

TESI DOCTORAL

**CARACTERITZACIÓ DE LA RESPOSTA DE CÈL·LULES
TUMORALS A LES MITRAMICINES**

Marc Bataller Chardi
Barcelona, maig de 2009

INTRODUCCIÓ.

1. INTRODUCCIÓ.

1.1. EL CICLE CEL·LULAR I EL SEU CONTROL.

El cicle cel·lular es divideix en quatre fases principals (Figura I1A). En les cèl·lules proliferatives, la fase G1 és el període on la cèl·lula porta a terme un major creixement i es prepara per la síntesi de DNA, que comença a la fase S. Al final de la fase S, les cèl·lules entren en G2 amb el doble de cromosomes que tenien en la fase G1 (4N en organismes diploides). Un cop superada la fase G2 comença la mitosis, que després de nombrosos successos esdevé la divisió cel·lular. Les fases G1, S i G2 formen part de la interfase. Després de progressar a través de la fase G2, les cèl·lules comencen el complex procés de la mitosis, també anomenat fase M, la qual es divideix en varies etapes (Figura I1B). En la profase primerenca els centrosomes, que contenen cadascun un centríol, es mouen a cada pol oposat de la cèl·lula. Els cromosomes poden començar a ser visibles en forma de llargs filaments, i la membrana nuclear comença a formar petites vesícules. La profase tardana es caracteritza per la completa condensació dels cromosomes, compostos per dues cromàtides unides pels centròmers. Les fibres microtubulars es formen des de les regions adjacents als centrosomes, els quals s'aproximen més als pols. Algunes de les fibres del fus es disposen de pol a pol, mentre que la majoria s'uneixen a les cromàtides ancorant-se als cinetocors. En la metafase els cromosomes es mouen cap l'equador de la cèl·lula, on s'alineen en el plànol equatorià. Durant l'anafase les dues cromàtides germanes es separen donant com a resultat cromosomes independents. Cadascun presenta un centròmer unit a una fibra del fus mitòtic i és portat a un pol. Simultàniament, la cèl·lula s'allarga en la mateixa direcció que ho fa el fus mitòtic i la citocinesis comença amb la formació del solc d'escissió. En la telofase es formen les noves membranes nuclears al voltant de cada nucli, els cromosomes es descondensen i els nuclèols comencen a ser visibles un altre cop. La citocinesis es completa mitjançant la desaparició dels microtúbuls i altres fibres i cada cèl·lula filla entra a la fase G1 per començar un cicle nou.

Les cèl·lules postmitòtiques en organismes multicel·lulars poden escapar del cicle cel·lular i romandre sense proliferar per dies, setmanes i en alguns casos (per exemple, les cèl·lules nervioses) durant tota la vida de l'organisme. Aquest estat

s'anomena fase G0 del cicle cel·lular. Les cèl·lules en fase G0 poden re-entrar en el cicle cel·lular de forma regulada, proporcionant un control de la proliferació cel·lular.

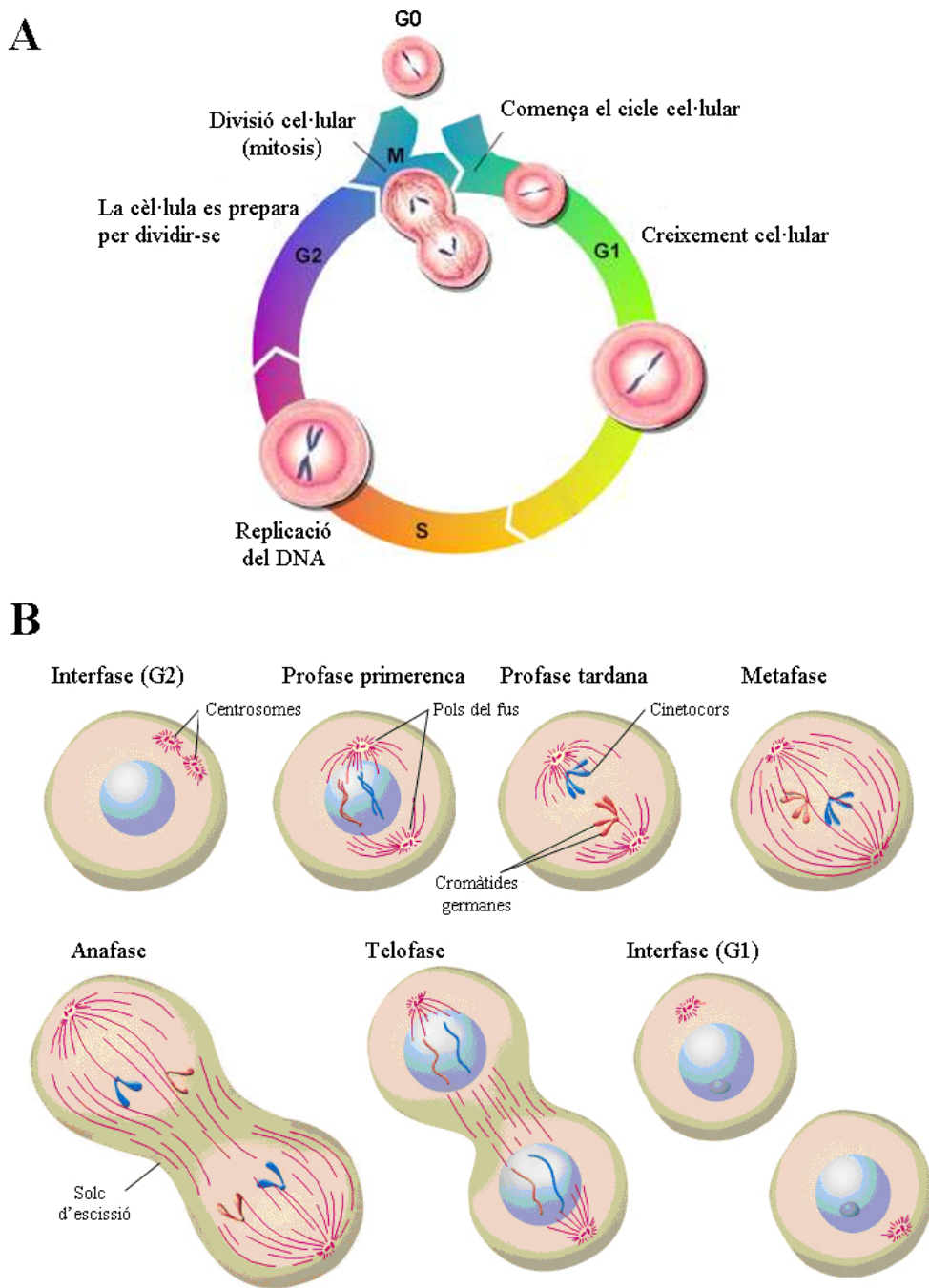


Figura 11. (A) Esquema de les quatre fases del cicle cel·lular. (B) Etapes de la mitosis i citocinesi en les cèl·lules animals. Els cromosomes es condensen durant el període de la mitosis anomenat profase. Les cromàtides germanes, produïdes durant la fase S mitjançant la replicació del DNA, resten unides al centròmer i a múltiples punts al llarg del cromosoma i s'alineen en el centre de la cèl·lula durant la metafase. Durant l'anafase, les cromàtides germanes es separen i es mouen als pols oposats mitjançant el fus mitòtic, segregant cadascuna de les cromàtides germanes a cada cèl·lula filla. Modificat de (Lodish et al., 2000)

1.2. REGULACIÓ DEL CICLE CEL·LULAR.

En els organismes pluricel·lulars, la proliferació cel·lular no només depèn de la disponibilitat de nutrients. Per a què les cèl·lules proliferin o es diferenciïn necessiten rebre factors de creixement, proteïnes secretades per les mateixes cèl·lules o per altres tipus cel·lulars pròxims o no, normalment actives a baixes concentracions. La majoria dels factors de creixement activen la proliferació cel·lular, encara que altres són factors inhibidors (Chabner & Longo, 2001).

El inici de la progressió del cicle cel·lular depèn del balanç net de factors activadors i inhibidors, que actuen unint-se amb alta afinitat a receptors de membrana específics. Com a conseqüència d'aquesta unió s'indueix una cascada de reaccions bioquímiques, que en conjunt es coneixen com a via de transducció de la senyal mitogènica, la qual comunica la superfície de la cèl·lula amb el nucli. En la transducció de la senyal participa un grup heterogeni de segons missatgers que inclouen AMPc, ions o petites molècules com el inositol fosfat, que en última instància, activen quinases que fosforilen i modulen l'activitat de factors de transcripció específics en el nucli. Un cop que la senyal arriba al nucli, es produeixen canvis en l'expressió gènica, iniciant-se la progressió del cicle cel·lular des de las fases G0 o G1 a S. La regulació del cicle cel·lular és totalment necessària per evitar una catàstrofe genètica i les cèl·lules no progressen cap a una fase del cicle cel·lular sense abans haver completat la fase prèvia.

Aquesta regulació es porta a terme mitjançant un petit nombre de quinases heterodimèriques. La concentració de les subunitats reguladores d'aquestes quinases, anomenades ciclins, incrementa i decreix en cada fase del cicle cel·lular. Les subunitats catalítiques s'anomenen cdk (*Cyclin-dependent kinases*), perquè no tenen activitat quinasa a no ser que estiguin associades amb una ciclina. Cada subunitat catalítica cdk pot associar-se amb diferents ciclins, i la ciclina associada determina quina proteïna serà fosforilada pel complex ciclina/cdk (Malumbres & Barbacid, 2009).

Hi ha tres classes de complexos ciclina/cdk que controlen la progressió del cicle cel·lular. Aquests complexos formen part dels processos anomenats punts de control (*checkpoints*) i són necessaris per la correcta regulació del cicle cel·lular. Bàsicament hi ha tres punts de control: el punt de control a la fase G1, a la fase S i el punt de control

mitòtic. La síntesi de les diferents ciclines en cada moment del cicle cel·lular constitueix un nivell de regulació de l'activitat de les cdk (Figura I2). Per exemple, els gens de resposta primerenca com *Sp1* i *c-myc*, en resposta als factors de creixement presents en el medi, activen l'expressió de la ciclina D (D1, D2 i D3), que forma complexos amb la cdk4 i cdk6 durant les fases G0 i G1 (Gartel & Shchors, 2003; Grinstein et al., 2002).

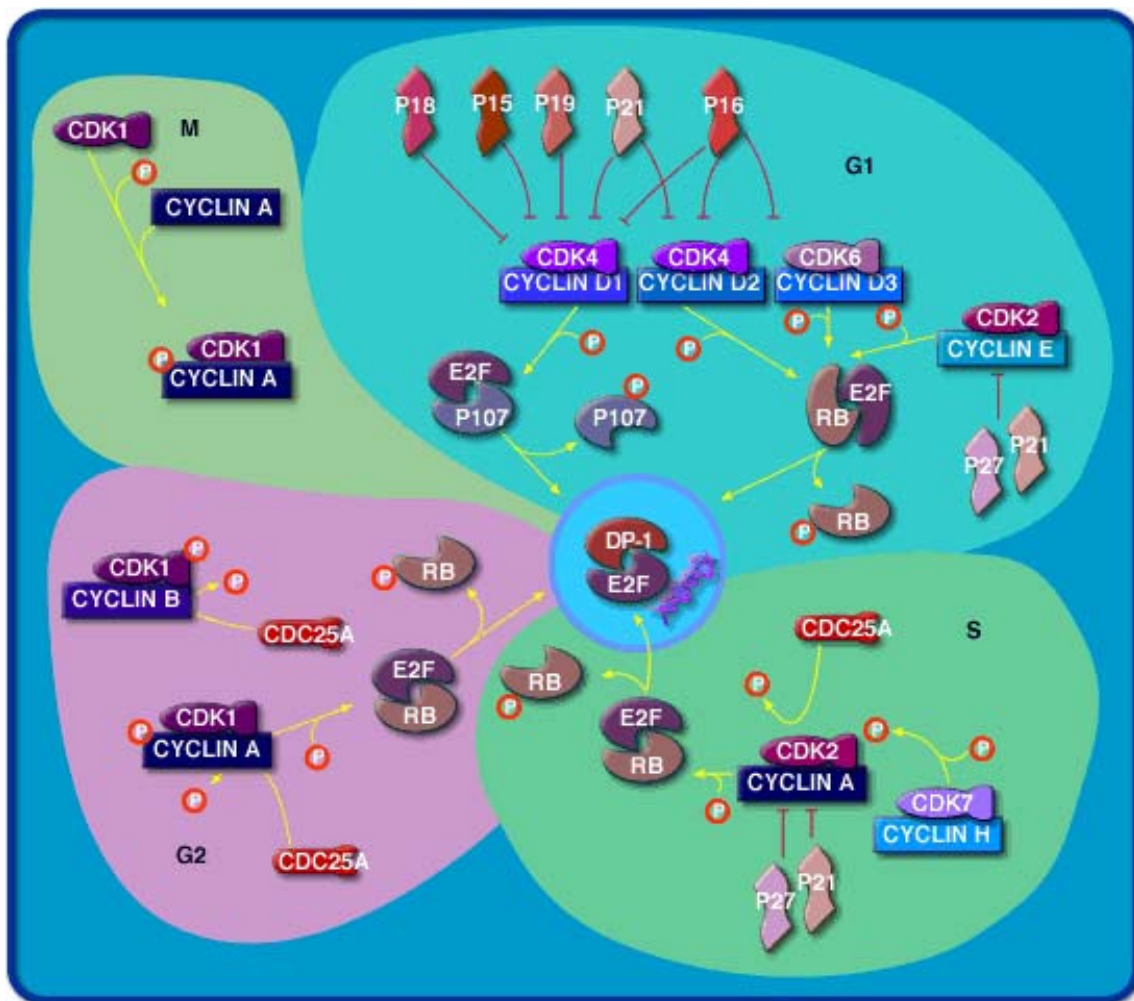


Figura I2. El cicle cel·lular està regulat per la interacció de múltiples molècules. Les ciclines s'expressen i es degraden coordinadament per a dirigir les diferents fases del cicle cel·lular. Les ciclines es combinen amb les cdk per formar quinases actives que fosforilen proteïnes diana en la regulació del cicle cel·lular. Una errada en la regulació del cicle cel·lular pot comportar una pèrdua del control del creixement i contribuir a la formació de tumors.

