.E. Houssen, R. Ebel, M. Jaspars, A. Alfonso, and L.M. Botana. Spongionella secondary metabolites protect mitochondrial function in cortical neurons against oxidative stress. *Marine drugs*. 12:700-718 (2014).
17. A. Alfonso, M.A. Botana, M.R. Vieytes, and L.M. Botana. Prolactin induces calcium influx and release from intracellular pools in human T lymphocytes by activation of tyrosine kinases. *Cellular signalling*. 13:819-826 (2001).
18. G.Y. Cho and W. Hough. Time course of contact hypersensitivity to DNFB and histologic findings in mice. *Journal of Korean medical science*. 1:31-36 (1986).
19. J.N. Hahn, D.K. Kaushik, and V.W. Yong. The role of EMMPRIN in T cell biology and immunological diseases. *Journal of leukocyte biology*. 98:33-48 (2015).

20. V. Yurchenko, S. Constant, and M. Bukrinsky. Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins. *Immunology*. 117:301-309 (2006).
21. J.A. Sanchez, A. Alfonso, M. Leiros, E. Alonso, M.E. Rateb, M. Jaspars, W.E. Houssen, R. Ebel, J. Tabudravu, and L.M. Botana. Identification of Spongionella compounds as cyclosporine A mimics. *Pharmacological research*. 107:407-414 (2016).
22. M.T. Ivery. Immunophilins: switched on protein binding domains? *Medicinal research reviews*. 20:452-484 (2000).
23. H. Pan, C. Luo, R. Li, A. Qiao, L. Zhang, M. Mines, A.M. Nyanda, J. Zhang, and G.H. Fan. Cyclophilin A is required for CXCR4-mediated nuclear export of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2, activation and nuclear translocation of ERK1/2, and chemotactic cell migration. *The Journal of biological chemistry*. 283:623-637 (2008).
24. T. Huang, H. Deng, A.W. Wolkoff, and R.J. Stockert. Phosphorylation-dependent interaction of the asialoglycoprotein receptor with molecular chaperones. *The Journal of biological chemistry*. 277:37798-37803 (2002).
25. S. Shiraishi, H. Yokoo, H. Kobayashi, T. Yanagita, Y. Uezono, S. Minami, M. Takasaki, and A. Wada. Post-translational reduction of cell surface expression of insulin receptors by cyclosporin A, FK506 and rapamycin in bovine adrenal chromaffin cells. *Neuroscience letters*. 293:211-215 (2000).
26. E. Chklovskaja, C. Nissen, L. Landmann, C. Rahner, O. Pfister, and A. Wodnar-Filipowicz. Cell-surface trafficking and release of flt3 ligand from T lymphocytes is induced by common cytokine receptor gamma-chain signaling and inhibited by cyclosporin A. *Blood*. 97:1027-1034 (2001).
27. W.B. Ou, W. Luo, Y.D. Park, and H.M. Zhou. Chaperone-like activity of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase during creatine kinase refolding. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 10:2346-2353 (2001).
28. X. Qu, C. Wang, J. Zhang, G. Qie, and J. Zhou. The roles of CD147 and/or cyclophilin A in kidney diseases. *Mediators of inflammation*. 2014:728673 (2014).

29. Z.G. Jin, M.G. Melaragno, D.F. Liao, C. Yan, J. Haendeler, Y.A. Suh, J.D. Lambeth, and B.C. Berk. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circulation research*. 87:789-796 (2000).
30. P. Nigro, G. Pompilio, and M.C. Capogrossi. Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell death & disease*. 4:e888 (2013).
31. J. Suzuki, Z.G. Jin, D.F. Meoli, T. Matoba, and B.C. Berk. Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. 98:811-817 (2006).
32. V. Yurchenko, M. O'Connor, W.W. Dai, H. Guo, B. Toole, B. Sherry, and M. Bukrinsky. CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B. *Biochemical and biophysical research communications*. 288:786-788 (2001).
33. Y. Xiong, S. Zhang, L. Xu, B. Song, G. Huang, J. Lu, and S. Guan. Suppression of T-cell activation in vitro and in vivo by cordycepin from *Cordyceps militaris*. *The Journal of surgical research*. 185:912-922 (2013).
34. J.H. Lim, J.S. Kim, I.H. Yoon, J.S. Shin, H.Y. Nam, S.H. Yang, S.J. Kim, and C.G. Park. Immunomodulation of delayed-type hypersensitivity responses by mesenchymal stem cells is associated with bystander T cell apoptosis in the draining lymph node. *Journal of immunology*. 185:4022-4029 (2010).
35. J.A. Sanchez, A. Alfonso, M. Leiros, E. Alonso, M.E. Rateb, M. Jaspars, W.E. Houssen, R. Ebel, and L.M. Botana. Spongionella Secondary Metabolites Regulate Store Operated Calcium Entry Modulating Mitochondrial Functioning in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 37:779-792 (2015).



4. DISCUSIÓN

Los organismos de origen marino representan una fuente infinita de compuestos activos. En las últimas décadas, los compuestos aislados a partir de organismos acuáticos, en especial de origen marino, han despertado el interés de la comunidad científica y la industria farmacéutica. Los compuestos marinos poseen características estructurales y químicas únicas. Estas propiedades dan por un lado la oportunidad de descubrir mecanismos de acción novedosos y, por otro, dianas y rutas envueltas en los procesos básicos de la célula, además, también sirven como inspiración para la síntesis de nuevos compuestos [255]. En este sentido, las cianobacterias representan una fuente muy importante de productos naturales, al igual que las esponjas marinas, por su diversidad estructural y potencial terapéutico [33, 140]. En la presente Tesis Doctoral se estudia el mecanismo de acción de un péptido cíclico aislado de cultivos de cianobacterias del género *Phormidium autumnale* conocido como autumnalamida y 4 metabolitos aislados de la esponja marina *Spongionella gracilis*, las gracilinas A, H, y L y la tetrahidroaplisulfurina-1.

Las cianobacterias se caracterizan por ser productoras de una gran diversidad de metabolitos con un potencial terapéutico importante [256, 257]. Los péptidos y en especial los que poseen estructura cíclica, como es el caso de la autumnalamida, tienen la característica de presentar un amplio rango de bioactividades, de ahí el interés por su estudio [258-260]. Una gran parte de los compuestos aislados a partir de cianobacterias normalmente resultan extremadamente citotóxicos a concentraciones en el rango nanomolar o incluso inferiores. Por esta razón, y al no haber ningún resultado sobre los efectos biológicos de la autumnalamida, realizamos un estudio de la citotoxicidad y el efecto sobre los flujos iónicos en el modelo celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano. En este caso, la autumnalamida no reduce la viabilidad en estas células hasta concentraciones superiores a 10 μM . Por esta razón se utiliza la concentración de 10 μM para la realización de todos los experimentos. Muchos de los compuestos aislados a partir de cianobacterias presentan elevada neurotoxicidad en la que están implicados los canales iónicos [261]. Por esta razón, se determinó el efecto de la autumnalamida sobre los Na_v . Este compuesto no produce variación en las corrientes en las que interviene este tipo de canales. A continuación, se estudia el efecto de la autumnalamida en la regulación del Ca^{2+} . El péptido no muestra un efecto directo sobre los niveles citosólicos de Ca^{2+} . Por este motivo se estudia el efecto del compuesto en la entrada de

Ca^{2+} inducida por la ionomicina. Se observa que la autumnalamida bloquea la entrada del ión de forma parcial desde el medio extracelular. Este bloqueo se produce de forma similar e independiente de si la incubación se realiza antes o después del vaciamiento de reservorios intracelulares sensibles a ionomicina, sin modificar a los mismos. En este contexto se estudió el efecto de la autumnalamida sobre los canales SOC, una de las principales vías de entrada del Ca^{2+} en las células [262]. La entrada de Ca^{2+} a través de estos canales puede estar regulada por un efecto directo sobre éstos o bien por un efecto indirecto sobre los orgánulos intracelulares que los modulan, como son la mitocondria y el ER [172, 263]. Para estudiar el efecto de la autumnalamida sobre los canales SOC, se aíslan farmacológicamente estos canales usando tapsigargina. Se observa que la autumnalamida bloquea la entrada del Ca^{2+} de manera dosis-dependiente y similar a otros bloqueantes directos de estos canales. Para descartar que el efecto inhibitorio de la autumnalamida se produce por interacción directa con los canales SOC, se testa en presencia de FCCP, un desacoplador mitocondrial [264-268]. El FCCP inhibe la entrada de Ca^{2+} en un 50%, mientras que ambos compuestos incrementan la inhibición un 20% más. En este caso, hay un 30% de la entrada de Ca^{2+} que no es bloqueada con ambos compuestos. Éste hallazgo puede indicar que la autumnalamida y el FCCP compiten por unirse a la misma diana celular, pues la autumnalamida sola es capaz de bloquear de forma completa dicha entrada. Con idea de testar el estado metabólico de la mitocondria en presencia del compuesto se estudia el potencial de membrana mitocondrial. La autumnalamida produce una disminución del potencial de membrana de un 36% en comparación con el FCCP, que muestra el doble de potencia. Se ha descrito que la CsA es capaz de mantener el potencial de membrana mitocondrial, al impedir la formación de mPTP por su unión directa a la Cyp D [269, 270]. En el caso de la autumnalamida, la CsA es capaz de revertir su efecto de manera completa, cosa que no ocurre de forma tan eficaz con el desacoplador mitocondrial. Por este motivo, los efectos de ambos compuestos en principio parecen ser distintos, mientras el FCCP altera el potencial de membrana de la mitocondria y como consecuencia induce la apertura del mPTP, la autumnalamida podría estar actuando de forma inversa. Para clarificar si efectivamente la autumnalamida modula la apertura del mPTP se estudia su efecto sobre esta estructura. Tanto en el caso del FCCP como de la autumnalamida se observa que inducen dicha apertura. Sin embargo, el tratamiento previo con CsA, bloquea la apertura

del mPTP en ambos casos. En vista de estos resultados, se determina el efecto sobre la entrada de Ca^{2+} al incubar ambos compuestos, FCCP o autumnalamida, en presencia de CsA. Estos datos resultan reveladores, pues demuestran que la CsA elimina el efecto de bloqueo producido por la autumnalamida a través de los canales SOC de manera completa. El perfil para el caso del FCCP, sin embargo, es diferente ya que el bloqueo producido por el desacoplador mitocondrial no se elimina totalmente en presencia de CsA. Por tanto, basándonos en los resultados obtenidos en las células de neuroblastoma se puede concluir que la autumnalamida bloquea indirectamente la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC actuando a nivel mitocondrial probablemente promoviendo la inducción de la formación del mPTP. Al formarse ésta estructura, se altera la función mitocondrial y se produce el bloqueo de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC. Por el efecto opuesto entre la CsA y la autumnalamida sobre los perfiles de Ca^{2+} , parece que la Cyp D es la diana de este compuesto. Para comprobar esta teoría, se estudia la interacción entre la autumnalamida y la Cyp D empleando un biosensor de afinidad SPR. Los datos obtenidos muestran que la autumnalamida posee una constante de disociación en el equilibrio (K_D) de 1,5 μM , es decir, una afinidad 3 veces mayor por la Cyp D que la CsA, que posee una K_D de 4,5 μM . Debido a que las CyPs comparten un dominio común, es frecuente que compuestos que muestran afinidad de unión por un miembro de esta familia, la muestren también por otras proteínas de la misma [201]. Se observa que la autumnalamida también tiene unión con la Cyp A. Esta proteína desempeña un papel básico en muchos procesos fisiológicos y patológicos de la célula como la inflamación, enfermedades cardiovasculares o el cáncer [207]. En el caso de la CsA, una vez se ha formado un complejo entre la Cyp A y la CsA, se bloquea la actividad fosfatasa de la CN y se evita la translocación del NFAT al núcleo. Como consecuencia, se inhibe la actividad de transcripción sobre los genes que codifican para algunas ILs [271]. Al estudiar el efecto de la autumnalamida sobre la actividad fosfatasa de la CN en presencia de Cyp A se observa que produce la inhibición de la enzima. Sin embargo, a pesar del bloqueo mediado sobre la enzima mediado por la Cyp A, no se puede descartar un efecto de bloqueo del compuesto directamente sobre la CN, lo mismo que sucede con otros péptidos cíclicos producidos por cianobacterias [258]. Aunque no se detecta una disminución de los niveles de NFATc1 nucleares, sin embargo, la producción de IL-2 está fuertemente inhibida en linfocitos T humanos