Durant la fase G1 els complexos cdk4/6-ciclina D activen la transcripció de la ciclina E, que regula la transició G1/S formant un complex amb la cdk2 (Figures I2 i I3) (Malumbres & Barbacid, 2009). Després de la síntesi de la ciclina E, es sintetitza la

ciclina A, que s'uneix a la cdk2 durant la fase S, i a la cdc (cdk1) durant la fase G2 (Figura I4) (Malumbres & Barbacid, 2009).

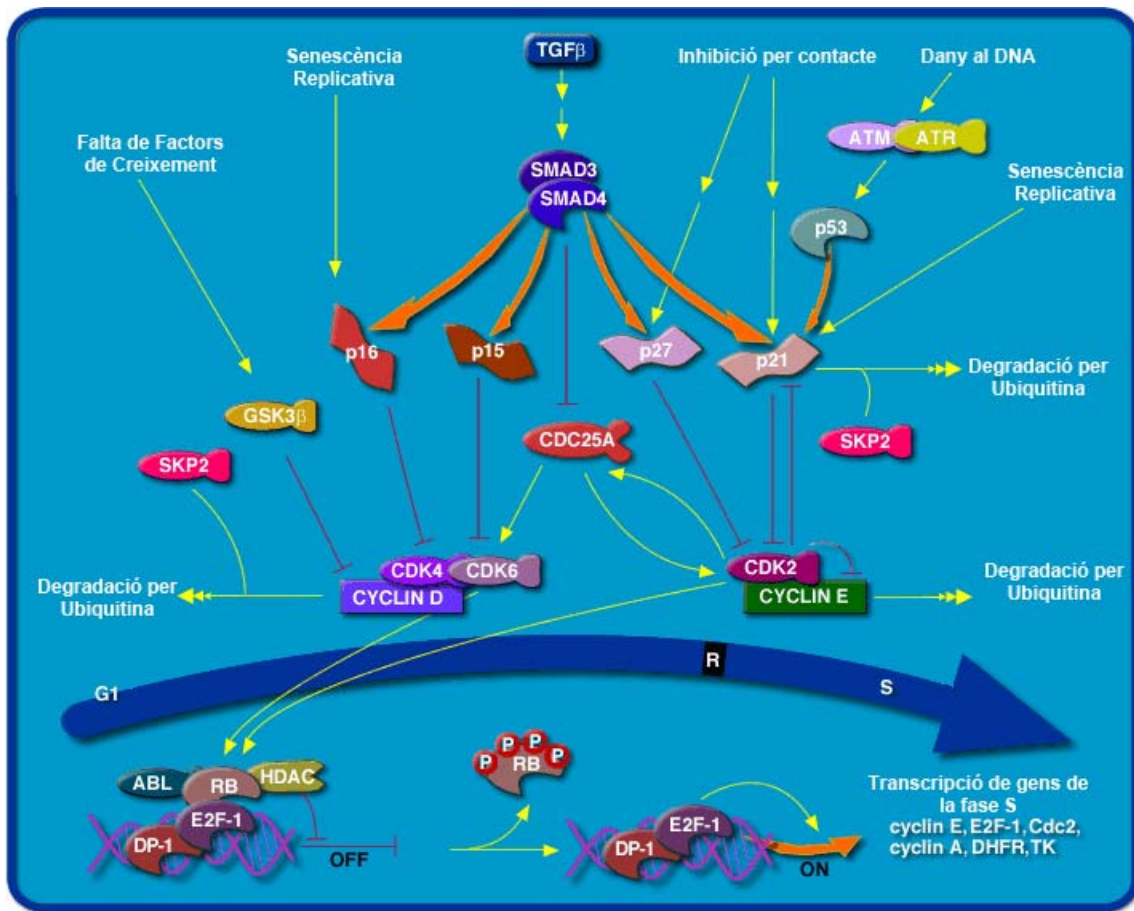


Figura I3. Punt de control de la fase G1/S. Els complexos cdk4/6-ciclina D i cdk2-ciclina E, i el complex transcripcional que inclou Rb i E2F són crucials per la regulació d'aquest punt de control. Durant la fase G1, el complex repressor Rb-HDAC s'uneix als factors de transcripció E2F-DP1, inhibint la transcripció. La fosforilació de Rb per cdk4/6 i cdk2 separa el complex Rb-repressor, permetent la transcripció dels gens de la fase S que codifiquen per proteïnes que seran requerides per la replicació del DNA. Diferents estímuls regulen aquest punt de control incloent TGFβ, el dany al DNA, la inhibició per contacte, la senescència replicativa, i la falta de factors de creixement.

L'entrada a la fase de divisió o fase M està regulada per les ciclines de classe B, que també formen un complex amb la cdc2 (Malumbres & Barbacid, 2009). El complex ciclina B/cdc2 és el responsable de la inducció de la mitosis i també es coneix com factor MPF (*M phase-promoting factor*) (Malumbres & Barbacid, 2009; Smits & Medema, 2001).

Els complexos ciclina/cdk no són actius per sí sols. El complex ciclina H/cdk7 és una quinasa activadora de cdk que fosforila diferents residus treonina dels complexos ciclina/cdk activant-los. Existeix una activitat quinasa dependent d'ATP que realitza fosforilacions inactivadores en residus treonina i tirosina dels complexos ciclina/cdk. Les fosforilacions inactivadores es poden revertir per acció de la família de fosfatases cdc25 (Lodish et al., 2000).

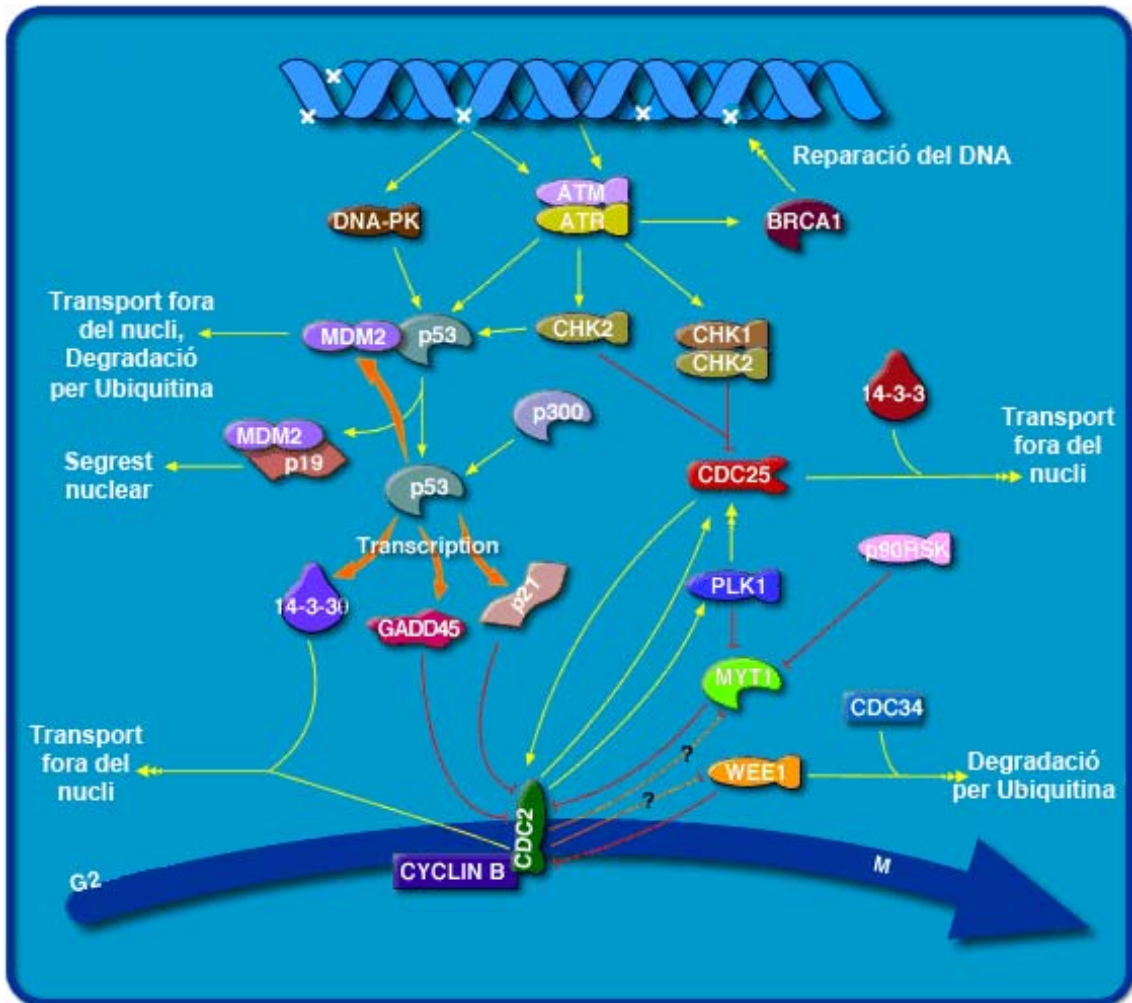


Figura I4. El punt de control de la fase G2/M prevé a la cèl·lula d'entrar a mitosis en front d'un dany al DNA. El complex ciclina B-cdc2 és crucial en la regulació d'aquesta transició. Durant la fase G2, cdc2 es manté en un estat inactiu gracies a les quinases Wee1 i Myt1. Quan s'està apunt d'entrar en fase M, la fosfatasa cdc25 s'activa. Cdc25 activa cdc2, permetent l'entrada en la fase M. El dany al DNA activa les quinases DNA-PK i ATM/ATR, iniciant dues cascades en paral·lel que inactivaran el complex ciclina B-cdc2. La primera cascada ràpidament inhibeix la progressió cap a la mitosis: les quinases CHK fosforilen i inactiven cdc25. La segona cascada és més lenta. La fosforilació de p53 el separa de MDM2, activant la seva capacitat d'unió al DNA i la transcripció de gens que seran els efectors de la segona cascada, com ara 14-3-3σ, el qual s'uneix al complex ciclina B-cdc2 i l'exporta del nucli; GADD45, el qual dissocia cdc2 de la ciclina B, inactivant el complex; i p21^{WAF1}, inhibidor de quinases dependents de ciclins incloent cdc2 (cdk1).

La família proteica d'inhibidors de cdk (CKIs) constitueix un nivell addicional de regulació de l'activitat de les quinases dependents de ciclina. S'han descrit dues classes de CKIs: la família INK4A (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} i p19^{INK4D}), que s'uneixen a la cdk4 i 6, interferint amb l'associació d'aquestes cdk a les seves ciclins, i la família CIP/KIP (p21^{WAF1}, p27 i p57), que forma complexos ternaris amb els complexos ciclina E/cdk2 i ciclina A/cdk2, inhibint la seva activitat, mentre que en el cas del complex ciclina D/cdk exerceix la funció contrària (Alcorta et al., 1996).