previamente activados. Esta inhibición de la producción de IL-2 podría explicarse como consecuencia del fuerte bloqueo producido por la autumnalamida sobre los canales SOC, una de las principales vías de incremento de Ca^{2+} desde el medio extracelular [272-275]. Este efecto puede regular así otros factores de transcripción, PP o MAPK que intervienen en su producción y que están regulados por el Ca^{2+} [276]. Además, otros compuestos que actúan inhibiendo la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC como el ácido flufenámico, también se han descrito como bloqueantes de la producción de IL-2 [274, 275]. Por tanto, la autumnalamida puede ser una herramienta interesante para estudiar la afinidad de las Cyps y abrir la puerta para el desarrollo de compuestos con aplicación en patologías relacionadas con alteraciones en estas señales bioquímicas.

Por los efectos observados con los compuestos de *Spongionella* donde se describían como moduladores de la función mitocondrial [123, 124], se estudia el efecto de las gracilinas A, H, L y tetrahidroaplisulfurina-1 sobre los flujos de Ca^{2+} empleando la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Ninguno de los compuestos produce un efecto reseñable sobre los niveles citosólicos de Ca^{2+} . Al estudiar la entrada del ion a través de los canales SOC se observa que sólo la gracilina H produce una reducción remarcable de la liberación de Ca^{2+} desde el ER sin modificar la entrada del ion desde el medio extracelular. Sin embargo, tanto la gracilina A, como la gracilina L y la tetrahidroaplisulfurina-1 bloquean la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC en un 34%, 45% y 40% respectivamente. Para descartar que el efecto inhibitorio de los compuestos de *Spongionella* sobre la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC se produce por un efecto sobre el ER, se adicionan una vez inducida la liberación de Ca^{2+} desde este orgánulo. Se observa que la gracilina H, al igual que cuando la incubación se hace previa al vaciamiento de reservorios, no modifica la entrada de Ca^{2+} a través de los canales. La gracilina A, la gracilina L y la tetrahidroaplisulfurina-1 mantienen el efecto de bloqueo sobre los canales SOC aunque de manera menos efectiva que cuando la incubación se hace antes del vaciamiento de Ca^{2+} del ER. Este hallazgo indica que los compuestos aislados de *Spongionella* modulan la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC mediante otra estructura celular diferente del ER. En base a los resultados obtenidos, se estudia su efecto sobre la mitocondria de acuerdo con los indicios descritos con anterioridad donde se apuntaba a éstos metabolitos secundarios como moduladores de la función mitocondrial [123]. Los experimentos revelan que todos los

compuestos son capaces de revertir los efectos del FCCP. Entre los efectos que revierten los compuestos de *Spongionella* se encuentran la liberación de Ca^{2+} inducida por el FCCP desde la mitocondria, la disminución de la liberación de Ca^{2+} del ER y el efecto inhibitorio sobre la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC. En este último caso, con la excepción de la gracilina A. Además, en ensayos realizados para estudiar la apertura del mPTP inducida por FCCP, se observa que los metabolitos secundarios aislados de *Spongionella* bloquean la apertura del mismo. La inhibición de la formación del mPTP podría ser el resultado de un efecto indirecto por la reducción de los niveles de ROS que producen éstos compuestos y se puede asociar a la inhibición de la liberación de caspasa-3 [123]. Sin embargo, también podría deberse a un efecto directo por su unión a alguna de las estructuras que componen el mPTP.

La CsA es capaz de revertir el efecto inhibitorio del desacoplador mitocondrial sobre la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC, como los compuestos de *Spongionella*. Además, se ha descrito que el tratamiento con CsA revierte el bloqueo de los canales SOC en el modelo celular de neuronas transgénicas 2a para la enfermedad de Alzheimer al interactuar con la Cyp D e impedir la formación del mPTP [277]. Por tanto, debido a que los compuestos aislados de *Spongionella* tienen un efecto similar al de la CsA sobre el Ca^{2+} y también bloquean la apertura del mPTP, se estudia la interacción de los mismos sobre la Cyp D. Se observa que mientras la gracilina H y la A no muestran afinidad por la Cyp D, la gracilina L y la tetrahidroaplisulfurina-1 sí lo hacen. En el caso de ambos compuestos se puede apuntar a su unión directa con la Cyp D como mecanismo implicado en impedir la apertura del mPTP. Sin embargo, no se puede descartar que el efecto mostrado sobre la activación de los mecanismos de defensa antioxidantes en la célula sea el mecanismo por el cual los otros compuestos, gracilina A y H, evitan la formación del mPTP [123]. Así, la inhibición de la apertura del mPTP producida por los compuestos de *Spongionella* explicaría como evitan la alteración de la capacidad de tampón que tiene la mitocondria sobre el Ca^{2+} . De este modo, la entrada del ión a través de los canales SOC se puede mantener de manera fisiológica en la célula evitando así la inhibición de la misma inducida por agentes desacopladores como FCCP. El mPTP puede estar modulado por muchos agentes [176]. Basándonos solamente en las estructuras de los compuestos es difícil concluir que éste efecto sea debido únicamente a la unión de la gracilina L y la tetrahidroaplisulfurina-1

con la Cyp D. La presencia de un grupo hidroxilo en la gracilina L puede explicar la interacción con la Cyp D. Si observamos las diferencias estructurales de la tetrahidroaplisulfurina-1 con la gracilina H, se concluye que la diferente disposición de los anillos alifáticos y la presencia de un sólo grupo acetato en la tetrahidroaplisulfurina-1, puede estar facilitando su interacción con la Cyp D. Los resultados sugieren por tanto que, la gracilina L y la tetrahidroaplisulfurina-1 tienen una actividad similar a la de la CsA sobre la Cyp D. Además, en ensayos realizados *in vivo* en ratones triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer se observó que, efectivamente, algunos de los compuestos de *Spongionella* inhiben de manera efectiva la proteína β -amiloidea y la hiperfosforilación de tau [124]. En este sentido se ha descrito que existe una relación directa entre la producción de ROS en la mitocondria por acumulación de la proteína β -amiloidea y la interacción de ésta con la Cyp D, incrementando la susceptibilidad de formación del mPTP [181]. Así, el efecto de los compuestos de *Spongionella* como moduladores de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC e inhibidores del mPTP no hacen sino aportar más evidencias de la prometedora actividad de estos compuestos con aplicabilidad terapéutica en enfermedades donde ésta estructura juega un papel central [178]. Además, se sabe que las Cyps desempeñan funciones básicas en otras enfermedades humanas como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la diabetes o las alteraciones del sistema inmune. La asociación de los compuestos de *Spongionella* con la Cyp D abre la posibilidad de estudiar el efecto de estos compuestos sobre otras Cyps como ocurre en el caso de la CsA [207].

En los estudios de afinidad de los compuestos de *Spongionella* con la Cyp A se observó que todos muestran unión a esta proteína citosólica. En el caso de la gracilina A y la tetrahidroaplisulfurina-1 lo hacen con una afinidad superior a la CsA, con unas K_D de 2,53 μM y 5,13 μM frente a 6,83 μM respectivamente. Se ha descrito que la formación del complejo Cyp A-CsA está influenciado por el pH al cual se inmoviliza la proteína sobre la superficie del biosensor, siendo óptimo para la Cyp A un pH de 6 [278]. Si bien, se observa que variaciones en el pH de inmovilización no afectan a la cantidad de proteína pegada sobre la superficie del biosensor, sí influye en la asociación de los compuestos con la proteína. En el caso de la CsA, la afinidad del compuesto mostrada por la Cyp A aumenta enormemente al incrementar el pH de inmovilización

de la proteína. Sin embargo, los compuestos de *Spongionella* no se unen a la proteína inmovilizada a pH 6. Éstos resultados muestran que dependiendo del pH al que se pegue la proteína sobre la superficie del biosensor de afinidad SPR, los sitios activos de la Cyp A que interaccionan con la CsA pueden estar más o menos disponibles. Se ha descrito que bajo condiciones de inmovilización ácidas (pH 4,5) el potencial de carga de la superficie de la Cyp A fuerza a la proteína a orientarse con la región de unión de la CsA hacia la superficie del biosensor, de tal forma que la proteína está menos accesible para interaccionar con la CsA, lo que se traduce en un descenso de la afinidad [279]. En el caso de los compuestos de *Spongionella*, la ausencia de unión bajo condiciones de pH más básico puede deberse a que el lugar de unión de los compuestos se ve también modificado. Basándonos en la estructura de los compuestos se puede indicar que la afinidad en el caso de la gracilina L puede ser menor debido a la presencia del grupo hidroxilo situado en la posición 3 produciendo un impedimento estérico o un efecto de repulsión sobre el sitio de unión en la proteína, a diferencia de lo que ocurría con la Cyp D, donde el grupo hidroxilo parece resultar esencial para su unión a la proteína mitocondrial. En el caso de la gracilina H, la estructura es totalmente diferente y podría ser la posición del oxígeno en los anillos heterocíclicos en esta parte de la molécula la que disminuya la afinidad por el sitio de unión en la Cyp A.

Una vez se ha formado el complejo Cyp A-CsA, la unión de este complejo a la CN produce su inhibición [231, 280]. En nuestros experimentos demostramos que a excepción de la gracilina L, que no produce una inhibición remarcable, el resto de los compuestos producen bloqueo de ésta PP. El efecto sobre la CN está relacionado con el complejo formado entre Cyp A-compuesto ya que la inhibición se observa sólo en presencia de la Cyp A. Se sabe que la CN, entre otros sustratos, actúa defosforilando el NFAT [281]. Éste factor de transcripción, una vez en el núcleo comienza a transcribir genes que codifican la IL-2 [282, 283]. Para el estudio del efecto de los compuestos de *Spongionella* sobre el NFAT se emplearon linfocitos T humanos de pacientes sanos y se activaron con Con A, simulando de esta manera la interacción antígeno-linfocito T en el cuerpo humano. En este caso se observa que todos los compuestos de *Spongionella* son capaces de reducir la defosforilación del NFAT siendo la tetrahidroaplisulfurina-1 el compuesto más potente, reduciendo la liberación de IL-2 en un 82% y la gracilina H el que menor efecto muestra, con una inhibición de un 57%. Esta diferencia en la potencia

inhibitoria podría ser atribuida en parte a la afinidad de los compuestos por la Cyp A. Sin embargo, el efecto inhibitorio sobre la entrada de Ca^{2+} citosólico también es un proceso a tener en cuenta. NFAT es una familia de proteínas sensibles al Ca^{2+} y, sobre todo en las células T, su localización está relacionada con la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC [284, 285]. De hecho, la menor afinidad de la gracilina L por la Cyp A podría estar compensada por el efecto inhibitorio que ésta presenta sobre la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC. En el caso de la gracilina H, se observa una baja afinidad por la Cyp A y no se modifica la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC. De este modo, apuntamos a que la gracilina L bloquea la translocación del NFAT mayoritariamente por la regulación de la señal de Ca^{2+} . Sin embargo, en el caso de la tetrahidroaplisulfurina-1 y la gracilina A, ejercen su acción principalmente por su efecto sobre la CN, aunque la inhibición de los canales SOC también pueda tener un efecto sumatorio [272]. Además de éstos hallazgos, todos los compuestos de *Spongionella* reducen la producción de IL-2 de manera muy eficiente. La tetrahidroaplisulfurina-1 induce un bloqueo de la producción de IL-2 casi total, siendo la gracilina H de nuevo la que lo hace con menor potencia. Refiriéndonos a la correlación entre la afinidad de los compuestos por la Cyp A, el efecto inhibitorio sobre el NFAT y la inhibición de la producción de IL-2, sólo en el caso de la tetrahidroaplisulfurina-1 los tres parámetros guardan relación, es decir, elevada afinidad por la Cyp A, inhibición del NFAT y un bloqueo casi total de la IL-2. Por tanto, se puede decir que la buena afinidad de los compuestos por la Cyp A se puede relacionar directamente con el efecto biológico. Las diferencias observadas entre la afinidad de la Cyp A y los compuestos de *Spongionella* y la variación en los efectos biológicos observados podría deberse también a una pérdida de flexibilidad conformacional de la proteína al encontrarse inmovilizada sobre la superficie del biosensor de afinidad SPR [278]. Los cambios conformacionales que se pueden producir al inmovilizar la proteína pueden afectar a la unión de los compuestos y como consecuencia se pueden observar diferentes afinidades, mientras su actividad biológica es muy similar a nivel celular. Es importante tener en cuenta que la afinidad cuantificada por el SPR no siempre se traduce en un efecto biológico eficiente, pues los compuestos pueden unirse a la proteína pero sin embargo no actuar sobre los centros activos de la molécula y obtener de esta forma el efecto biológico esperado. Así, en el caso de la tetrahidroaplisulfurina-1 y la gracilina A se podría sugerir un mecanismo de

acción similar al de la CsA. Mientras que todos los compuestos fueron capaces de reducir la producción de IL-2 de manera muy similar en los linfocitos T activados, en el caso de la gracilina H y L, por su menor afinidad por la Cyp A, se sugiere otro mecanismo adicional implicado en la regulación de ésta señal. Por ejemplo, la modulación de las señales de Ca^{2+} , estrechamente relacionada con la regulación de la respuesta inmune [286].

Toda la familia de las Cyps se caracterizan por tener funciones básicas esenciales en la célula como el plegamiento, el tráfico y el transporte de proteínas [247]. Estas funciones están vinculadas a la actividad PPIasa de las Cyps [240]. A la Cyp A se la relaciona con la regulación de diferentes tipos de receptores de membrana como el receptor de la asialoglicoproteína, el de la insulina o receptores de proteínas cinasas tirosina [243-245]. En éste contexto y en base a los resultados obtenidos con anterioridad, donde los compuestos de *Spongionella* imitaban el mecanismo de acción de la CsA sobre la CN, se estudia el efecto de estos compuestos sobre la expresión del receptor CD147 en la superficie de la membrana celular. En este caso, todos reducen la expresión del receptor CD147 en linfocitos T humanos previamente activados. Se ha descrito la existencia de un lugar de unión específico en el receptor CD147 para la Cyp A, responsable del transporte del receptor a la superficie de la membrana [247, 254, 287]. También se ha relacionado la inhibición de la actividad PPIasa de la CsA con un bloqueo del transporte del CD147 [288]. En el caso de los compuestos de *Spongionella*, probablemente una vez se unen a la Cyp A inhiben la actividad PPIasa. De esta forma se modula el tráfico del receptor CD147 a la superficie de la membrana de manera similar a como lo hace la CsA [289].

Por otro lado, se sabe que la Cyp A se libera al medio extracelular ante estímulos de estrés [213]. En condiciones *in vitro*, la secreción de la Cyp A se puede inducir mediante la activación de los linfocitos T con lectinas. En nuestros resultados se observa que las gracilinas H, A, y L reducen la liberación de Cyp A al medio. Esta reducción del agente quimiotáctico al medio extracelular podría explicarse por el efecto en la activación del factor nuclear Nrf2 y la consecuente modulación de distintas enzimas que actúan evitando la oxidación y por tanto el estrés en la célula [123, 290]. Además, ensayos *in vitro* e *in vivo* también han indicado la inhibición de ERK por parte

de los compuestos de *Spongionella*. Este factor está muy relacionado con la secreción de la Cyp A [124, 213].

Sumado a la implicación de la Cyp A en el transporte del receptor CD147 a la membrana, la gracilina A y la L también evitan la migración de los linfocitos en presencia de Cyp A en el medio extracelular. El efecto de ambos compuestos podría estar asociado al efecto producido a nivel intracelular al reducir la expresión del receptor CD147 en las células T por el bloqueo de la actividad isomerasa de la proteína [214]. En este sentido, los resultados donde se testa la afinidad de los compuestos de *Spongionella* por la Cyp A muestran que la gracilina L posee una afinidad dos veces inferior a la gracilina H por la misma diana. Sin embargo, la gracilina L inhibe de manera completa la migración de los linfocitos T, mientras que la gracilina H no tiene efecto alguno sobre ésta. La diferencia de efecto entre los dos compuestos pone de manifiesto que una mayor afinidad por la Cyp A no implica un mayor efecto de bloqueo de la actividad isomerasa. En este sentido, en el caso de la CsA se ha determinado que, a pesar de que la unión del fármaco inmunosupresor se produce sobre el mismo centro activo de la proteína, el efecto sobre la CN puede desvincularse de un efecto sobre la actividad isomerasa o viceversa. Esto se debe a que la interacción de ciertos aminoácidos de la molécula con la proteína provocan que se produzca un efecto u otro [291]. La técnica del biosensor de afinidad SPR no permite predecir el lugar exacto de unión de los compuestos sobre la región de la proteína que está implicada con el efecto biológico. Por otro lado, ésta diferencia de efecto también podría ser justificado por la acción de la gracilina H sobre otras Cyps como la B, asociadas a procesos inflamatorios y que también puede ser secretada al medio y actuar como agente quimiotáctico [249]. Además, la gracilina H puede tener efecto sobre otras enzimas, proteínas o factores de transcripción los cuales pueden inducir una cascada de eventos metabólicos que resultan en la activación de una gran cantidad de genes pro-inflamatorios y que también podrían estar asociados con el efecto *in vivo* [292]. De hecho, la gracilina H así como la L redujeron la expresión de ERK en ensayos *in vivo* [124].








Por los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* se seleccionaron la gracilina H y la L para realizar los ensayos *in vivo*. Se utilizan estos compuestos basándonos en el efecto mostrado en los ensayos de migración de los linfocitos T, ausencia de efecto en el caso de la gracilina H y efecto inhibitorio completo en el caso de la gracilina L. En


primer lugar se realizaron estudios farmacocinéticos. De éstos resultados se obtiene que ambos compuestos se observan en orina 1h y 24 h tras la administración ip, aunque en ambos casos en concentraciones inferiores al límite de cuantificación del equipo. Sin embargo, en el caso de las muestras de sangre o cerebro no se detecta su presencia. Por éste motivo, se analizaron muestras a tiempos más cortos de administración ip, 10 min y 30 minutos fueron los tiempos seleccionados. En este caso, de nuevo, los compuestos se detectan en orina a ambos tiempos por debajo del límite de cuantificación pero no se detectan restos ni de la gracilina H ni de la gracilina L en las muestras de sangre o cerebro. La tecnología de espectrometría de masas IT-TOF utilizada para el análisis de las muestras puede realizar la medición de moléculas situadas en el rango de masas entre 50-5000 daltons. Si se produjera una asociación de los compuestos estudiados con proteínas plasmáticas, no podrían ser detectadas con este tipo de equipo. Sin embargo, la presencia de los compuestos en la orina hace pensar que previamente han debido pasar a la sangre para llegar a los riñones y por tanto poder ser detectados en la orina. A continuación, se estudia su efecto en la regulación de la respuesta inmune celular induciendo una DTH en la oreja de ratón. En la DTH la respuesta está principalmente modulada por los linfocitos T y por tanto sirve como modelo *in vivo* para corroborar los resultados obtenidos en los ensayos con linfocitos T [293]. De este modo, al estudiar el efecto de la gracilina H y la gracilina L sobre la oreja de ratón previamente sensibilizada con 1-Fluoro-2,4-dinitrobenceno, se observa que ambos compuestos reducen los síntomas de inflamación aguda como el edema, el exudado y el enrojecimiento de la zona hipersensibilizada de manera similar a la CsA. Además, en cortes histológicos de la oreja realizados a las 24h de la sensibilización se observa una disminución generalizada del infiltrado de células inflamatorias en los animales tratados con la gracilina H y la gracilina L, sobre todo de células T, que a penas son detectables. El efecto observado en los estudios *in vivo* puede deberse a varios eventos. Por un lado, la reducción del Ca^{2+} citosólico y la inhibición de la translocación del NFAT al núcleo, dos factores que pueden explicar la regulación de la producción de IL-2 y por tanto, el efecto *in vivo* sobre la respuesta inmune celular [294]. Por otro lado, la disminución de la expresión del receptor CD147 también daría lugar a la reducción de la activación y a la proliferación de las células inflamatorias al foco de la lesión apoyando los hallazgos observados en los animales. Además, la reducción de la secreción de la Cyp A al medio

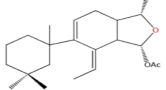
extracelular sería otro hallazgo remarcable relacionado con la disminución de células T al foco de la inflamación y que podría asociarse también con la disminución de las ROS producida por ambos compuestos [123]. Así mismo, la activación de las defensas antioxidantes determinadas en estudios previos no hacen sino dar un valor añadido a éstos compuestos de *Spongionella* pues podrían evitar muchos de los efectos adversos, como la hepatotoxicidad y la neurotoxicidad, mostrada por la CsA al inducir la producción de ROS y procesos de peroxidación lipídica a nivel celular [123, 295]. Con éste estudio corroboramos las propiedades de estos compuestos como posibles moléculas con aplicación en la regulación no sólo de la respuesta inmunitaria, sino de todas las patologías donde las Cyps se vean implicadas.