Un cop que un complex ciclina/cdk específic ha exercit el seu control en un punt concret de la progressió del cicle cel·lular, normalment es necessària la seva inactivació per a que la cèl·lula pugui completar la fase amb èxit. El procés d'inactivació definitiu d'aquests complexos es porta a terme per processos de proteòlisi dependents d'ubiquitina (Lodish et al., 2000).

L'activació seqüencial dels diferents complexos ciclina/cdk modula l'activitat de la proteïna Retinoblastoma (pRb), que juga un paper central en la regulació del cicle cel·lular (Baus et al., 2003; Peñuelas et al., 2003; Tsugu et al., 2000). La proteïna pRB és una proteïna nuclear que s'uneix de manera específica a altres proteïnes implicades en el control de l'expressió gènica (Lodish et al., 2000). La capacitat d'unió de pRB a aquestes proteïnes depèn del seu grau de fosforilació (Baus et al., 2003). En les cèl·lules normals, tant quiescents com proliferants, pRB està sempre present en el nucli i l'únic que varia és l'estat de fosforilació (Figura I2) (Peñuelas et al., 2003). Existeixen dues proteïnes relacionades amb pRB: p107 i p130 que, en conjunt, es coneix com família de "proteïnes *pocket*" degut a la presència d'un domini *pocket* implicat en la unió a diferents proteïnes cel·lulars, com la família de factors de transcripció E2F (Baus et al., 2003).

La forma hipofosforilada de la proteïna pRB es troba present en les cèl·lules durant la fase G1 del cicle cel·lular (Tsugu et al., 2000). La proteïna pRB hipofosforilada es troba unida al factor de transcripció E2F (heterodímer format pel polipèptid E2F i la proteïna DP-1), mantenint el seu estat inactiu. (Bernards et al., 1989). Tot i que el complex E2F/pRB pot unir-se al DNA, el complex actua com un

repressor dominant, mantenint reprimits els gens diana del factor E2F durant la fase G1 (Bernards et al., 1989) (Figura I3).

El complex ciclina D/ckd4-6 actiu fosforila diferents residus de la proteïna pRB durant la fase G1, fent que es perdi afinitat pel factor E2F, que queda lliure. El factor E2F lliure activa la transcripció de gens implicats en la transició de G1 a S, com *ciclina E*, *ciclina A* i *c-myc*, i de gens implicats en la síntesi i replicació del DNA, com el gen de la *DNA polimerasa A* (Peñuelas et al., 2003). Una vegada sintetitzada la ciclina E al final de la fase G1 i la ciclina A durant la fase S, els complexos ciclina E/ckd2 i ciclina A/ckd2 s'encarreguen de dirigir la fosforilació de pRB per a que el factor E2F pugui activar la transcripció dels gens necessaris per la progressió a través del cicle fins arribar a la fase G2 (Bernards et al., 1989). La fosfatasa PP-1 (*phosphatase 1-like protein*) s'encarrega de desfosforilar la proteïna pRB durant la mitosis, per a que torni al seu estat hipofosforilat actiu després de la divisió cel·lular (Peñuelas et al., 2003).

La transició ordenada a través de les diferents fases del cicle cel·lular està regulada pels punts de control, que s'encarreguen d'assegurar una divisió cel·lular correcta. El punt de control de G1 evita l'entrada de les cèl·lules en la fase S quan les condicions ambientals o la mida cel·lular no són adequats, o quan la cèl·lula té el DNA danyat (Figura I3)(Chabner & Longo, 2001). El punt de control de G2 controla que la replicació durant la fase S ha estat correcta i que les condicions ambientals són apropiades per a que la cèl·lula pugui iniciar la mitosis (Figura I4)(Chabner & Longo, 2001). Durant la transició de la metafase a l'anafase existeix un punt de control addicional, que assegura que els cromosomes estan correctament alineats i que no hi ha errors en el fus mitòtic, abans d'iniciar-se la segregació cromosòmica a les cèl·lules filles (Castedo et al., 2004a; Huang et al., 2005). Quan s'activen els punts de control en resposta a alteracions que poden comprometre la fidelitat de la divisió, s'atura la progressió del cicle cel·lular (Collins et al., 1997).

Una part important del present treball es centra en la resposta cel·lular enfront d'alteracions al DNA provocats per les Mitramicines. Les cèl·lules normals inicien una sèrie de respostes quan es presenten lesions al DNA. Aquestes respostes inclouen l'aturada del cicle cel·lular en les fases G1 o G2, l'activació de gens de reparació del DNA, la inducció de senescència cel·lular i la mort cel·lular, generalment per apoptosi.

Tal i com es desenvoluparà més endavant els gen supressor de tumors *p53* i *p21^{WAF1}* són elements clau en la resposta cel·lular al dany al DNA. Actuen activant inhibidors de quinases parant la progressió del cicle cel·lular en las fases G1 o G2.

1.3. RESPOSTES CEL·LULARS ENFRONT DE LA TERÀPIA ANTITUMORAL.

Durant dècades, s'ha considerat que la quimioteràpia i la radioteràpia actuen produint un dany demolidor a la cèl·lula. La majoria d'agents antitumorals poden induir dany al DNA directa o indirectament. Malgrat això, encara no coneixem les bases de la selectivitat d'aquests agents antitumorals tan útils en clínica. És un enigma el per què les cèl·lules canceroses són més sensibles que no pas les cèl·lules normals replicatives a intercaladors de DNA, a inhibidors de topoisomerases, a agents alquilants i a agents disruptors del fus mitòtic (DeVita et al., 2005).

En resposta al dany al DNA, el factor supressor de tumors *p53* s'estabilitza promovent l'aturada del cicle cel·lular o la mort per apoptosi (Brown & Attardi, 2005; Meulmeester & Jochemsen, 2008). La parada en el cicle cel·lular és necessària per a que la cèl·lula reperi qualsevol dany produït al DNA, mentre que la inducció de l'apoptosi és una resposta controlada genèticament per a que les cèl·lules es "suïcidin" quan el dany no es pot reparar (Johnstone et al., 2002). Els sistemes de reparació de DNA altament conservats i els punts de control del cicle cel·lular permeten a les cèl·lules sobreposar-se al dany al DNA produït tant de forma endògena com exògena (Vogelstein & Kinzler, 2004). L'absència del factor *p53* funcional en cèl·lules canceroses és l'anomalia molecular més comú (Figura I5) i es creu que juga un paper fonamental en la carcinogènesis (Brown & Attardi, 2005; Greenblatt et al., 1994; Levesque & Eastman, 2007), com demostra que ratolins *p53*-null són més propensos a desenvolupar càncer (Brown & Attardi, 2005).

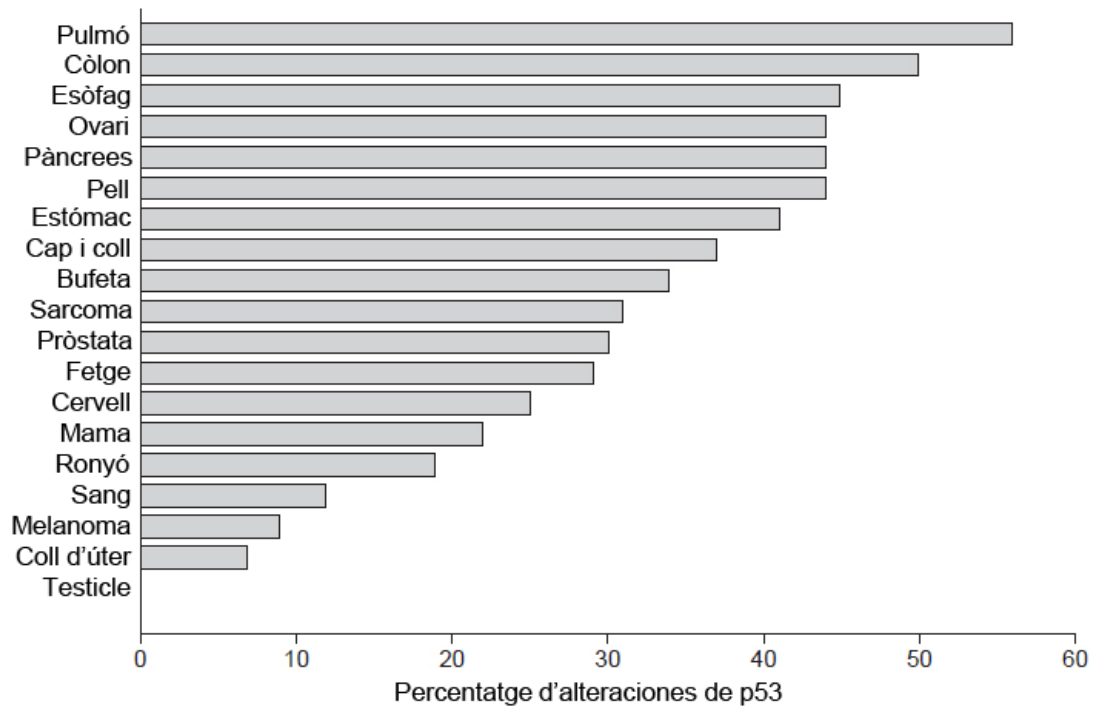


Figura 15. Percentatge d'alteracions del gen *p53* en diferents càncers humans. Modificat de (Weller, 1998)

L'apoptosi és una resposta antiproliferativa a agents antitumorals àmpliament caracteritzada. El postulat que els fàrmacs antitumorals desencadenen a la mort cel·lular mitjançant l'apoptosi, freqüentment associada a *p53* (Brown & Attardi, 2005), i que les cèl·lules resistents a l'apoptosi es poden convertir en cèl·lules resistents a la quimioteràpia, ha estat arrelat considerablement en el camp de la teràpia antitumoral (Johnstone et al., 2002). No obstant, altres mecanismes no-apoptòtics són prou importants com per explicar l'èxit en la teràpia antitumoral (Brown & Attardi, 2005; Mansilla et al., 2006a; Roninson, 2002; Vakifahmetoglu et al., 2008). Aparentment, diferents respostes cel·lulars poden ser activades depenent de l'agent tumoral i del context biològic.

Segons una classificació recent, la qual té com a objectiu unificar els criteris de nomenclatura de la mort cel·lular, al menys es poden definir fins a vuit tipus diferents de morts cel·lulars (Kroemer et al., 2009). D'aquests vuit tipus de mort cel·lular, només descriuré en detall en aquesta memòria els més rellevants i estan resumits en la Taula I1, on també es considera la senescència, ja que està qualificada com resposta cel·lular al

tractament amb agents antitumorals, si bé no comporta sempre la mort cel·lular (Gewirtz et al., 2008; Roninson, 2002; Shay & Roninson, 2004).

Taula II. Respostes antiproliferatives i de mort cel·lular observades en teràpia antitumoral.

| | Definició i característiques | Canvis genètics i bioquímics associats |
|----------------------------|---|---|
| Apoptosi | Mort cel·lular programada. Reducció de la mida cel·lular i formació de bombolles a la membrana. Condensació de la cromatina i fragmentació del DNA. | Estimulada per l'activació de ciclina D1 i per c-myc. Pot ser inhibida per la pèrdua de p53. Activació de les caspases. Dissipació del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mi}$). |
| Catàstrofe mitòtica | Mort cel·lular durant o després d'una mitosis defectuosa. Cèl·lules gegants amb dos o més nuclis i amb cromatina parcialment condensada. | Estimulada per deficiències en proteïnes involucrades en els punts de control de G1, G2 i mitòtic. Pot seguir vies dependents o independents de caspases. |
| Senescència | Les cèl·lules no es divideixen, encara que continuen metabòlicament actives. Cèl·lules grans i aplanades amb increment de granularitat. | Estimulada per mutacions en <i>Ras</i> i reducció dels telòmers. Inhibida per la pèrdua de <i>p53</i> , <i>p16</i> i <i>p21^{WAF1}</i> |
| Necrosi | Cèl·lules inflades amb trencaments de la membrana cel·lular. Nucli amb vacuïtzacions i òrgànuls cel·lulars desintegrats. | No es considera genèticament condicionada. Descens dels nivells d'ATP. Generació elevada d'espècies reactives d'oxigen. |

1.3.1. Apoptosi.

L'apoptosi, el tipus més conegut de mort cel·lular programada, és una resposta genèticament controlada que a partir d'una sèrie d'esdeveniments acaba per donar com a resultat la mort de la cèl·lula que posteriorment serà fagocitada pels macròfags, que evitaran l'alliberació del contingut cel·lular i l'activació de la resposta inflamatòria (Bree et al., 2002). L'apoptosi presenta les següents característiques:

- Pèrdua de la viabilitat.
- Condensació de la cromatina.
- Fragmentació del DNA intranucleosomal.
- Formació de “cossos apoptòtics”.