Las actividades biológicas observadas a partir de los compuestos aislados de *Spongionella* han servido como plantilla para sintetizar y explorar nuevas estructuras químicas. Por una colaboración con el grupo del Dr. Romo de la Universidad de Baylor (Waco, Texas), se ha realizado la retrosíntesis usando los compuestos naturales como punto de partida. Con éste tipo de estudios se puede determinar la estructura química más sencilla necesaria para obtener un efecto biológico comparable a los compuestos de origen natural. Los estudios se han iniciado con la retrosíntesis de la gracilina A, uno de los compuestos que mejores resultados biológicos ha aportado. A partir de ésta molécula natural se han sintetizado 24 derivados. De ellos se han seleccionado 16 por ser los que mostraban alguna actividad biológica, y cuyos efectos se recogen en la Figura 16, ordenados desde la estructura más sencilla hasta la más compleja en el proceso de retrosíntesis. Con todas las moléculas sintetizadas químicamente se realizan estudios de unión a la Cyp A. Los compuestos 23a y 23b muestran una K_D de 2,87 y 2,78 μM de unión a la Cyp A, similar al compuesto natural que es de 2,53 μM . El compuesto 17c tiene una afinidad ligeramente superior, con una K_D de 5,83 μM , mientras que los compuestos 17a y 17d muestran una K_D de 7,57 y 5,34 nM respectivamente. La unión de éstos 5 compuestos a la Cyp A se utiliza como cribado para testar su actividad biológica sobre la liberación de IL-2 en linfocitos T previamente activados. En este caso se observa que a pesar de que los compuestos 17a y 17d tienen una afinidad muy superior a la del compuesto natural, producen una reducción de IL-2 de entorno a un 50%, en comparación de la gracilina A que bloqueó la liberación de IL-

2 en un 71,8%. Para los compuestos 17c y 23a la inhibición fue de un 25%. Todos estos resultados se recogen en la Figura 16.

	K_D (μM)	IL-2 (%)	Viability (%)	Complejidad estructural- Progreso Total de la síntesis- Perfil SAR	K_D (μM)	IL-2 (%)	Viability (%)
	No activo			28	(\pm) -32	No activo	
	No activo			30	25	No activo	
	No activo			(\pm) -27	11	No activo	
	No activo			20	19	No activo	
	2,78 $\pm 0,91$	0 $\pm 1,97$	100 (0,1)	23b	23a	2,87 $\pm 0,35$	25,78 $\pm 2,65$ 99,47 $\pm 0,47$ (0,01)
	No activo			s9	17d	0,00534 $\pm 0,0016$	46, 2 $\pm 1,97$ 100 (0,1)
	0,00757 $\pm 0,00161$	44,09 $\pm 4,42$	91,7 $\pm 9,95$ (0,1)	17a	17a	5,83 $\pm 3,33$	19,78 $\pm 6,63$ 100 (0,1)





Gracilina A (1)

K_D (μM): 2,53 \pm 0,4
 IL-2 (%): 71,80 \pm 11,6
 Viabilidad (%): 100 (1)

Figura 16. Actividad de los derivados de la gracilina A seleccionados como agentes inmunosupresores. Constante de disociación en el equilibrio (K_D) para la unión entre los análogos sintéticos de la gracilina A y la Cyp A (μM), bloqueo de la liberación de IL-2 (%) y ensayos de viabilidad en linfocitos T humanos (%). Las concentraciones de todos los derivados (μM) se indican entre paréntesis.

De estos resultados se puede concluir que las moléculas que muestran mejor afinidad de unión por la Cyp A comparten el esqueleto de la gracilina A y por tanto se corresponde con las estructuras más complejas (Figura 17). Esta estructura es la 5-ciclohexil-1, 3, 3a, 4, 7, 7a- hexahidroisobenzofurano, que denominamos como “esqueleto de tres anillos”, se le atribuye un papel esencial para la interacción con la

proteína. Al mismo tiempo, la presencia de un grupo acetoxi en la posición 3 en los compuestos 17d y 17a mejora la interacción con la Cyp A, ya que ambos compuestos muestran una afinidad mucho mayor que la de los compuestos 23a y 23b, que sólo presentan un grupo acetato en su estructura. Además, la presencia de un doble enlace en el anillo furano, así como el grupo dimetilo geminal resultan esenciales para la unión con la Cyp A. La ausencia del sustituyente etilideno en la estructura de las moléculas parece que mejora la interacción con la Cyp A y aumenta el efecto inhibitorio sobre la liberación de ILs (Figura 17). Es decir, en función de las actividades biológicas mostradas por la molécula natural, se pueden sintetizar compuestos más sencillos con efectos biológicos mejorados (Figura 17).

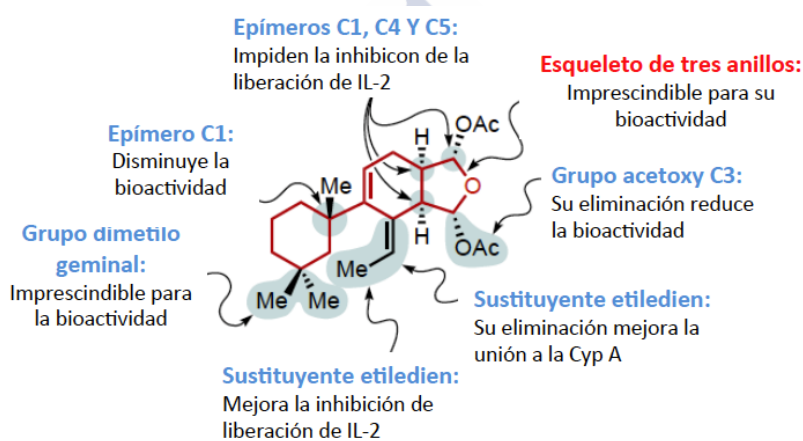


Figura 17. Relación estructura- actividad (SAR) de los análogos desarrollados a partir de la retrosíntesis de la gracilina A. Perfil SAR en ensayos de la modulación del sistema inmune.



5. CONCLUSIONES

- 1.- El péptido autumnalamida bloquea la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC, por un efecto sobre la mitocondria, que inhibe la producción de IL-2.
- 2.- La autumnalamida se une a la Cyp D mitocondrial e induce la apertura del mPTP y a la Cyp A citosólica e inhibe a la CN.
- 3.- Las gracilinas A, H, L y la tetrahidroaplisulfurina-1 bloquean la inhibición del FCCP en la entrada de Ca^{2+} a través de los canales SOC. La gracilina L y la tetrahidroaplisulfurina-1 producen esta inhibición al unirse con la Cyp D.
- 4.- La Cyp A se une con elevada afinidad a la gracilina A y a la tetrahidroaplisulfurina-1, lo cual impide la translocación del NFATc1 al núcleo y la producción de IL-2.
- 5.- Las gracilinas H y L se unen con baja afinidad a la Cyp A, con bloqueo de la actividad enzimática de la CN (gracilina H-Cyp A) o impidiendo la translocación del NFATc1 al núcleo (gracilina L). Ambos compuestos reducen la producción de IL-2.
- 6.- Los compuestos de *Spongionella* reducen la expresión de CD147. Las gracilinas disminuyen la secreción de Cyp A y los análogos A y L impiden la migración de los linfocitos T.
- 7.- En el modelo murino de hipersensibilidad retardada, las gracilinas H y L reducen la inflamación aguda y el infiltrado inflamatorio.
- 8.- La presencia del esqueleto de 3 anillos es imprescindible para que los compuestos de *Spongionella* y sus derivados se unan a la Cyp A y tengan actividad biológica.



6. BIBLIOGRAFÍA

1. Burgess, J.G., *New and emerging analytical techniques for marine biotechnology*. *Curr Opin Biotechnol*, 2012. **23**(1): p. 29-33.
2. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010*. *J Nat Prod*, 2012. **75**(3): p. 311-35.
3. de la Calle, F., *Fármacos de origen marino*. 2007. **58**: p. 141-155.
4. Marcel, J., R. Ebel, and H. Deng, *Diversity of organic structures of marine microbial origin with drug potential*, in *PHYCOTOXINS: Chemistry and Biochemistry*, L.M. Botana and A. Alfonso, Editors. 2015.
5. Gerwick, W.H. and B.S. Moore, *Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology*. *Chem Biol*, 2012. **19**(1): p. 85-98.
6. Weinheimer, A.J. and R.L. Spraggins, *The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate, methyl ester) in the gorgonian Plexaura homomalla chemistry of coelenterates. XV*. *Tetrahedron Lett*, 1969(59): p. 5185-8.
7. Rocha-Santos, T. and A.C. Duarte, *Introduction to the Analysis of Bioactive Compounds in Marine Samples*, in *Analysis of Marine Samples in Search of Bioactive Compounds*. 2014. p. 1-14.
8. Mayer, A.M., et al., *Marine pharmacology in 2009-2011: marine compounds with antibacterial, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action*. *Mar Drugs*, 2013. **11**(7): p. 2510-73.
9. Fenical, W. and P.R. Jensen, *Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria*. *Nat Chem Biol*, 2006. **2**(12): p. 666-73.
10. Mincer, T.J., et al., *Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments*. *Appl Environ Microbiol*, 2002. **68**(10): p. 5005-11.
11. Fukuda, T., et al., *Total synthesis of salinosporamide A*. *Org Lett*, 2008. **10**(19): p. 4239-42.
12. Corey, E.J. and W.D. Li, *Total synthesis and biological activity of lactacystin, omuralide and analogs*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1999. **47**(1): p. 1-10.
13. Feling, R.H., et al., *Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus salinospira*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003. **42**(3): p. 355-7.
14. Potts, B.C., et al., *Marizomib, a proteasome inhibitor for all seasons: preclinical profile and a framework for clinical trials*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011. **11**(3): p. 254-84.

15. Charan, R.D., et al., *Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine Micromonospora sp.* J Nat Prod, 2004. **67**(8): p. 1431-3.
16. Gourdeau, H., et al., *Identification, characterization and potent antitumor activity of ECO-4601, a novel peripheral benzodiazepine receptor ligand.* Cancer Chemother Pharmacol, 2008. **61**(6): p. 911-21.
17. Mason, W.P., et al., *A phase II study of the Ras-MAPK signaling pathway inhibitor TLN-4601 in patients with glioblastoma at first progression.* J Neurooncol, 2012. **107**(2): p. 343-9.
18. Pettit, G.R., et al., *Isolation, structure, and synthesis of combretastatins A-1 and B-1, potent new inhibitors of microtubule assembly, derived from Combretum caffrum.* J Nat Prod, 1987. **50**(1): p. 119-31.
19. Luesch, H., et al., *Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium Symploca species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatin 1.* J Nat Prod, 2001. **64**(7): p. 907-10.
20. Kalemkerian, G.P., et al., *Activity of dolastatin 10 against small-cell lung cancer in vitro and in vivo: induction of apoptosis and bcl-2 modification.* Cancer Chemother Pharmacol, 1999. **43**(6): p. 507-15.
21. Haldar, S., A. Basu, and C.M. Croce, *Serine-70 is one of the critical sites for drug-induced Bcl2 phosphorylation in cancer cells.* Cancer Res, 1998. **58**(8): p. 1609-15.
22. Basu, A. and S. Haldar, *Microtubule-damaging drugs triggered bcl2 phosphorylation-requirement of phosphorylation on both serine-70 and serine-87 residues of bcl2 protein.* Int J Oncol, 1998. **13**(4): p. 659-64.
23. Pitot, H.C., et al., *Phase I trial of dolastatin-10 (NSC 376128) in patients with advanced solid tumors.* Clin Cancer Res, 1999. **5**(3): p. 525-31.
24. Riely, G.J., et al., *A phase 2 study of TZT-1027, administered weekly to patients with advanced non-small cell lung cancer following treatment with platinum-based chemotherapy.* Lung Cancer, 2007. **55**(2): p. 181-5.
25. Martins, A., et al., *Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success.* Mar Drugs, 2014. **12**(2): p. 1066-101.
26. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development.* Mar Drugs, 2014. **12**(1): p. 255-78.
27. Fischbach, M.A. and C.T. Walsh, *Antibiotics for emerging pathogens.* Science, 2009. **325**(5944): p. 1089-93.
28. Bister, B., et al., *Abyssomicin C-A polycyclic antibiotic from a marine Verrucosispora strain as an inhibitor of the p-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway.* Angew Chem Int Ed Engl, 2004. **43**(19): p. 2574-6.