L'apoptosi pot ser induïda per una gran varietat d'estímuls, incloent la supressió de factors de creixement, el tractament amb fàrmacs antitumorals i la radiació ionitzant (White, 1996). Un model generalment acceptat en l'oncologia actual és que p53 és necessària per induir l'apoptosi quan la cèl·lula ha patit dany al DNA. No obstant, això genera un paradigma enganyós perquè existeixen varis casos en que cèl·lules deficientes en p53 esdevenen apoptòtiques (Casenghi et al., 1999; White, 1996).

L'apoptosi s'activa bàsicament per dues vies: la via extrínseca i la via intrínseca (Bree et al., 2002). En totes dues vies participen unes proteases específiques anomenades caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*), les quals són sintetitzades com pro-enzims i activades per proteòlisis. Es considera que la seva activació indueix la inducció d'apoptosi de forma irreversible. S'han identificat fins a catorze caspases diferents, que es classifiquen segons la seva funció: caspases iniciadores i caspases efectores (Taula I2). Les caspases iniciadores s'activen per oligomerització, mentre que les caspases efectores requereixen un procés proteolític en el qual intervenen les caspases iniciadores (Boatright & Salvesen, 2003).

Les caspases efectores estan presents dins la cèl·lula en forma de pro-caspases inactives i es componen d'un pro-domini N-terminal de longitud variable i un domini C-terminal proteolític que pot ser dividit en dues subunitats (una subunitat petita i una subunitat gran) que constitueixen les caspases madures. La conversió de pro-caspasa a caspasa madura implica al menys un procés proteolític que separa les dues subunitats, però freqüentment també es porta a terme una altra proteòlisi que separa el pro-domini de la subunitat gran. Les caspases efectores madures degraden un ampli nombre de estructures intracel·lulars, conduint a una sèrie de canvis en la morfologia cel·lular i donant com a resultat final la mort cel·lular.

Les caspases iniciadores s'activen per dimerització que activa una reacció de proteòlisi creuada alliberant els pro-dominis (DED, de l'anglès *Death effector domain*) i activant l'enzim.

Taula I2. Classificació de les caspases segons la seva funció. Les caspases també poden tenir un paper important en processos independents de l'apoptosi com ara la producció de citosines. Aquests és el cas de la caspasa 4 i caspasa 5 que activen la caspasa 1, essencial per l'activació de varies interleucines.

| Nom | Funció | Propietats |
|------------|------------|---|
| Caspasa 1 | Iniciadora | Caspasa present en processos inflamatoris |
| Caspasa 4 | Iniciadora | Caspasa present en processos inflamatoris |
| Caspasa 5 | Iniciadora | Caspasa present en processos inflamatoris |
| Caspasa 2 | Iniciadora | Caspasa iniciadora de la via intrínseca |
| Caspasa 9 | Iniciadora | Caspasa iniciadora de la via intrínseca |
| Caspasa 8 | Iniciadora | Caspasa iniciadora de la via extrínseca |
| Caspasa 10 | Iniciadora | Caspasa iniciadora de la via extrínseca |
| Caspasa 11 | Iniciadora | Caspasa present en processos inflamatoris en ratolí |
| Caspasa 12 | Iniciadora | Caspasa iniciadora de l'apoptosi en ratolí |
| Caspasa 13 | Iniciadora | Caspasa iniciadora de l'apoptosi en bovins |
| Caspasa 3 | Efectora | Caspasa executora de l'apoptosi |
| Caspasa 6 | Efectora | Caspasa executora de l'apoptosi |
| Caspasa 7 | Efectora | Caspasa executora de l'apoptosi |
| Caspasa 14 | ? | Diferenciació de queratinòcits. |

La via extrínseca de l'apoptosi s'inicia per la unió de substrats extracel·lulars a receptors específics de membrana anomenats "receptors de mort" (Figura I6). Hi ha tres tipus diferents de receptors de mort (Li & Yuan, 2008):

- TNF-R1: Receptor del factor de necrosi tumoral. El seu lligand és el TNF α (*Tumor necrosis factor α*).
- Fas: Receptors de la superfamília Fas. El seu lligand és el FasL.
- TRAIL-R1/R2: Receptors del lligand inductor de l'apoptosi relacionat amb TNF. El seu lligand és el TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*).

Aquests receptors tenen com a característica comú la presència de dominis mort (*death domains*; DD) en la part intracel·lular del receptor, els quals són necessaris per induir l'apoptosi, ja que són els adaptadors responsables de l'oligomerització de la caspasa 8/10 i la posterior activació de les caspases efectores (Hengartner, 2000).

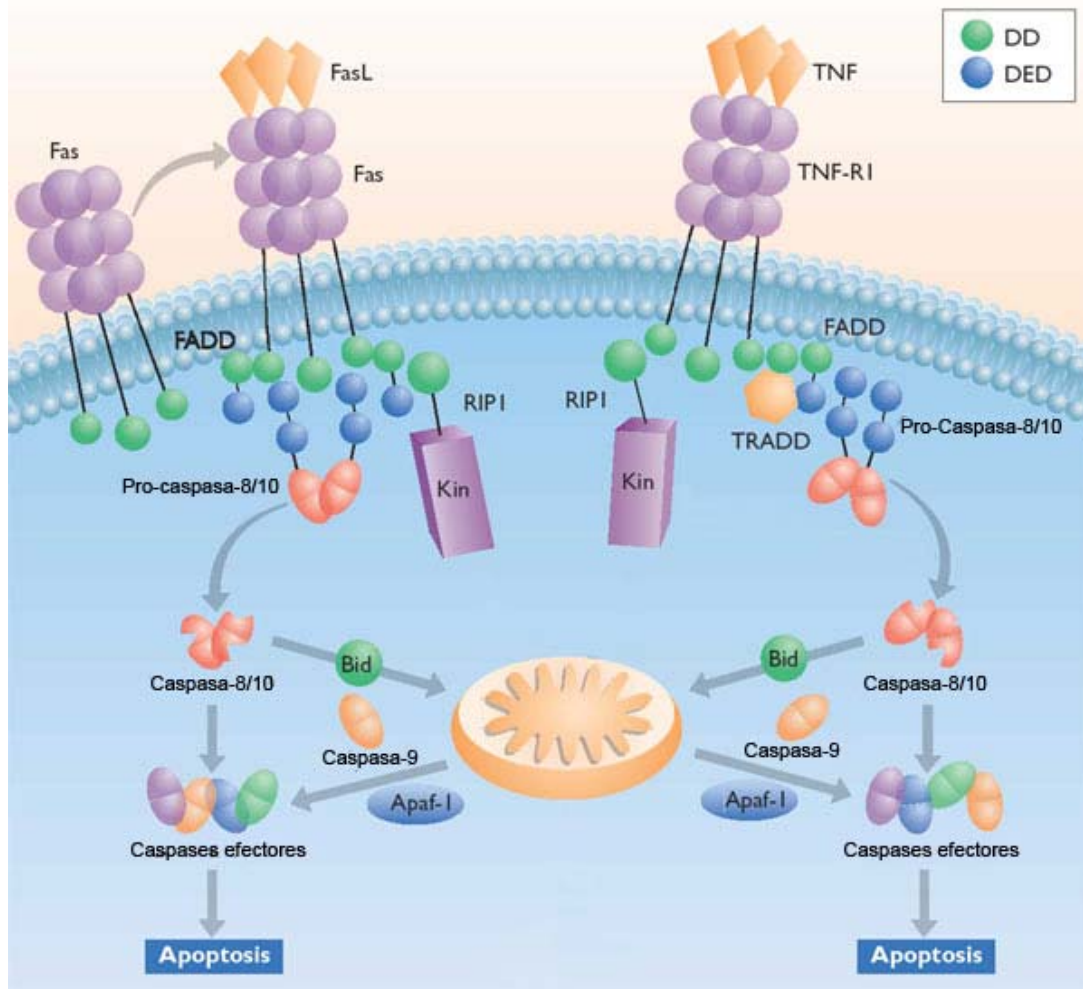


Figura I6. Via extrínseca de l'apoptosi. L'activació induïda pels lligands estimulen els receptors de mort. Els dominis mort (DD) de Fas recluten FADD i RIP1 formant un complex junt amb el receptor. Un cop format el complex, a través dels DEDs (de l'anglès, *Death effector domains*), la caspasa 8 i la caspasa 10 són activades i provoquen l'activació de les caspases efectores, tant de forma directa com a través de la mitocòndria mitjançant Bid permetent la formació de l'apoptosoma (format per Apaf-1 i la caspasa 9). No es mostra la senyal del receptor TRAIL-R1/R2, ja que és exactament igual a la de Fas. La senyal del receptor TNFR1 només difereix de la de Fas en la unió de FADD i RIP1 al complex ja que requereix de la proteïna adaptadora TRADD. Modificat de (Jaattela & Tschopp, 2003).

La via intrínseca de l'apoptosi s'activa normalment en resposta a senyals d'estrès intracel·lular, els quals inclouen el dany al DNA induït per alguns fàrmacs i els alts nivells d'espècies reactives de l'oxigen (Figura I7). Quan apareix un estrès

intracel·lular irreparable, les proteïnes pro-apoptòtiques del grup BH3-only (membres de la família de les proteïnes Bcl-2) activen la resposta apoptòtica i la caspasa 2 és la responsable de reconèixer aquest senyal (Krumschnabel et al., 2009). La caspasa 2 pot activar tan de forma directa com a través de la mitocondria la mort cel·lular per apoptosi (Figura I7) (Krumschnabel et al., 2009).

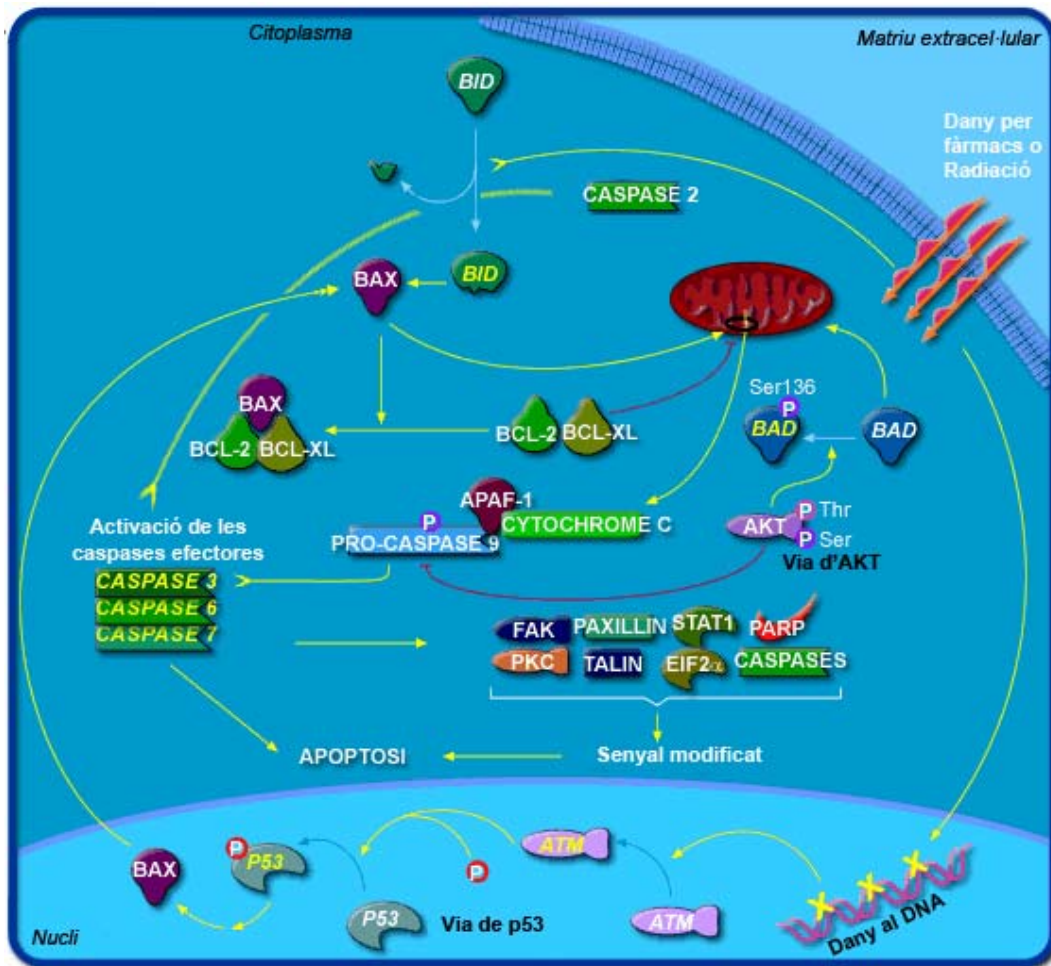


Figura I7. Via intrínseca de l'apoptosi. El tractament amb fàrmacs antitumorals o radiació provoca un dany al DNA que comporta a l'activació de la cascada de caspases donant com a resultat la mort cel·lular. Aquesta activació es porta a terme de dues maneres: a través de la proteòlisi de Bid per la caspasa 2 o mitjançant una cascada de reaccions que facilitarà la dissipació del potencial de la membrana mitocondrial, la qual allibera varis factors, entre ells el citocrom c. El citocrom c activa l'apoptosoma el qual s'encarrega, al igual que la caspasa 2, d'activar les caspases efectores.

Tant la via extrínseca com la intrínseca presenten una etapa comú força important: la inducció de la permeabilitat de la membrana externa mitocondrial que permet l'alliberament de factors pro-apoptòtics al citoplasma. Entre aquests factors

trobem el citocrom c, el qual s'uneix a la proteïna Apaf-1 i permet el reclutament i activació de la caspasa 9, formant el complex anomenat apoptosoma (Li & Yuan, 2008).

Un vegada format l'apoptosoma, aquest activa les caspases efectores 3, 6 i 7. Les caspases efectores orquestren el desmantellament de les estructures cel·lulars, la disrupció del metabolisme cel·lular, la inactivació de les proteïnes inhibidores de la mort cel·lular i l'activació d'enzims addicionals, com els que activen les caspases iniciadores, com a retroalimentació positiva de la reacció.

Diverses publicacions demostren que les cèl·lules amb p53 silvestre són més sensibles a multitud d'agents antitumorals (Johnstone et al., 2002; Lowe et al., 1994), però d'altres suggereixen que les cèl·lules que presenten problemes amb la proteïna p53 encara poden ser-ho més (Greenblatt et al., 1994). En un estudi basat en un cribratge de 60 línies cel·lulars diferents al *National Cancer Institute* és va determinar una correlació molt significativa entre p53 mutada i resistència a agents antitumorals, els quals majoritàriament eren agents que danyen el DNA (Weinstein et al., 1997). No obstant, és important tenir en compte que aquesta publicació analitza els resultats obtinguts a partir de la inhibició de creixement de les cèl·lules i no per la mort cel·lular. Considerant que p53 normalment atura el creixement cel·lular, és d'esperar una aparent sensibilització de les cèl·lules p53 silvestre, però els resultats no haurien de ser extrapolats per concloure que es requereix p53 per a la mort cel·lular (Brown, 1997). Molts dels assaigs utilitzats actualment, entre ells tincions mitocondrials, proteïques o de DNA, els quals asseguren que poden determinar la "supervivència cel·lular" són utilitzats d'una manera que no poden discriminar si les cèl·lules estan aturades en el cicle cel·lular o estan mortes, una distinció important considerant que les cèl·lules aturades poden recuperar-se. Un punt a favor de la hipòtesi que les alteracions de p53 poden predir si la quimioteràpia tindrà o no efecte deriva de l'observació que és més comú trobar mutacions de p53 en tumors quimioresistents que en tumors quimiosensibles, tot i que es troben algunes excepcions (Greenblatt et al., 1994).

Una forma de predir la mort és mesurar l'activitat de les caspases, ja que és un tret característic de l'apoptosi, però la idea que apoptosi és igual a activació de les caspases ha estat últimament qüestionant (Kroemer et al., 2009). Així, apoptosi es

defineix com una mort cel·lular associada a caspases amb morfologia apoptòtica (Zhivotovsky, 2004).

Les radiacions iòniques o la quimioteràpia poden activar la resposta del DNA al dany estabilitzant p53. En aquest cas p53 aturaria el cicle cel·lular mitjançant l'activació transcripcional del inhibidor de cdks p21^{WAF1}, donant temps a la cèl·lula per reparar el dany causat, o per activar l'apoptosi. La proteïna p53 també activa gens pro-apoptòtics, incloent *Bax*, *Puma*, *Noxa* i *Bid* (Figura I7) (El-Deiry, 2003). El mecanisme de la protecció associada amb p53 sembla ser que depèn de l'habilitat de p21^{WAF1} de prevenir la replicació o la mitosis quan el DNA de la cèl·lula està danyat.

L'apoptosi induïda per radiació es considera dependent de caspasa, però no es sap com la radiació activa la cascada de caspases. Bcl-2 és capaç de bloquejar la sortida del citocrom c induït per la radiació i com a conseqüència l'apoptosi, suggerint la participació d'un mecanisme dependent de la mitocòndria en aquesta resposta. Un fet que dona solidesa a aquesta hipòtesi és que p53 regula transcripcionalment de forma directa a Bcl-2, Bax, Puma, Noxa i Bid, i té una funció de factor pro-apoptòtic en la mitocòndria (Hengartner, 2000; Meulmeester & Jochemsen, 2008).

S'han descrit multitud de mètodes de detecció de l'apoptosi (Mansilla et al., 2006a) i Figura I8, entre ells destaquem:

- Tinció amb Annexina-V-Fluos.
- Quantificació dels canvis de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mi}$).
- Detecció mitjançant citometria del pic sub-G1.
- Detecció de la formació de l'escala internucleosomal.
- Detecció de la fragmentació del DNA mitjançant TUNEL.

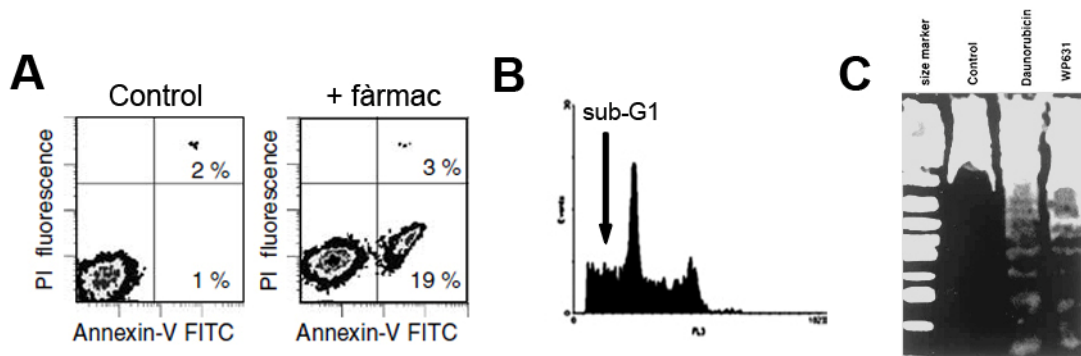


Figura 18. Diferents mètodes per la detecció de l'apoptosi. (A) Tinció amb Annexina-V (Borgne et al., 2006). (B) Detecció mitjançant citometria del pic sub-G1 (Bataller & Portugal, 2005). (C) Detecció de la formació de l'escala internucleosomal (Villamarín et al., 2002).

Varis fàrmacs antitumorals aturen les cèl·lules en la fase G2/M del cicle cel·lular i posteriorment indueixen la mort cel·lular per apoptosi. Així, l'apoptosi normalment esdevé durant la mitosis o al sortir d'ella, i en aquest cas es pot considerar la catàstrofe mitòtica un esdeveniment previ a l'apoptosi (Castedo et al., 2004b; Mansilla et al., 2006a).

1.3.2. Catàstrofe mitòtica.

El terme catàstrofe mitòtica s'utilitza per descriure la mort cel·lular que té lloc durant o després d'una mitosis defectuosa, normalment presenta poliploidies junt amb la formació de cèl·lules que contenen múltiples nuclis (Castedo et al., 2004a; Demidenko et al., 2008; Eom et al., 2005). Es considera la principal forma de mort cel·lular induïda per radiació ionitzant i per alguns agents oxidants (Bataller & Portugal, 2005; Chu et al., 2004; Roninson et al., 2001) i ha estat identificada com la principal resposta a varis fàrmacs antitumorals (Andreassen et al., 2001; Eom et al., 2005; Mansilla et al., 2006b). Com a conseqüència de què en una gran proporció de tumors els punts de control del cicle cel·lular no estan prou ben regulats, i les vies que activen l'apoptosi inhibides, les cèl·lules tumorals solen presentar aquest tipus de mort cel·lular després de tractaments amb agents que danyen el DNA (Brown & Attardi, 2005; Roninson et al., 2001). D'altres vegades, es considera com una mitosis anormal que segueix a una mort cel·lular per necrosi o apoptosi, més que com un tipus de mort cel·lular (Castedo et al., 2004b). El dany al DNA en la mitosis pot induir a un error en la citocinesis donant com a resultat cèl·lules multinucleades, pas que podria precedir a la mort cel·lular

(Erenpreisa et al., 2005; Mansilla et al., 2006a; Roninson et al., 2001). El dany al DNA activa p53, i es considera que p53 promou tan l'apoptosi com la senescència, però sembla ser que no està involucrada directament en el mecanisme de mort cel·lular per catàstrofe mitòtica (Roninson et al., 2001).

S'ha considerat que la catàstrofe mitòtica és diferent de l'apoptosi (Abend, 2003; Roninson et al., 2001), principalment perquè la sobreexpressió de varis gens anti-apoptòtics augmenta la freqüència de l'aparició de mitosis aberrants (Roninson et al., 2001). Encara que alguns models *in vivo* i *in vitro* mostren que les diferents vies de mort cel·lular estan d'alguna manera associades, la catàstrofe mitòtica pot anar acompanyada o no per l'alliberament de proteïnes pro-apoptòtiques i l'activació de les caspases, la qual cosa implica que la catàstrofe mitòtica compartiria alguns esdeveniments propis de l'apoptosi (Bataller & Portugal, 2005; Castedo et al., 2004a; Castedo et al., 2004b). En aquest context, la catàstrofe mitòtica podria determinar-se com:

- Mort cel·lular amb activitat caspasa semblant a l'apoptosi (Mansilla et al., 2006b).
- Mort cel·lular independent de l'activitat caspasa (Castedo et al., 2004b; Mansilla et al., 2006b)
- Mort cel·lular amb característiques de la necrosi (Eom et al., 2005).

Els tumors sòlids responen de forma més lenta i menys efectiva que les leucèmies a la teràpia tumoral. L'apoptosi en els tumors sòlids no és la única mort cel·lular que s'observa, ja que la catàstrofe mitòtica està sorgint com la resposta més freqüent en quimioteràpia (Brown & Attardi, 2005; Hernández-Vargas et al., 2007; Mansilla et al., 2006a; Roninson et al., 2001; Vakifahmetoglu et al., 2008). La catàstrofe mitòtica s'observa en cèl·lules prèviament aturades en la prometafase mitjançant molècules despolimeritzants, como ara el nocodazole, seguit, després de l'eliminació de la molècula, pel tractament amb agents que danyen el DNA (Andreassen et al., 2001; Huang et al., 2005). En línies cel·lulars de càncer de mama deficientes en BRCA1, la falta de control en el cicle cel·lular té com a resultat la formació de cèl·lules micronucleades, segregacions aberrants dels cromosomes, errors en l'alineament dels microtúbuls i multientrosomes, conduint a la cèl·lula cap a la catàstrofe mitòtica (Zajac et al., 2008).

La inducció de la catàstrofe mitòtica per fàrmacs que s'uneixen al DNA depèn principalment de tres paràmetres:

- El fàrmac que s'utilitza i la seva diana molecular.
- La concentració del fàrmac.
- La manca de p53 silvestre, o la inhibició de la seva expressió.

Estudis realitzats en el nostre laboratori, suggereixen que els nivells de p21^{WAF1} juguen un paper clau tant en la senescència com en la catàstrofe mitòtica (Bataller & Portugal, 2005; Mansilla et al., 2003; Mansilla et al., 2006b). Algunes vegades, la catàstrofe mitòtica és independent de la senescència (Chang et al., 1999b; Mansilla et al., 2006b), probablement per la falta d'una regulació positiva tan de p21^{WAF1} com de p53 (Mansilla et al., 2006b). La inducció de p21^{WAF1} normalment va acompanyada de la inhibició transcripcional de gens involucrats en varies etapes de la mitosis, en la regulació dels punts de controls del cicle cel·lular i en la proliferació cel·lular (Chang et al., 2002; Chang et al., 1999a; Chang et al., 2000; Mansilla et al., 2003).

En general, la catàstrofe mitòtica ha estat observada en cèl·lules tractades amb agents que danyen el DNA en les quals els punts de control del cicle cel·lular han estat anul·lats per moduladors dels punts de control o per canvis genètics (Castedo et al., 2004c; Mansilla et al., 2006a; Roninson et al., 2001). Alguns inhibidors de quinases dependents de ciclina presenten activitat antitumoral, incrementant l'eficàcia de la quimioteràpia convencional i la radioteràpia, i actualment alguns d'aquests agents inhibidors han estat admesos en proves clíniques (Ashwell & Zabludoff, 2008; Fischer, 2004). En alguns pacients s'han observat la presència de micronuclis, considerats una evidència morfològica de la catàstrofe mitòtica, després de rebre quimioteràpia (Yashige et al., 1999).