- 29.Riedlinger, J., et al., *Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine Verrucospora strain AB-18-032*. J Antibiot (Tokyo), 2004. **57**(4): p. 271-9.
- 30.Kwon, H.C., et al., *Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus "marinisporea"*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(5): p. 1622-32.
- 31.Jang, K.H., et al., *Anthracimycin, a potent anthrax antibiotic from a marine-derived actinomycete*. Angew Chem Int Ed Engl, 2013. **52**(30): p. 7822-4.
- 32.Hensler, M.E., et al., *Anthracimycin activity against contemporary methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Antibiot (Tokyo), 2014. **67**(8): p. 549-53.
- 33.Burja, A.M., et al., *Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products*. Tetrahedron, 2001. **57**(46): p. 9347-9377.
- 34.Catherine, Q., et al., *A review of current knowledge on toxic benthic freshwater cyanobacteria--ecology, toxin production and risk management*. Water Res, 2013. **47**(15): p. 5464-79.
- 35.Teneva, I., et al., *Toxic potential of five freshwater Phormidium species (Cyanoprokaryota)*. Toxicon, 2005. **45**(6): p. 711-25.
- 36.Sanchez, J.A., et al., *Detection of anatoxin-a and three analogs in Anabaena spp. cultures: new fluorescence polarization assay and toxin profile by LC-MS/MS*. Toxins (Basel), 2014. **6**(2): p. 402-15.
- 37.Vasconcelos, V., P. Leão, and A. Campos, *Cyanobacterial toxins*, in *PHICOTOXINS Chemistry and Biochemistry*, L.M. Botana and A. Alfonso, Editors. 2015, WILEY Blackwell: UK. p. 225-238.
- 38.Elster, J., J. Komárek, and O. Strunecký, *Biogeography of Phormidium autumnale (Oscillatoriales, Cyanobacteria) in western and central Spitsbergen*. Polish Polar Research, 2012. **33**(4): p. 369–382.
- 39.Canizares-Villanueva, R.O., et al., *Growth of Phormidium sp. in aerobic secondary piggery waste-water*. Appl Microbiol Biotechnol, 1994. **42**(2-3): p. 487-91.
- 40.Kumar, M.S., G. Muralitharan, and N. Thajuddin, *Screening of a hypersaline cyanobacterium, Phormidium tenue, for the degradation of aromatic hydrocarbons: naphthalene and anthracene*. Biotechnol Lett, 2009. **31**(12): p. 1863-6.
- 41.Biondi, N., et al., *Cyanobacteria from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactivities*. J Appl Microbiol, 2008. **105**(1): p. 105-15.
- 42.Rodriguez-Meizoso, I., et al., *Pressurized fluid extraction of bioactive compounds from Phormidium species*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(10): p. 3517-23.

43. Papendorf, O., G.M. König, and A.D. Wright, *Hierridin B and 2,4-dimethoxy-6-heptadecyl-phenol, secondary metabolites from the cyanobacterium Phormidium ectocarpus with antiplasmodial activity*. *Phytochemistry*, 1998. **49**(8): p. 2383-6.
44. Murador, D.C., A.Z. Mercadante, and V.V. de Rosso, *Cooking techniques improve the levels of bioactive compounds and antioxidant activity in kale and red cabbage*. *Food Chem*, 2016. **196**: p. 1101-7.
45. Alonso, E. and J. Rubiolo, *Therapeutics of marine toxins*, in *PHYCOTOXINS Chemistry and Biochemistry*, L.M. Botana and A. Alfonso, Editors. 2015, Wiley Blackwell: UK. p. 181-202.
46. Noguchi, T. and O. Arakawa, *Tetrodotoxin--distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication*. *Mar Drugs*, 2008. **6**(2): p. 220-42.
47. Yooko, A., *Chemical studies on pufferfish toxin (3)- Separation of spheroidine*. *Nippon Kagaku Zasshi*, 1950. **71**: p. 590-592.
48. Kodama, M., et al., *Occurrence of tetrodotoxin in Alexandrium tamarense, a causative dinoflagellate of paralytic shellfish poisoning*. *Toxicon*, 1996. **34**(10): p. 1101-5.
49. Bane, V., et al., *Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection*. *Toxins (Basel)*, 2014. **6**(2): p. 693-755.
50. Jal, S. and S.S. Khora, *An overview on the origin and production of tetrodotoxin, a potent neurotoxin*. *J Appl Microbiol*, 2015. **119**(4): p. 907-16.
51. Narahashi, T., *Chemicals as tools in the study of excitable membranes*. *Physiol Rev*, 1974. **54**(4): p. 813-89.
52. Roy, M.L. and T. Narahashi, *Differential properties of tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels in rat dorsal root ganglion neurons*. *J Neurosci*, 1992. **12**(6): p. 2104-11.
53. Wood, J.N., et al., *Voltage-gated sodium channels and pain pathways*. *J Neurobiol*, 2004. **61**(1): p. 55-71.
54. Yasumoto, T., Y. Oshima, and M. Yamaguchi, *Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district*. *Nippon suisan gakkaiishi*, 1978. **44**(11): p. 1249-1255.
55. Murata, M., et al., *Isolation and Structural Elucidation of the Causative Toxin of the Diarrhetic Shellfish Poisoning*. *Nippon suisan gakkaiishi*, 1982. **48**(4): p. 549-552.
56. Rubiolo, J.A., et al., *Bioengineered protein phosphatase 2A: update on need*. *Bioengineered*, 2013. **4**(2): p. 72-7.
57. Cohen, P., C.F. Holmes, and Y. Tsukitani, *Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation*. *Trends Biochem Sci*, 1990. **15**(3): p. 98-102.

58. Bialojan, C. and A. Takai, *Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics*. Biochem J, 1988. **256**(1): p. 283-90.
59. Kamat, P.K., S. Rai, and C. Nath, *Okadaic acid induced neurotoxicity: an emerging tool to study Alzheimer's disease pathology*. Neurotoxicology, 2013. **37**: p. 163-72.
60. Cembella, A.D., N.I. Lewis, and M.A. Quilliam, *Spirolide composition of micro-extracted pooled cells isolated from natural plankton assemblages and from cultures of the dinoflagellate Alexandrium ostenfeldii*. Nat Toxins, 1999. **7**(5): p. 197-206.
61. Bourne, Y., et al., *Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(13): p. 6076-81.
62. Otero, P., et al., *First direct fluorescence polarization assay for the detection and quantification of spirolides in mussel samples*. Anal Chim Acta, 2011. **701**(2): p. 200-8.
63. Wandscheer, C.B., et al., *Human muscarinic acetylcholine receptors are a target of the marine toxin 13-desmethyl C spirolide*. Chem Res Toxicol, 2010. **23**(11): p. 1753-61.
64. Crews, L. and E. Masliah, *Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(R1): p. R12-20.
65. Alonso, E., et al., *13-Desmethyl spirolide-C is neuroprotective and reduces intracellular Abeta and hyperphosphorylated tau in vitro*. Neurochem Int, 2011. **59**(7): p. 1056-65.
66. Alonso, E., et al., *Benefit of 13-desmethyl spirolide C treatment in triple transgenic mouse model of Alzheimer disease: beta-amyloid and neuronal markers improvement*. Curr Alzheimer Res, 2013. **10**(3): p. 279-89.
67. Botana, L.M., E. Alonso, and C. Vale, *Use of a spirolide, analogues and derivatives for treating and/or preventing pathological conditions linked to the tau and beta-amyloid proteins.*, in Google patents 2010.
68. Satake, M., L. MacKenzie, and T. Yasumoto, *Identification of Protoceratium reticulatum as the biogenetic origin of yessotoxin*. Nat Toxins, 1997. **5**(4): p. 164-7.
69. Draisci, R., et al., *High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea*. Toxicon, 1999. **37**(8): p. 1187-93.
70. Mori, Y., et al., *Sulfonyl-stabilized oxiranyllithium-based approach to polycyclic ethers. Convergent synthesis of the ABCDEF-ring system of yessotoxin and adriatoxin*. J Org Chem, 2003. **68**(23): p. 9050-60.
71. Murata, M., et al., *Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning*. Tetrahedron, 1987. **28**: p. 5869-5872.

- 72.Ogino, H., M. Kumagai, and T. Yasumoto, *Toxicologic evaluation of yessotoxin*. *Nat Toxins*, 1997. **5**(6): p. 255-9.
- 73.Tubaro, A., et al., *Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice*. *Toxicon*, 2003. **41**(7): p. 783-92.
- 74.Alfonso, A., et al., *Yessotoxin, a novel phycotoxin, activates phosphodiesterase activity. Effect of yessotoxin on cAMP levels in human lymphocytes*. *Biochem Pharmacol*, 2003. **65**(2): p. 193-208.
- 75.Alfonso, A., M.R. Vieytes, and L.M. Botana, *Yessotoxin, a Promising Therapeutic Tool*. *Mar Drugs*, 2016. **14**(2).
- 76.Fernandez-Araujo, A., et al., *Different toxic effects of YTX in tumor K-562 and lymphoblastoid cell lines*. *Front Pharmacol*, 2015. **6**: p. 124.
- 77.Rubiolo, J.A., et al., *Yessotoxin Induces Er-Stress Followed By Autophagic Cell Death In Glioma Cells Mediated By mTOR and BNIP3*. *Cell Signal*, 2013.
- 78.Rubiolo, J.A., et al., *Yessotoxin induces ER-stress followed by autophagic cell death in glioma cells mediated by mTOR and BNIP3*. *Cell Signal*, 2014. **26**(2): p. 419-32.
- 79.Botana, L.M. and J.A. Rubiolo, *Uso de la yessotoxina y sus derivados para el tratamiento de gliomas.*, 2012.
- 80.Sasaki, M., E. Cagide, and C. Louzao, *Gambierol*, in *Phycotoxins chemistry and biochemistry*, L.M. Botana, Editor. 2007, Blackwell: Iowa.
- 81.Fuwa, H., et al., *Total synthesis of (-)-gambierol*. *J Am Chem Soc*, 2002. **124**(50): p. 14983-92.
82. Fuwa, H., et al., *Total synthesis of gambierol*. *Org Lett*, 2002. **4**(17): p. 2981-4.
- 83.Johnson, H.W., U. Majumder, and J.D. Rainier, *The total synthesis of gambierol*. *J Am Chem Soc*, 2005. **127**(3): p. 848-9.
- 84.Johnson, H.W., U. Majumder, and J.D. Rainier, *Total synthesis of gambierol: subunit coupling and completion*. *Chemistry*, 2006. **12**(6): p. 1747-53.
- 85.Inoue, M., et al., *Inhibition of brevetoxin binding to the voltage-gated sodium channel by gambierol and gambieric acid-A*. *Toxicon*, 2003. **41**(4): p. 469-74.
- 86.Louzao, M.C., et al., *The sodium channel of human excitable cells is a target for gambierol*. *Cell Physiol Biochem*, 2006. **17**(5-6): p. 257-68.
- 87.Ghiaroni, V., et al., *Inhibition of voltage-gated potassium currents by gambierol in mouse taste cells*. *Toxicol Sci*, 2005. **85**(1): p. 657-65.