En l'actualitat es coneixen pocs mètodes de detecció de la catàstrofe mitòtica (Mansilla et al., 2006a) i Figura I9, la majoria basats en aspectes morfològics, entre ells destaquem:

- Presència de cèl·lules amb dos o més nuclis detectades amb microscopi o *Laser Scanning Cytometry*.
- Presència de mitosis aberrants.
- Acumulació de cèl·lules en la fase G2/M del cicle cel·lular i aparició de poliploidies detectades per citometria.

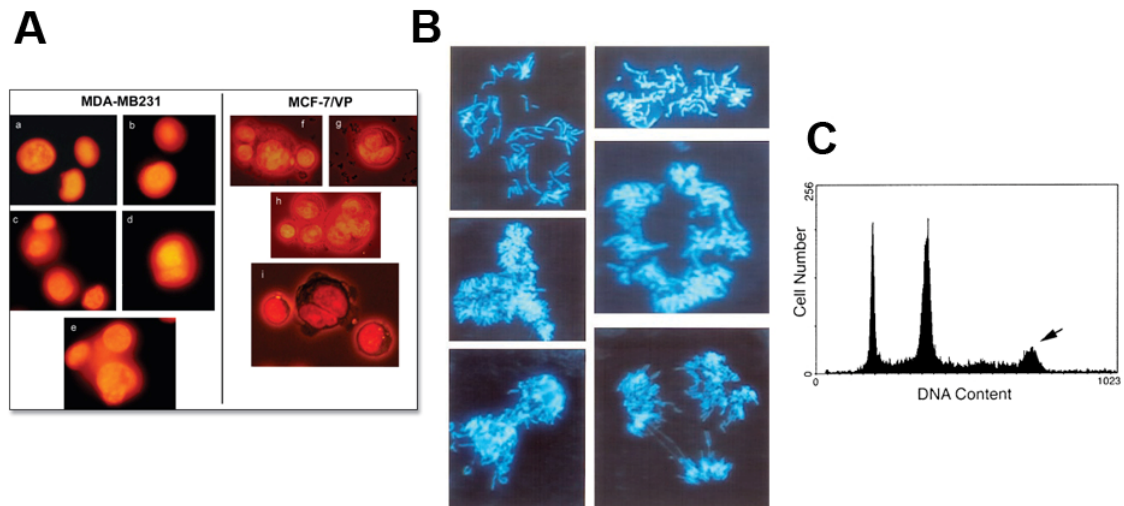


Figura 19. Diferents mètodes per la detecció de la catàstrofe mitòtica. (A) Presència de cèl·lules amb dos o més nuclis detectades amb *Laser Scanning Cytometry* (Mansilla et al., 2006b). (B) Presència de mitosis aberrants tenyides amb DAPI (Chang et al., 2000). (C) Acumulació de cèl·lules en la fase G2/M del cicle cel·lular i aparició de poliploidies (fletxa) detectades per citometria (Villamarín et al., 2002).

1.3.3. Senescència.

La senescència es defineix com un estat de pèrdua permanent de la capacitat de proliferar. Un mecanisme necessari per l'activació de la senescència és la resposta al dany al DNA per l'escurçament dels telòmers. Quan els telòmers s'escurcen fins a un cert límit, les cèl·lules s'aturen en el cicle cel·lular en el que es coneix com a senescència replicativa (Shay & Wright, 2005). Els telòmers són seqüències hexamèriques molt conservades que es troben repetides en tàndem en els extrems dels cromosomes (Bree et al., 2002; Donehower, 2002). Els telòmers són necessaris per mantenir la integritat de l'estructura dels cromosomes, evitant per exemple, processos de degradació o recombinació (Bree et al., 2002). Sota certes circumstàncies, el dany al DNA pot induir una parada terminal del creixement, la qual presenta canvis fenotípics semblants a la senescència replicativa (Gewirtz et al., 2008; Roninson, 2002; Shay &

Roninson, 2004). Es creu que la senescència és una resposta antitumoral essencial en les cèl·lules normals, ja que tan la senescència com l'apoptosi estableixen la resposta *in vivo* a la quimioteràpia, indicant que aquests programes fisiològics contribueixen al èxit del tractament (Schmitt, 2007).

Les cèl·lules tumorals poden patir senescència al ser tractades amb fàrmacs antitumorals i radiació (Gewirtz et al., 2008; Roninson et al., 2001; Schmitt, 2007). La inducció de l'activitat de la β -galactosidasa lisosomal associada a senescència (SA- β -gal, un marcador de senescència) per tractaments amb agents antitumorals correlaciona en part amb l'estat funcional de p53 (Chang et al., 1999a; Elmore et al., 2002). En presència de p53 i p16, un senyal de dany al DNA pot donar com a resultat senescència replicativa (també anomenada fase M1). En absència de p53 i p16 funcionals, les cèl·lules eludeixen la fase M1 i els telòmers poden continuar escurçant-se donant com a resultat un estat anomenat crisis (també anomenat fase M2). La fase M2 es caracteritza per presentar aberracions, trencaments i fusions cromosòmiques, donant principalment com a resultat catàstrofe mitòtica. Un nombre de gens involucrats en la regulació del cicle cel·lular també estan implicats en el control de la senescència, incloent p53, p21^{WAF1}, Rb i p16 (Roninson, 2002; Schmitt, 2007).

La senescència induïda per tractaments està considerada en l'actualitat una de les claus determinants de la resposta tumoral a la teràpia *in vitro* i *in vivo* (Roninson, 2002). Encara que les cèl·lules senescentes no proliferen, romanen metabòlicament actives i secreten proteïnes amb activitat tan supressora com promotora de tumors. L'expressió de factors promotors de tumors per les cèl·lules senescentes està associada en part als inhibidors de quinases dependents de ciclines associades a senescència com ara p21^{WAF1}.

La inducció del fenotip senescent s'observa després de tractaments amb diferents fàrmacs que s'uneixen al DNA (Gewirtz et al., 2008; Roninson et al., 2001). En el tractament crònic de varies línies cel·lulars d'hepatoma humà amb baixes dosis de doxorubicina dona com a resultat un fenotip senescent, acompanyat d'un augment de la mida cel·lular i un increment de l'activitat SA- β -gal (Eom et al., 2005). En aquestes cèl·lules, concentracions nanomolars de doxorubicina indueix el fenotip senescent, així com l'aparició de multinuclis, acompanyat d'una regulació negativa de proteïnes

implicades en el punt de control mitòtic, mentre que dosis més altes de doxorubicina activen la resposta apoptòtica (Eom et al., 2005). També trobem casos, on després d'una aturada en la fase G2/M del cicle cel·lular, les cèl·lules tractades amb la bis-antraciclina WP631 presenten un fenotip senescent transitori amb presència de síntesi de DNA (Mansilla et al., 2006c).

Les cèl·lules senescents generalment són resistents a l'apoptosi, i els fibroblasts senescents en cultius cel·lulars poden sobreviure més d'un any (Roninson, 2002). En clínica, la senescència replicativa apareix com a factor rellevant en determinar el resultat d'un tractament. El fenotip senescent ha estat detectat en seccions de tumors de mama de pacients mitjançant l'activitat SA- β -gal (te Poele et al., 2002). Aquesta activitat només es trobava present en les cèl·lules tumorals, mentre que en el teixit normal era totalment negatiu, suggerint que la senescència induïda per quimioteràpia és una resposta específica de les cèl·lules tumorals (de Bruin & Medema, 2008; te Poele et al., 2002).

Els mètodes de detecció de la senescència es basen bàsicament en tres paràmetres (Mansilla et al., 2006a) i Figura I10:

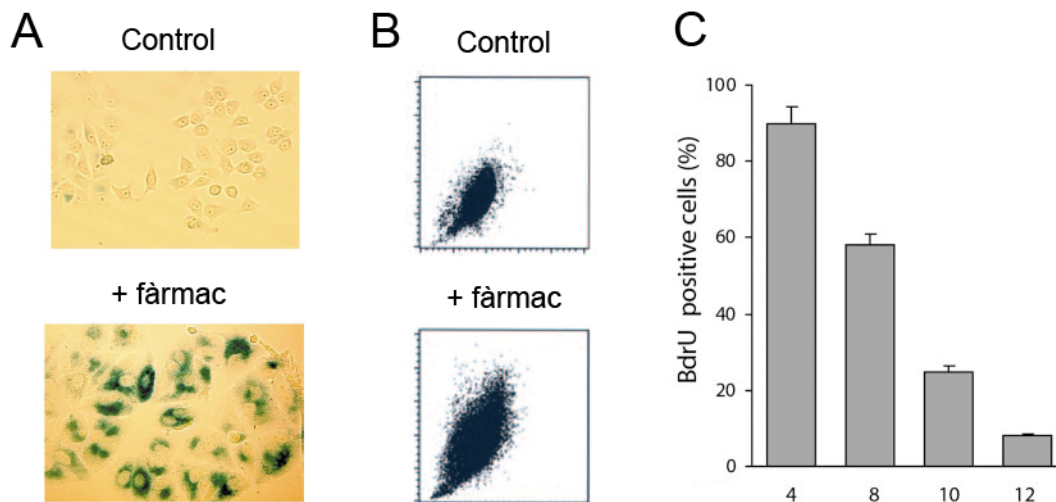


Figura I10. Diferents mètodes per la detecció de la senescència. (A) Tinció de la SA- β -GAL a pH 6.0 (Roninson et al., 2001). (B) Dispersió directa i dispersió lateral per citometria de flux (Biroccio et al., 2003). (C) Detecció de la síntesi de DNA (Biroccio et al., 2003).

- Tinció de la SA- β -GAL a pH 6.0.

- Anàlisi de la dispersió directa (FS) i dispersió lateral (SS) per citometria de flux.
- L'absència de síntesi de DNA analitzada mitjançant la incorporació de BrdU.

1.3.4. Necrosi.

La necrosi es defineix com una resposta cel·lular a varies lesions tòxiques associades a infeccions, inflamació o isquèmia, així com a canvis de potencial de membrana anormals, depleció de l'energia cel·lular o privació de nutrients (Golstein & Kroemer, 2007; Zhivotovsky, 2004). La seva definició a nivell molecular està poc elaborada i s'ha referit com un tipus de mort cel·lular incontrolada i patològica (Ricci & Zong, 2006). La principal diferència en respecte a l'apoptosi i la necrosi radica en la baixada del nivells d'ATP que presenta la necrosi. Les cèl·lules necròtiques presenten un increment de vacuoles citoplasmàtiques, degradació d'òrgans i dany a la membrana citoplasmàtica, i una inducció de la resposta inflamatòria deguda a l'alliberament del contingut cel·lular (Verheij, 2008). Encara que la necrosi està considerada un procés passiu i poc controlat, estudis recents indiquen que aquest model de mort cel·lular està, al menys en part, sota control cel·lular (Toiyama et al., 2006), i, per exemple, s'ha suggerit que el dany al DNA produït per agents alquilants provoca una forma regulada de necrosi (Zong et al., 2004). A més, és possible que la inducció d'apoptosi (White, 1996), o catàstrofe mitòtica (Eom et al., 2005; Mansilla et al., 2006b), pot anar acompanyada per necrosi.

S'ha observat necrosi en les últimes etapes de la catàstrofe mitòtica induïda per radiació (Zong et al., 2004) i després del tractament amb certes dosis de fàrmacs antitumorals (Hernández-Vargas et al., 2007; Mansilla et al., 2006b; Ricci & Zong, 2006; Vakifahmetoglu et al., 2008), però no és necessàriament l'última etapa de la catàstrofe mitòtica, particularment quan l'activitat de la caspasa 2 i/o la caspasa 3 estan induïdes (Bataller & Portugal, 2005; Castedo et al., 2004b). El fet que l'última etapa de la catàstrofe mitòtica a vegades és similar a la necrosi podria ser clau en l'activitat antitumoral d'alguns fàrmacs, perquè, a diferència de l'apoptosi, la necrosi provoca una resposta pro-inflamatòria (Roninson et al., 2001). Aquesta resposta inflamatòria pot induir la presència de cèl·lules immunes on el tumor està present incrementant l'eficàcia de la quimioteràpia. Malgrat això, una resposta inflamatòria pot també causar dany als

teixits normals o induir la producció de citosines mitogèniques, o fins i tot induir la migració cel·lular associada a la metastàsis (Ricci & Zong, 2006).