- 88.Kopljar, I., et al., *A polyether biotoxin binding site on the lipid-exposed face of the pore domain of Kv channels revealed by the marine toxin gambierol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(24): p. 9896-901.
- 89.Alonso, E., et al., *Design and synthesis of skeletal analogues of gambierol: attenuation of amyloid-beta and tau pathology with voltage-gated potassium channel and N-methyl-D-aspartate receptor implications*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(17): p. 7467-79.
- 90.Beeton, C., et al., *Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17414-9.
- 91.Demain, A.L. and R.P. Elander, *The beta-lactam antibiotics: past, present, and future*. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999. **75**(1-2): p. 5-19.
- 92.Kanoh, K., et al., *(-)-Phenylahistin: A new mammalian cell cycle inhibitor produced by aspergillus ustus*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1997. **7**(22): p. 2847-2852.
- 93.Fenical, W., P.R. Jensen, and X.C. Cheng, *Halimide, a cytotoxic marine natural product, and derivatives thereof*, 2000, Google Patents.
- 94.Nicholson, B., et al., *NPI-2358 is a tubulin-depolymerizing agent: in-vitro evidence for activity as a tumor vascular-disrupting agent*. Anticancer Drugs, 2006. **17**(1): p. 25-31.
- 95.Yamazaki, Y., et al., *Tubulin photoaffinity labeling with biotin-tagged derivatives of potent diketopiperazine antimicrotubule agents*. Chembiochem, 2008. **9**(18): p. 3074-81.
- 96.Alonso, D., et al., *Drugs from the sea: conotoxins as drug leads for neuropathic pain and other neurological conditions*. Mini Rev Med Chem, 2003. **3**(7): p. 785-7.
- 97.Livett, B.G., K.R. Gayler, and Z. Khalil, *Drugs from the sea: conopeptides as potential therapeutics*. Curr Med Chem, 2004. **11**(13): p. 1715-23.
- 98.Akondi, K.B., et al., *Discovery, synthesis, and structure-activity relationships of conotoxins*. Chem Rev, 2014. **114**(11): p. 5815-47.
- 99.Olivera, B.M., et al., *Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using omega-conotoxin from Conus magus venom*. Biochemistry, 1987. **26**(8): p. 2086-90.
- 100.McGivern, J.G., *Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain*. Neuropsychiatr Dis Treat, 2007. **3**(1): p. 69-85.
- 101.Thomas, T.R., D.P. Kavlekar, and P.A. LokaBharathi, *Marine drugs from sponge-microbe association--a review*. Mar Drugs, 2010. **8**(4): p. 1417-68.
102. Hirata, Y. and D. Uemura, *Halichondrins—antitumor polyether macrolides*

from a marine sponge. Pure & Appl. Chem., 1986. **58**(5): p. 701-710.

103. Yu, M., B. Littlefield, and Y. Kishi, *Discovery of E7389, a Fully Synthetic Macrocyclic Ketone Analog of Halichondrin B.*, in *Anticancer agents from natural products.*, G.M. Cragg, D.G.I. Kingston, and D.J. Newman, Editors. 2005, CRC Press.

104. Wozniak, K.M., et al., *Neuropathy-inducing effects of eribulin mesylate versus paclitaxel in mice with preexisting neuropathy.* Neurotox Res, 2013. **24**(3): p. 338-44.

105. Huyck, T.K., et al., *Eribulin mesylate.* Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(3): p. 173-4.

106. Towle, M.J., et al., *In vitro and in vivo anticancer activities of synthetic macrocyclic ketone analogues of halichondrin B.* Cancer Res, 2001. **61**(3): p. 1013-21.

107. Kuznetsov, G., et al., *Induction of morphological and biochemical apoptosis following prolonged mitotic blockage by halichondrin B macrocyclic ketone analog E7389.* Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5760-6.

108. Swami, U., et al., *Eribulin -- a review of preclinical and clinical studies.* Crit Rev Oncol Hematol, 2012. **81**(2): p. 163-84.

109. Bergmann, W. and R.J. Feeney, *CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF MARINE PRODUCTS. XXXII. THE NUCLEOSIDES OF SPONGES. I.1.* J. Org. Chem., 1951. **16**(6): p. 981-987.

110. Walwick, E.A., C.A. Dekker, and W.K. Roberts, *Cyclization during the Phosphorylation of Uridine and Cytidine by Polyphosphoric Acid- A new Route to the 0-2-2' Cyclonucleosides.* Proceedings of the Chemical Society, 1959. **84**.

111. Newman, D.J., G.M. Cragg, and K.M. Snader, *The influence of natural products upon drug discovery.* Nat Prod Rep, 2000. **17**(3): p. 215-34.

112. Peters, W.G., L.P. Colly, and R. Willemze, *High-dose cytosine arabinoside: pharmacological and clinical aspects.* Blut, 1988. **56**(1): p. 1-11.

113. Godefridus, J.P., *Deoxynucleoside Analogs in Cancer Therapy.* 2007, New York: HUMANA PRESS.

114. Dias, D.A., S. Urban, and U. Roessner, *A historical overview of natural products in drug discovery.* Metabolites, 2012. **2**(2): p. 303-36.

115. Aswell, J.F., et al., *Antiviral activity of arabinosylthymine in herpesviral replication: mechanism of action in vivo and in vitro.* Antimicrob Agents Chemother, 1977. **12**(2): p. 243-54.

116. Miller, R.L., J.P. Iltis, and F. Rapp, *Differential effect of arabinofuranosylthymine of the replication of human herpesviruses.* J Virol, 1977. **23**(3): p. 679-84.

117. Mayer, A.M., et al., *The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective.* Trends Pharmacol Sci, 2010. **31**(6): p. 255-65.

- 118.Schwartz, P.M., C. Shipman, Jr., and J.C. Drach, *Antiviral activity of arabinosyladenine and arabinosylhypoxanthine in herpes simplex virus-infected KB cells: selective inhibition of viral deoxyribonucleic acid synthesis in the presence of an adenosine deaminase inhibitor*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1976. **10**(1): p. 64-74.
- 119.Utagawa, T., et al., *A novel and simple method for the preparation of adenine arabinoside by bacterial transglycosylation reaction*. *FEBS Lett*, 1980. **109**(2): p. 261-3.
- 120.Rateb, M.E., et al., *Bioactive diterpene derivatives from the marine sponge Spongionella sp.* *J Nat Prod*, 2009. **72**(8): p. 1471-6.
- 121.Mayol, L., V. Piccialli, and D. Sica, *Gracilin A, an unique nor-diterpene metabolite from the marine sponge Spongionella gracilis*. *Tetrahedron Letters*, 1985. **26**(10): p. 1357-1360.
- 122.Nirmal, N., G.O. Praba, and D. Velmurugan, *Modeling studies on phospholipase A2-inhibitor complexes*. *Indian J Biochem Biophys*, 2008. **45**(4): p. 256-62.
- 123.Leiros, M., et al., *Spongionella secondary metabolites protect mitochondrial function in cortical neurons against oxidative stress*. *Mar Drugs*, 2014. **12**(2): p. 700-18.
- 124.Leiros, M., et al., *Gracilins: Spongionella-derived promising compounds for Alzheimer disease*. *Neuropharmacology*, 2015. **93**: p. 285-93.
- 125.Sierro, N., et al., *DBTGR: a database of tunicate promoters and their regulatory elements*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(Database issue): p. D552-5.
- 126.Cuevas, C. and A. Francesch, *Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem*. *Nat Prod Rep*, 2009. **26**(3): p. 322-37.
- 127.Rinehart, K., et al., *Ecteinascidins 729,743, 745, 759A, 759B, and 770: potent antitumor agents from the Caribbean tunicate Ecteinascidia turbinata*. *J. Org. Chem.*, 1990. **55**: p. 4512-4515.
- 128.Wright, A.D., et al., *Antitumor tetrahydroisoquinoline alkaloids from the colonial ascidian Ecteinascidia turbinata*. *J. Org. Chem.*, 1990. **55**: p. 4508-4512.
- 129.Rinehart, K.L., et al., *Bioactive compounds from aquatic and terrestrial sources*. *J Nat Prod*, 1990. **53**(4): p. 771-92.
- 130.Hurley, L.H. and M. Zewail-Foote, *The antitumor agent ecteinascidin 743: characterization of its covalent DNA adducts and chemical stability*. *Adv Exp Med Biol*, 2001. **500**: p. 289-99.
- 131.D'Incalci, M. and C.M. Galmarini, *A review of trabectedin (ET-743): a unique mechanism of action*. *Mol Cancer Ther*, 2010. **9**(8): p. 2157-63.

- 132.Masso-Silva, J.A. and G. Diamond, *Antimicrobial peptides from fish*. Pharmaceuticals (Basel), 2014. **7**(3): p. 265-310.
- 133.Kang, H.K., C.H. Seo, and Y. Park, *Marine peptides and their anti-infective activities*. Mar Drugs, 2015. **13**(1): p. 618-54.
- 134.Gui, L., et al., *Two hepcidins from spotted scat (Scatophagus argus) possess antibacterial and antiviral functions in vitro*. Fish Shellfish Immunol, 2016. **50**: p. 191-9.
- 135.Bang, H.O., J. Dyerberg, and A.B. Nielsen, *Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos*. Lancet, 1971. **1**(7710): p. 1143-5.
- 136.Whelton, S.P., et al., *Meta-analysis of observational studies on fish intake and coronary heart disease*. Am J Cardiol, 2004. **93**(9): p. 1119-23.
- 137.He, K., et al., *Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies*. Circulation, 2004. **109**(22): p. 2705-11.
- 138.Koski, R.R., *Omega-3-acid Ethyl Esters (Lovaza) For Severe Hypertriglyceridemia*. Journal List, 2008. **33**(5): p. 271-303.
- 139.Rupp, H., *Omacor (prescription omega-3-acid ethyl esters 90): From severe rhythm disorders to hypertriglyceridemia*. Adv Ther, 2009. **26**(7): p. 675-90.
- 140.Chin, Y.W., et al., *Drug discovery from natural sources*. AAPS J, 2006. **8**(2): p. E239-53.
- 141.Lahlou, M., *The Success of Natural Products in Drug Discovery*. Pharmacology & Pharmacy, 2013(4): p. 17-31.
- 142.Uings, I.J. and S.N. Farrow, *Cell receptors and cell signalling*. Mol Pathol, 2000. **53**(6): p. 295-9.
- 143.Jordan, J.D., E.M. Landau, and R. Iyengar, *Signaling networks: the origins of cellular multitasking*. Cell, 2000. **103**(2): p. 193-200.
- 144.Parekh, A.B. and J.W. Putney, Jr., *Store-operated calcium channels*. Physiol Rev, 2005. **85**(2): p. 757-810.
- 145.Bootman, M.D., et al., *Calcium signalling--an overview*. Semin Cell Dev Biol, 2001. **12**(1): p. 3-10.
- 146.Orrenius, S., V. Gogvadze, and B. Zhivotovsky, *Calcium and mitochondria in the regulation of cell death*. Biochem Biophys Res Commun, 2015. **460**(1): p. 72-81.
- 147.de Souza, L.B. and I.S. Ambudkar, *Trafficking mechanisms and regulation of TRPC channels*. Cell Calcium, 2014. **56**(2): p. 43-50.