Els mètodes de detecció de la necrosi *in vitro* bàsicament són els següents (Mansilla et al., 2006a) i Figura I11:

- Permeabilitat a tincions vitals.
- Tinció amb iodur de propidi.
- Utilització del microscopi electrònic per l'observació morfològica.

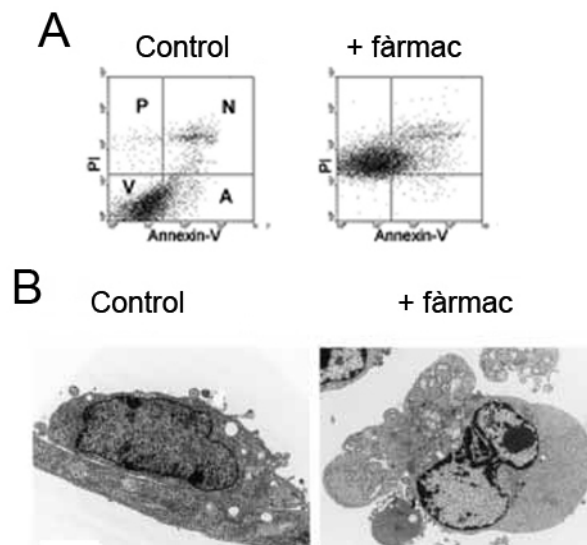


Figura I11. Diferents mètodes per la detecció de la necrosi. (A) Tinció amb iodur de propidi (V = cèl·lules viables; A = cèl·lules apoptòtiques; P = necrosi primerenca; N = Necrosi) (Mansilla et al., 2006b). (B) Imatges realitzades amb microscopi electrònic per l'observació morfològica (Zong et al., 2004).

Encara que en les mostres de teixits tumorals es sol identificar la necrosi mitjançant criteris morfològics, per exemple en àrees amb hipòxia, no existeix cap mètode específic *in vivo* per a monitorar la necrosi.

1.4. FÀRMACS ANTITUMORALS PRODUÏTS PER ACTINOMICETS.

Molts fàrmacs usats en quimioteràpia són productes naturals sintetitzats per varies espècies microbials, les quals pertanyen principalment als Actinomicets. Els Actinomicets són bacteries grampositius, resultant els productors més versàtils i comercialment importants de compostos bioactius: aproximadament dues tercers parts de tots els compostos bioactius que es coneixen són produïts per diferents espècies d'aquest grup de bacteries filamentoses (Salas & Méndez, 1998). Alguns dels productes que produeixen també són compostos que presenten activitat contra línies cel·lulars tumorals, i tenen aplicació clínica com a agents quimioterapèutics en el tractament de diversos tipus de càncers.

L'ús de fàrmacs antitumorals produïts per Actinomicets, i d'altres fàrmacs no microbials, està molt estès, però encara així s'ha de seguir investigant l'obtenció de nous fàrmacs per fer front al càncer. Entre els diferents motius, destaquem principalment dos:

1. El ràpid desenvolupament de la resistència a múltiples fàrmacs quimioterapèutics (*Multidrug Resistance* (MDR)) és el major problema en tractaments contra el càncer. Està freqüentment associada a la sobreexpressió de la P-glicoproteïna (codificada pel gen *Mdr-1*) i les proteïnes MRP (*Multidrug Resistance-associated Protein*). Els membres d'aquesta família formen part de la família multigènica de proteïnes transportadores dependents d'ATP ABC (*ATP Binding Cassette*) i la seva funció és secretar els fàrmacs de la cèl·lula mitjançant un procés ATP-depenent, reduint així la concentració intracel·lular del fàrmac (Gottesman et al., 2002).
2. L'alta toxicitat associada als fàrmacs actualment utilitzats en quimioteràpia i els efectes secundaris indesitjables.

Tradicionalment, la indústria farmacèutica ha desenvolupat nous fàrmacs mitjançant programes de cribratge combinatori, així es poden determinar modificacions químiques de compostos seleccionats per introduir canvis específics dins dels compostos aïllats. D'aquesta manera, moltes de les famílies de compostos semisintètics generades tenen una utilitat clínica. No obstant això, els mètodes utilitzats avui en dia

per obtenir nous compostos mitjançant aquests cribratges són molt costosos i necessiten molt de temps i normalment requereixen testar milers de compostos abans que un nou i prometedor fàrmac apareixi. El desenvolupament de la tecnologia del DNA recombinat ha obert un nou camp a la recerca de generació de nous components bioactius a través de la manipulació genètica de les vies biosintètiques d'agents antitumorals. Investigadors d'aquesta àrea estan intentant aprofitar l'enorme capacitat dels Actinomicets per generar nous compostos bioactius manipulant les diferents vies de biosíntesi i generar nous compostos (Albertini et al., 2006; Rensing et al., 2003b; Salas & Méndez, 1998).

1.4.1. Compostos produïts per Actinomicets.

Varis fàrmacs produïts per Actinomicets tenen aplicacions en quimioteràpia (Taula I3). La major part dels agents antitumorals obtinguts exerceixen la seva acció citotòxica interferint amb el DNA com agents intercaladors (Actinomicina D, Antraciclina), com agents entrecruadors (Mitomicina C), com agents causants de trencaments de cadena de DNA (Bleomicina, Streptonigrina) o com agents que interaccionen de forma no-intercalant a través dels solcs del DNA (Mitramicina, Cromomicina, Olivomicina).

Taula I3. Fàrmacs antitumorals produïts per Actinomicets amb aplicació clínica en tractaments quimioterapèutics (Salas & Méndez, 1998).

| Espècie productora | Fàrmac |
|---|------------------|
| <i>Streptomyces galilaeus</i> | Aclacinomicina A |
| <i>Streptomyces antibioticus</i> | Actinomicina D |
| <i>Streptoverticillium verticillium</i> | Bleomicina |
| <i>Streptomyces peucetius</i> | Daunorubicina |
| <i>Streptomyces argillaceus</i> | Mitramicina |
| <i>Streptomyces lavendulae</i> | Mitomicina C |
| <i>Streptomyces nogalater</i> | Nogalamicina |

Molts d'aquests fàrmacs antitumorals pertanyen a la família de policètids aromàtics, en la qual s'inclouen les Antraciclina (Daunorubicina, Doxorubicina,

Aclacinomicines, Nogalamicina) i el grup de l'àcid aureòlic (Mitramicina, Cromomicina, Olivomicina). Aquesta és una de les majors famílies de metabòlits secundaris, que inclou compostos amb propietats antibacteriana, antifúngica i antitumoral, i efectes immunosupressors. Els policètics presenten una gran diversitat de estructures químiques però totes impliquen, en els estadis inicials de la seva biosíntesi, la condensació de l'àcid carboxílic de cadena curta en una sèrie de reaccions catalitzades per les policètic sintases. La seva biosíntesi continua mitjançant una descarboxilació ordenada de múltiples monòmers de acetil-coenzimA, que generen cadenes de carboni d'allargades variables, diferents cadenes laterals i la formació d'un patró cíclic que posteriorment serà modificat per donar com a resultat el policètic final o cromòfor. Una altra peculiaritat estructural de la majoria d'aquests fàrmacs antitumorals és la presència de cadenes de sucres, que pertanyen a la família de les 6-desoxihexoses, presents en una gran varietat de metabòlits secundaris.

1.4.2. Aïllament de gens involucrats en la biosíntesi d'agents antitumorals.

El desenvolupament de nous fàrmacs antitumorals mitjançant la manipulació genètica requereix que les seqüències dels gens implicats en la biosíntesi estiguin disponibles i també el coneixement de les estructures i funcions de les proteïnes que codifiquen. Molts treballs s'han dut a terme dirigits a l'aïllament i caracterització de gens implicats en la biosíntesi de agents antitumorals produïts en diversos Actinomicets (Salas & Méndez, 1998). Això implica els següents aspectes:

1. L'aïllament i caracterització dels gens biosintètics.
2. L'assignació de funcions específiques, mitjançant seqüenciació de DNA i comparació amb bases de dades de proteïnes, dels productes que codifiquen aquests gens.
3. Mutacions dels gens seleccionats.
4. L'anàlisi estructural dels productes acumulats per aquests gens mutats.
5. L'expressió heteròloga dels gens sota el control de senyals transcripcionals i traduccional adequats.

1.4.3. Generació de nous fàrmacs mitjançant manipulació genètica.

1.4.3.1. Inactivació de gens dianes.

Una eina utilitzada per la generació de nous fàrmacs és la inactivació gènica. En aquest context, els gens seleccionats són inactivats específicament tan per mutacions o delecions com per inserció d'un cassette de resistència a antibiòtics. Per exemple, la 4-dimetil-premitramicinona (un derivat tetracíclic de la Mitramicina) va ser aïllat per la inactivació del gen *mtmD* que codifica per una glucosa-1-fosfat-timidina-5'-trifosfat timidilil transferasa en la via de síntesi de la Mitramicina en *Streptomyces argillaceus* (Rohr et al., 1998). L'activitat tumoral de la 4-dimetil-premitramicinona és similar al de la Mitramicina. Tot i que la inactivació de gens diana pot produir compostos nous, la interpretació de les funcions del gens basada en l'estructura del producte acumulat pot derivar a conclusions errònies. Això pot ser degut tan a l'existència d'efectes polars sobre l'expressió de gens *downstream* com per l'efecte de gens *upstream* per la síntesi de RNA anti-sentit com a conseqüència de la inserció de fragments de DNA extern.

1.4.3.2. Expressió gènica heteròloga.

Alguns fàrmacs són produïts mitjançant l'expressió d'un gen implicat en la via sintètica d'un antitumoral en un hoste heteròleg. Aquesta estratègia es basa en l'especificitat a substrat dels enzims i el fet que els fàrmacs d'aquesta família presenten una estructura comú i comparteixen part de les vies de biosíntesi. Un exemple el trobem en el fàrmac 11-hidroxiacclacinomicina que es sintetitza a partir de l'expressió del gen *dnrF* que codifica per una aclavinona-11-hidroxilasa de *Streptomyces peucetius* en el productor d'Aclacinomicina *Streptomyces galilaeus* (Hwang et al., 1995). Aquesta Antraciclina hidroxilada és més activa contra línies cel·lulars de leucèmia i melanoma que l'Aclacinomicina parental.

1.4.3.3. Biosíntesi combinatorial.

L'expressió de gens d'una via de síntesi antitumoral en un hoste alternatiu que produeix fàrmacs biosintèticament propers pot dur a terme l'aparició de nous compostos híbrids a través de l'interacció dels enzims de les dues vies. El fet que molts fàrmacs

antitumorals siguin glicosilats obre la possibilitat de crear una diversitat estructural a través de la modificació del seu patró de glicosilació. Un exemple és l'expressió de la policètid sintasa de la Mitramicina junt amb una reductasa i una ciclase en una espècie productora de Tetracenomicina que dona com a resultat un nou compost híbrid, la Tetracenomicina M (Künzel et al., 1997).

1.4.4. Problemes de secreció i supervivència.

Els microorganismes productors de compostos bioactius han de fer front a problemes de auto-resistència (han de desenvolupar mecanismes específics de resistència que els permeti sobreviure durant la producció dels compostos bioactius potencialment autotòxics). S'han publicat diversos mecanismes de resistència, incloent modificacions als llocs diana, modificacions intracel·lulars dels compostos bioactius i secreció eficient del fàrmac. Hi ha multitud d'exemples, com ara:

1. Els productors de Daunorubicina, Bleomicina i Mitramicina posseeixen un sistema de transportador ABC per facilitar la secreció del fàrmac (Fernández et al., 1996).
2. Els productors de Daunorubicina i Mitramicina tenen un sistema de reparació i excisió de DNA per minimitzar el dany al DNA durant la biosíntesi del fàrmac (Fernández et al., 1996).
3. Els productors de Mitomicina C i Bleomicina sintetitzen una proteïna d'unió al fàrmac que proporciona protecció segrestant el fàrmac al citoplasma (Sheldon et al., 1997).

1.4.5. Fàrmacs del grup de l'àcid aureòlic.

Com hem vist anteriorment la família dels policètids aromàtics està format bàsicament per tres grans grups: Antraciclina, grup de l'àcid aureòlic i Anguciclina. El grup de l'àcid aureòlic està format per cinc membres i tots els seus respectius derivats: la Mitramicina, la Cromomicina, la Olivomicina, UCH9 i la Duramicina (Remsing et al., 2003a) (Figura I12).