148. Collins, S.R. and T. Meyer, *Evolutionary origins of STIM1 and STIM2 within ancient Ca²⁺ signaling systems*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(4): p. 202-11.
149. Clapham, D.E., *Calcium signaling*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1047-58.
150. Wadel, K., E. Neher, and T. Sakaba, *The coupling between synaptic vesicles and Ca²⁺ channels determines fast neurotransmitter release*. Neuron, 2007. **53**(4): p. 563-75.
151. Catterall, W.A., *Voltage-gated calcium channels*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(8): p. a003947.
152. Catterall, W.A., *Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 521-55.
153. Fucile, S., *Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors*. Cell Calcium, 2004. **35**(1): p. 1-8.
154. Fan, X., W.Y. Jin, and Y.T. Wang, *The NMDA receptor complex: a multifunctional machine at the glutamatergic synapse*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 160.
155. Kaupp, U.B. and R. Seifert, *Cyclic nucleotide-gated ion channels*. Physiol Rev, 2002. **82**(3): p. 769-824.
156. Locke, E.G., et al., *A homolog of voltage-gated Ca(2+) channels stimulated by depletion of secretory Ca(2+) in yeast*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(18): p. 6686-94.
157. Partiseti, M., et al., *The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32327-35.
158. Berridge, M.J., et al., *Inositol trisphosphate formation and calcium mobilization in Swiss 3T3 cells in response to platelet-derived growth factor*. Biochem J, 1984. **222**(1): p. 195-201.
159. Gardner, P., et al., *Triggering of T-lymphocytes via either T3-Ti or T11 surface structures opens a voltage-insensitive plasma membrane calcium-permeable channel: requirement for interleukin-2 gene function*. J Biol Chem, 1989. **264**(2): p. 1068-76.
160. Putney, J.W., Jr., *A model for receptor-regulated calcium entry*. Cell Calcium, 1986. **7**(1): p. 1-12.
161. Takemura, H., et al., *Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane*. J Biol Chem, 1989. **264**(21): p. 12266-71.
162. Thastrup, O., et al., *Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage*. Agents Actions, 1989. **27**(1-2): p. 17-23.

163. Parekh, A.B., *Mitochondrial regulation of store-operated CRAC channels*. Cell Calcium, 2008. **44**(1): p. 6-13.
164. Liou, J., et al., *STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx*. Curr Biol, 2005. **15**(13): p. 1235-41.
165. Roos, J., et al., *STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function*. J Cell Biol, 2005. **169**(3): p. 435-45.
166. Yeromin, A.V., et al., *Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai*. Nature, 2006. **443**(7108): p. 226-9.
167. Prakriya, M., et al., *Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel*. Nature, 2006. **443**(7108): p. 230-3.
168. Li, Z., et al., *Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activation*. J Biol Chem, 2007. **282**(40): p. 29448-56.
169. Navarro-Borelly, L., et al., *STIM1-Orai1 interactions and Orai1 conformational changes revealed by live-cell FRET microscopy*. J Physiol, 2008. **586**(Pt 22): p. 5383-401.
170. Chen, Y.F., et al., *Remodeling of calcium signaling in tumor progression*. J Biomed Sci, 2013. **20**: p. 23.
171. Zhang, S.L., et al., *STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane*. Nature, 2005. **437**(7060): p. 902-5.
172. Soboloff, J., et al., *STIM proteins: dynamic calcium signal transducers*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(9): p. 549-65.
173. Luik, R.M., et al., *Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 538-42.
174. Shim, A.H., L. Tirado-Lee, and M. Prakriya, *Structural and functional mechanisms of CRAC channel regulation*. J Mol Biol, 2015. **427**(1): p. 77-93.
175. Demaurex, N., D. Poburko, and M. Frieden, *Regulation of plasma membrane calcium fluxes by mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(11): p. 1383-94.
176. Tornero, D., et al., *[The role of the mitochondrial permeability transition pore in neurodegenerative processes]*. Rev Neurol, 2002. **35**(4): p. 354-61.
177. Giorgi, C., et al., *Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine*. Mitochondrion, 2012. **12**(1): p. 77-85.
178. Elrod, J.W. and J.D. Molkenin, *Physiologic functions of cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition pore*. Circ J, 2013. **77**(5): p. 1111-22.

- 179.Korge, P., et al., *Protective role of transient pore openings in calcium handling by cardiac mitochondria*. J Biol Chem, 2011. **286**(40): p. 34851-7.
- 180.Baines, C.P., et al., *Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death*. Nature, 2005. **434**(7033): p. 658-62.
- 181.Du, H., et al., *Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease*. Nat Med, 2008. **14**(10): p. 1097-105.
- 182.Rasola, A. and P. Bernardi, *Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis*. Cell Calcium, 2011. **50**(3): p. 222-33.
- 183.Galluzzi, L., et al., *Mitochondrial control of cellular life, stress, and death*. Circ Res, 2012. **111**(9): p. 1198-207.
- 184.Brookes, P.S., et al., *Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(4): p. C817-33.
- 185.Bakowski, D. and A.B. Parekh, *Monovalent cation permeability and Ca(2+) block of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC) in rat basophilic leukemia cells*. Pflugers Arch, 2002. **443**(5-6): p. 892-902.
- 186.Gilabert, J.A. and A.B. Parekh, *Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC)*. EMBO J, 2000. **19**(23): p. 6401-7.
- 187.Hoth, M., D.C. Button, and R.S. Lewis, *Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10607-12.
- 188.Seppet, E., et al., *Mitochondria and energetic depression in cell pathophysiology*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(5): p. 2252-303.
- 189.Taylor, C.W. and S.C. Tovey, *IP(3) receptors: toward understanding their activation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(12): p. a004010.
- 190.Lanner, J.T., et al., *Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(11): p. a003996.
- 191.Gouaux, E. and R. Mackinnon, *Principles of selective ion transport in channels and pumps*. Science, 2005. **310**(5753): p. 1461-5.
- 192.Hilgemann, D.W., et al., *Molecular control of cardiac sodium homeostasis in health and disease*. J Cardiovasc Electrophysiol, 2006. **17 Suppl 1**: p. S47-S56.
- 193.Borel, J.F., et al., *Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent*. Agents Actions, 1976. **6**(4): p. 468-75.

194. Granelli-Piperno, A., *In situ hybridization for interleukin 2 and interleukin 2 receptor mRNA in T cells activated in the presence or absence of cyclosporin A*. J Exp Med, 1988. **168**(5): p. 1649-58.
195. Herold, K.C., et al., *Immunosuppressive effects of cyclosporin A on cloned T cells*. J Immunol, 1986. **136**(4): p. 1315-21.
196. Kronke, M., et al., *Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(16): p. 5214-8.
197. Toyama-Sorimachi, N. and S. Koyasu, *[Regulatory mechanisms of NK cell functions]*. Nihon Rinsho, 1999. **57**(2): p. 304-9.
198. Fischer, G., et al., *Conformational specificity of chymotrypsin toward proline-containing substrates*. Biochim Biophys Acta, 1984. **791**(1): p. 87-97.
199. Handschumacher, R.E., et al., *Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A*. Science, 1984. **226**(4674): p. 544-7.
200. Fischer, G., et al., *Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins*. Nature, 1989. **337**(6206): p. 476-8.
201. Kumari, S., et al., *Cyclophilins: proteins in search of function*. Plant Signal Behav, 2013. **8**(1): p. e22734.
202. Wang, P. and J. Heitman, *The cyclophilins*. Genome Biol, 2005. **6**(7): p. 226.
203. Lee, J. and S.S. Kim, *An overview of cyclophilins in human cancers*. J Int Med Res, 2010. **38**(5): p. 1561-74.
204. Naoumov, N.V., *Cyclophilin inhibition as potential therapy for liver diseases*. J Hepatol, 2014. **61**(5): p. 1166-74.
205. Davis, T.L., et al., *Structural and biochemical characterization of the human cyclophilin family of peptidyl-prolyl isomerases*. PLoS Biol, 2010. **8**(7): p. e1000439.
206. Rodriguez, A., et al., *A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants*. Mol Cell, 2009. **33**(5): p. 616-26.
207. Nigro, P., G. Pompilio, and M.C. Capogrossi, *Cyclophilin A: a key player for human disease*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e888.
208. Kajitani, K., et al., *Crystal structure of human cyclophilin D in complex with its inhibitor, cyclosporin A at 0.96-Å resolution*. Proteins, 2008. **70**(4): p. 1635-9.
209. Javadov, S. and A. Kuznetsov, *Mitochondrial permeability transition and cell death: the role of cyclophilin d*. Front Physiol, 2013. **4**: p. 76.

210. Gutierrez-Aguilar, M. and C.P. Baines, *Structural mechanisms of cyclophilin D-dependent control of the mitochondrial permeability transition pore*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1850**(10): p. 2041-7.
211. Sherry, B., et al., *Identification of cyclophilin as a proinflammatory secretory product of lipopolysaccharide-activated macrophages*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(8): p. 3511-5.
212. Xu, Q., et al., *Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(17): p. 11968-71.
213. Jin, Z.G., et al., *Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress*. *Circ Res*, 2000. **87**(9): p. 789-96.
214. Yurchenko, V., et al., *Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics*. *Clin Exp Immunol*, 2010. **160**(3): p. 305-17.
215. Dornan, J., P. Taylor, and M.D. Walkinshaw, *Structures of immunophilins and their ligand complexes*. *Curr Top Med Chem*, 2003. **3**(12): p. 1392-409.
216. Kallen, J., et al., *Structure of human cyclophilin and its binding site for cyclosporin A determined by X-ray crystallography and NMR spectroscopy*. *Nature*, 1991. **353**(6341): p. 276-9.
217. Jin, L. and S.C. Harrison, *Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(21): p. 13522-6.
218. Wang, J.H. and R. Desai, *A brain protein and its effect on the Ca²⁺-and protein modulator-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976. **72**(3): p. 926-32.
219. Stewart, A.A., et al., *Discovery of a Ca²⁺- and calmodulin-dependent protein phosphatase: probable identity with calcineurin (CaM-BP80)*. *FEBS Lett*, 1982. **137**(1): p. 80-4.
220. Kincaid, R.L., et al., *Differential expression of calmodulin-binding proteins in B, T lymphocytes and thymocytes*. *Nature*, 1987. **330**(6144): p. 176-8.
221. Hemenway, C.S. and J. Heitman, *Calcineurin. Structure, function, and inhibition*. *Cell Biochem Biophys*, 1999. **30**(1): p. 115-51.
222. Liu, J.O., *Calmodulin-dependent phosphatase, kinases, and transcriptional corepressors involved in T-cell activation*. *Immunol Rev*, 2009. **228**(1): p. 184-98.
223. Muramatsu, T., et al., *Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(2): p. 529-33.

224. Muramatsu, T. and R.L. Kincaid, *Molecular cloning and chromosomal mapping of the human gene for the testis-specific catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A)*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992. **188**(1): p. 265-71.
225. Klee, C.B., H. Ren, and X. Wang, *Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(22): p. 13367-70.
226. Shou, J., et al., *Nuclear factor of activated T cells in cancer development and treatment*. *Cancer Lett*, 2015. **361**(2): p. 174-84.
227. Li, H., A. Rao, and P.G. Hogan, *Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins*. *Trends Cell Biol*, 2011. **21**(2): p. 91-103.
228. Shaw, J.P., et al., *Identification of a putative regulator of early T cell activation genes*. *Science*, 1988. **241**(4862): p. 202-5.
229. Negishi-Koga, T. and H. Takayanagi, *Ca²⁺-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation*. *Immunol Rev*, 2009. **231**(1): p. 241-56.
230. Horsley, V., et al., *NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells*. *Cell*, 2008. **132**(2): p. 299-310.
231. Hogan, P.G., et al., *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT*. *Genes Dev*, 2003. **17**(18): p. 2205-32.
232. Graef, I.A., et al., *Evolutionary relationships among Rel domains indicate functional diversification by recombination*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(10): p. 5740-5.
233. Lopez-Rodriguez, C., et al., *NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(13): p. 7214-9.
234. Beals, C.R., et al., *Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction*. *Genes Dev*, 1997. **11**(7): p. 824-34.
235. Okamura, H., et al., *Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity*. *Mol Cell*, 2000. **6**(3): p. 539-50.
236. Walsh, C.T., L.D. Zydowsky, and F.D. McKeon, *Cyclosporin A, the cyclophilin class of peptidylprolyl isomerases, and blockade of T cell signal transduction*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(19): p. 13115-8.
237. Kiani, A., et al., *Expression and regulation of NFAT (nuclear factors of activated T cells) in human CD34+ cells: down-regulation upon myeloid differentiation*. *J Leukoc Biol*, 2004. **76**(5): p. 1057-65.
238. Crabtree, G.R. and S.L. Schreiber, *SnapShot: Ca²⁺-calcineurin-NFAT signaling*. *Cell*, 2009. **138**(1): p. 210, 210 e1.

239. Huai, Q., et al., *Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12037-42.
240. Ivery, M.T., *Immunophilins: switched on protein binding domains?* Med Res Rev, 2000. **20**(6): p. 452-84.
241. Steinmann, B., P. Bruckner, and A. Superti-Furga, *Cyclosporin A slows collagen triple-helix formation in vivo: indirect evidence for a physiologic role of peptidyl-prolyl cis-trans-isomerase*. J Biol Chem, 1991. **266**(2): p. 1299-303.
242. Lodish, H.F. and N. Kong, *Cyclosporin A inhibits an initial step in folding of transferrin within the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 1991. **266**(23): p. 14835-8.
243. Huang, T., et al., *Phosphorylation-dependent interaction of the asialoglycoprotein receptor with molecular chaperones*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37798-803.
244. Shiraishi, S., et al., *Post-translational reduction of cell surface expression of insulin receptors by cyclosporin A, FK506 and rapamycin in bovine adrenal chromaffin cells*. Neurosci Lett, 2000. **293**(3): p. 211-5.
245. Chklovskaya, E., et al., *Cell-surface trafficking and release of flt3 ligand from T lymphocytes is induced by common cytokine receptor gamma-chain signaling and inhibited by cyclosporin A*. Blood, 2001. **97**(4): p. 1027-34.
246. Yurchenko, V., et al., *Active site residues of cyclophilin A are crucial for its signaling activity via CD147*. J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22959-65.
247. Yurchenko, V., et al., *Regulation of CD147 cell surface expression: involvement of the proline residue in the CD147 transmembrane domain*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17013-9.
248. Spik, G., et al., *A novel secreted cyclophilin-like protein (SCYLP)*. J Biol Chem, 1991. **266**(17): p. 10735-8.
249. Yurchenko, V., et al., *CD147 is a signaling receptor for cyclophilin B*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(4): p. 786-8.
250. Agrawal, S.M. and V.W. Yong, *The many faces of EMMPRIN - roles in neuroinflammation*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(2): p. 213-9.
251. DeCastro, R., et al., *Human keratinocytes express EMMPRIN, an extracellular matrix metalloproteinase inducer*. J Invest Dermatol, 1996. **106**(6): p. 1260-5.
252. Zhu, P., et al., *Expression of CD147 on monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis: its potential role in monocyte accumulation and matrix metalloproteinase production*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(5): p. R1023-33.
253. Zhu, X., et al., *CD147: a novel modulator of inflammatory and immune disorders*. Curr Med Chem, 2014. **21**(19): p. 2138-45.

- 254.Damsker, J.M., M.I. Bukrinsky, and S.L. Constant, *Preferential chemotaxis of activated human CD4+ T cells by extracellular cyclophilin A*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(3): p. 613-8.
- 255.Murray, P.M., et al., *Sustainable production of biologically active molecules of marine based origin*. N Biotechnol, 2013. **30**(6): p. 839-50.
- 256.Falconer, I.R. and A.R. Humpage, *Health risk assessment of cyanobacterial (blue-green algal) toxins in drinking water*. Int J Environ Res Public Health, 2005. **2**(1): p. 43-50.
- 257.Gaudin, J., et al., *In vivo genotoxic potential of microcystin-LR: a cyanobacterial toxin, investigated both by the unscheduled DNA synthesis (UDS) and the comet assays after intravenous administration*. Environ Toxicol, 2009. **24**(2): p. 200-9.
- 258.Sainis, I., et al., *Cyanobacterial cyclopeptides as lead compounds to novel targeted cancer drugs*. Mar Drugs, 2010. **8**(3): p. 629-57.
- 259.Pomilio, A.B., M.E. Battista, and A.A. Vitale, *Naturally-occurring cyclopeptides: Structures and bioactivity* Current Organic Chemistry, 2006. **10**(16): p. 2075-2121.
- 260.Barbosa, M.J. and R.H. Wijffels, *Biofuels from Microalgae*, in *Handbook of Microalgal Culture*, W. Sons, Editor. 2013: Oxford, UK. p. 566-577.
- 261.Araoz, R., J. Molgo, and N. Tandeau de Marsac, *Neurotoxic cyanobacterial toxins*. Toxicol, 2010. **56**(5): p. 813-28.
- 262.Thastrup, O., B. Foder, and O. Scharff, *The calcium mobilizing tumor promoting agent, thapsigargin elevates the platelet cytoplasmic free calcium concentration to a higher steady state level. A possible mechanism of action for the tumor promotion*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **142**(3): p. 654-60.
- 263.Putney, J.W., Jr. and R.R. McKay, *Capacitative calcium entry channels*. Bioessays, 1999. **21**(1): p. 38-46.
- 264.Maioli, M.A., et al., *Mechanism for the uncoupling of oxidative phosphorylation by juliprosopine on rat brain mitochondria*. Toxicol, 2012. **60**(8): p. 1355-62.
- 265.Tu, P., G. Brandolin, and A. Bouron, *The anti-inflammatory agent flufenamic acid depresses store-operated channels by altering mitochondrial calcium homeostasis*. Neuropharmacology, 2009. **56**(6-7): p. 1010-6.
- 266.Duszynski, J., et al., *The regulatory role of mitochondria in capacitative calcium entry*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(5-6): p. 380-7.
- 267.Hoth, M., C.M. Fanger, and R.S. Lewis, *Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes*. J Cell Biol, 1997. **137**(3): p. 633-48.
- 268.Glitsch, M.D., D. Bakowski, and A.B. Parekh, *Store-operated Ca²⁺ entry depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake*. EMBO J, 2002. **21**(24): p. 6744-54.

- 269.Saotome, M., et al., *Mitochondrial membrane potential modulates regulation of mitochondrial Ca²⁺ in rat ventricular myocytes*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(4): p. H1820-8.
- 270.Zhao, Z., et al., *Modulation of intracellular calcium waves and triggered activities by mitochondrial Ca flux in mouse cardiomyocytes*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80574.
- 271.Fruman, D.A., et al., *Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(9): p. 3686-90.
- 272.Sweeney, Z.K., et al., *Small-molecule inhibitors of store-operated calcium entry*. ChemMedChem, 2009. **4**(5): p. 706-18.
- 273.Djuric, S.W., et al., *3,5-Bis(trifluoromethyl)pyrazoles: a novel class of NFAT transcription factor regulator*. J Med Chem, 2000. **43**(16): p. 2975-81.
- 274.Kankaanranta, H., et al., *Inhibition by fenamates of calcium influx and proliferation of human lymphocytes*. Br J Pharmacol, 1996. **119**(3): p. 487-94.
- 275.Cardenas, M.E. and J. Heitman, *Role of calcium in T-lymphocyte activation*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1995. **30**: p. 281-98.
- 276.Janssens, V., J. Goris, and C. Van Hoof, *PP2A: the expected tumor suppressor*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(1): p. 34-41.
- 277.Ma, T., et al., *Mitochondrial modulation of store-operated Ca(2+) entry in model cells of Alzheimer's disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **426**(2): p. 196-202.
- 278.Li, J., et al., *Discovering novel chemical inhibitors of human cyclophilin A: virtual screening, synthesis, and bioassay*. Bioorg Med Chem, 2006. **14**(7): p. 2209-24.
- 279.Wear, M.A., et al., *A surface plasmon resonance-based assay for small molecule inhibitors of human cyclophilin A*. Anal Biochem, 2005. **345**(2): p. 214-26.
- 280.Miroux, C., et al., *Inhibitory effects of cyclosporine on human regulatory T cells in vitro*. Transplant Proc, 2009. **41**(8): p. 3371-4.
- 281.Liu, J., et al., *Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes*. Cell, 1991. **66**(4): p. 807-15.
- 282.Mahaut-Smith, M.P. and M.J. Mason, *Ca(2+)-activated K+ channels in rat thymic lymphocytes: activation by concanavalin A*. J Physiol, 1991. **439**: p. 513-28.
- 283.Shou, L., S.A. Schwartz, and R.A. Good, *Suppressor cell activity after concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors*. J Exp Med, 1976. **143**(5): p. 1100-10.
- 284.Weber, K.S., et al., *Trpm4 differentially regulates Th1 and Th2 function by altering calcium signaling and NFAT localization*. J Immunol, 2010. **185**(5): p. 2836-46.

285. Oh-Hora, M., et al., *Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance*. *Nat Immunol*, 2008. **9**(4): p. 432-43.
286. Thell, K., et al., *Immunosuppressive peptides and their therapeutic applications*. *Drug Discov Today*, 2014. **19**(5): p. 645-53.
287. Yurchenko, V., S. Constant, and M. Bukrinsky, *Dealing with the family: CD147 interactions with cyclophilins*. *Immunology*, 2006. **117**(3): p. 301-9.
288. Ou, W.B., et al., *Chaperone-like activity of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase during creatine kinase refolding*. *Protein Sci*, 2001. **10**(11): p. 2346-53.
289. Hahn, J.N., D.K. Kaushik, and V.W. Yong, *The role of EMMPRIN in T cell biology and immunological diseases*. *J Leukoc Biol*, 2015. **98**(1): p. 33-48.
290. Suzuki, J., et al., *Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 2006. **98**(6): p. 811-7.
291. Carpentier, M., et al., *Delineation of the calcineurin-interacting region of cyclophilin B*. *Protein Sci*, 2000. **9**(12): p. 2386-93.
292. Xiong, Y., et al., *Suppression of T-cell activation in vitro and in vivo by cordycepin from Cordyceps militaris*. *J Surg Res*, 2013. **185**(2): p. 912-22.
293. Lim, J.H., et al., *Immunomodulation of delayed-type hypersensitivity responses by mesenchymal stem cells is associated with bystander T cell apoptosis in the draining lymph node*. *J Immunol*, 2010. **185**(7): p. 4022-9.
294. Macian, F., *NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(6): p. 472-84.
295. Andres, D., M. Bautista, and M. Cascales, *Attenuation of cyclosporine A toxicity by sublethal heat shock. Role of catalase*. *Biochem Pharmacol*, 2005. **69**(3): p. 493-501.