Totes contenen la mateixa estructura central tricíclica, o cromòfor, amb una única cadena lateral dihidroxi-metoxi-oxopentil unida al carboni 3 (Figura I12a). Aquesta estructura central varia en el residu del carboni 7 (marcat com a R₃ en la Figura I12), però sobretot varia en la naturalesa de les seves cadenes de sucres (marcades com a R₁ i R₂ en la Figura I12). Aquestes variacions estructurals provoquen subtils diferències en la unió al DNA i diferents perfils d'activitat entre els membres del grup (Remsing et al., 2003a).

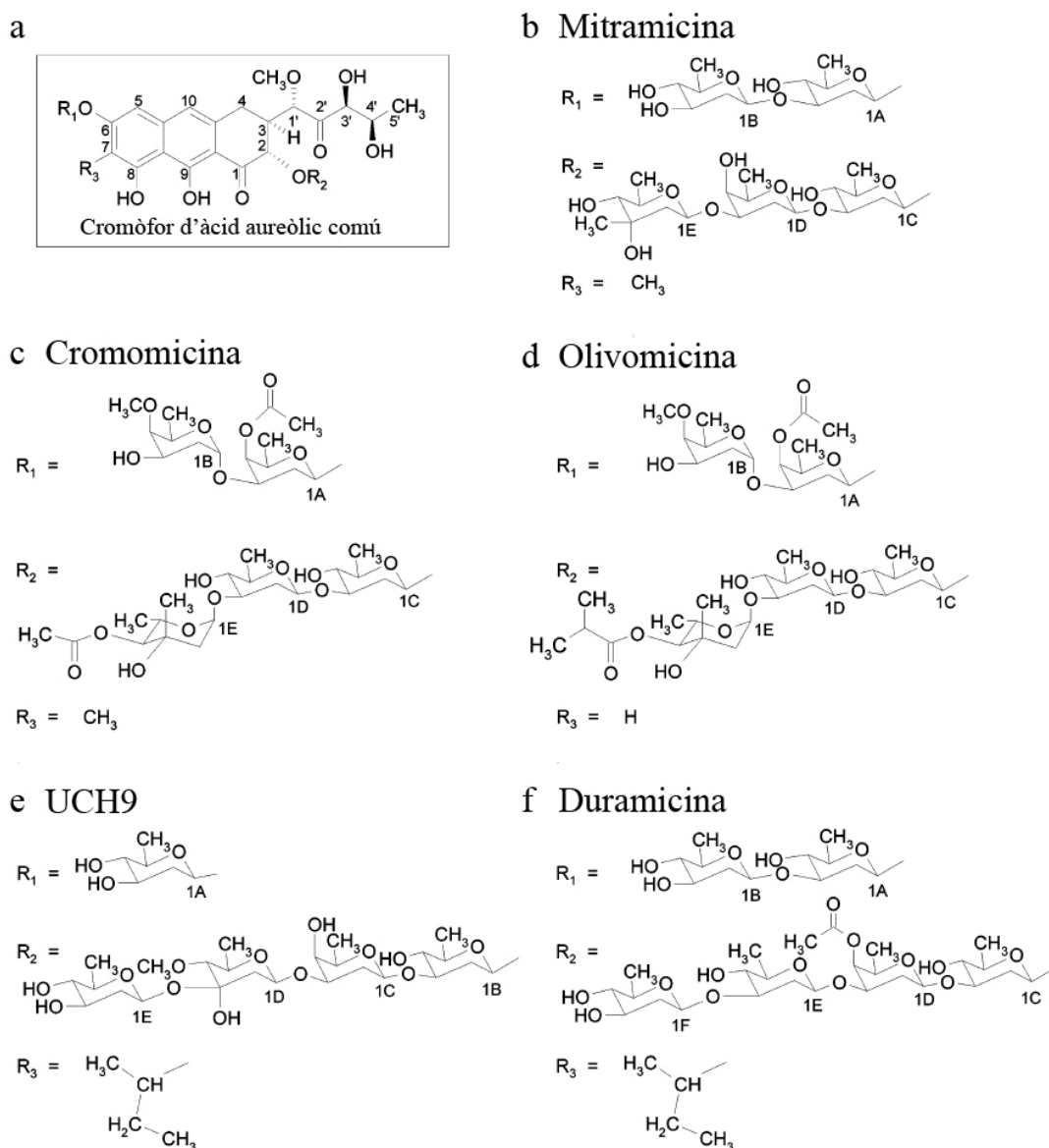


Figura I12. Estructures dels compostos naturals del grup de l'àcid aureòlic. Adaptat de (Remsing et al., 2003a), amb modificacions.

1.4.5.1. Mitramicines.

La Mitramicina A (MTA), també coneguda com Plicamicina, Mitracina, LA-7017 i PA-144, és el fàrmac parental produït en el bacteri *Streptomyces argillaceus*. És un antibiòtic antitumoral usat clínicament en el tractament de la malaltia de Paget i del carcinoma testicular (Chabner & Longo, 2001), i també s'utilitza, en fase experimental, com agent terapèutic en diverses patologies no relacionades exclusivament amb càncer (Ferrante et al., 2004; Fibach et al., 2003).

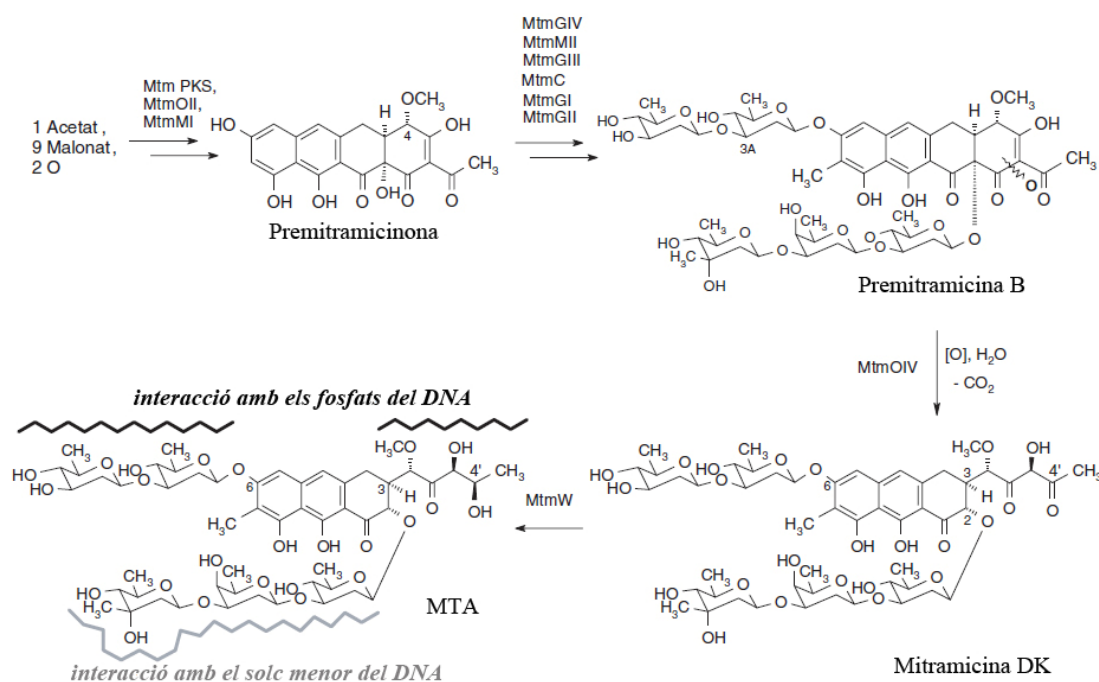


Figura I13. Biosíntesi de la MTA. L'oxigenasa MtmOIV i la cetoreductasa MtmW catalitzen la conversió de la Premitramicina B a MTA. Les regions rellevants de la interacció del DNA amb la MTA estan indicats. Adaptat de (Albertini et al., 2006), amb modificacions.

La via biosintètica de la MTA ha estat caracteritzada en la seva totalitat en els darrers anys (Fernández et al., 1998; Remsing et al., 2003b). La seva biosíntesi comença amb la condensació de múltiples monòmers d'acetil-coenzimA catalitzats per policètid sintases de tipus II. Després d'aquesta fase inicial de condensació, es forma el intermediari tetracíclic Premitramicinona, el qual es va modificant mitjançant l'addició de cadenes de sucres fins a la formació de la Premitramicina B (Figura I13). Els últims passos, els quals són catalitzats per la oxigenasa MtmOIV i la cetoreductasa MtmW, comporten l'ancoratge oxidatiu del quart anell de la Premitramicina B seguit d'una

descarboxilació i cetoreducció del pentil de la cadena lateral unida al carboni 3 donant com a resultat la MTA (Figura I13).

La principal diana cel·lular de la MTA és el DNA. Necessita d'ions bivalents, com ara Mg^{2+} , per unir-se en forma de dímer al solc menor del DNA en regions riques en G/C sense intercalació (Barceló et al., 2007). La unió amb el DNA del dímer de MTA coordinat amb el Mg^{2+} es produeix amb el cromòfor disposat paral·lelament als fosfats de la cadena de DNA i las cadenes de sucres envoltant parcialment al solc menor (Figures I13 i I14). Un cop unides al DNA, els cromòfors formen ponts d'hidrogen amb els NH_2 de les guanines, determinant així la selectivitat per seqüències riques en G/C (Barceló et al., 2007). Com a conseqüència, la MTA és capaç de bloquejar la unió de proteïnes al DNA, com ara factors de transcripció de la família de Sp1, que també tenen com a preferència aquesta seqüència (Jia et al., 2007). Aquest bloqueig o desplaçament dels factors de transcripció als promotors dels gens portaria a terme la inhibició de la transcripció dels gens regulats per aquests factors (Albertini et al., 2006). En aquest context, la MTA té el potencial d'inhibir l'expressió de molts gens involucrats en patogènesi del càncer i amb rellevància terapèutica (Albertini et al., 2006; Duverger et al., 2004; Phillips et al., 2006; Rensing et al., 2003a).

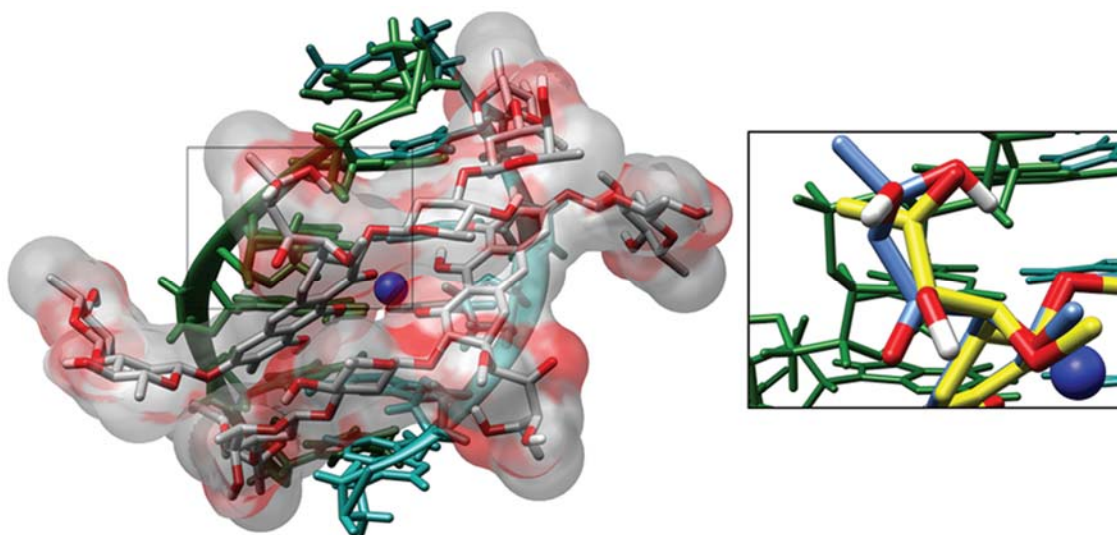


Figura I14. Estructura tridimensional d'un dímer de MTA unit al solc menor d'una seqüència $d(TCGCGA)_2$ de DNA. El panell dret mostra una vista detallada de la regió seleccionada de l'esquerra i també mostra l'estructura molecular de la MSK. Aquest panell posa en evidència les diferències entre les cadenes laterals de la MTA (en blau) i de la MSK (en groc) del carboni 3 del cromòfor (Barceló et al., 2007).

Tot i que durant anys la MTA ha tingut una utilitat clínica gràcies a què presenta activitat en contra d'una gran varietat de càncers humans especialment com hipocalcemiant, avui en dia la seva utilitat està molt restringida (DeVita et al., 2005). La MTA presenta multitud d'efectes secundaris que inclouen toxicitat gastrointestinal, hepàtica, renal i de medul·la òssia. No obstant, la disponibilitat de nous anàlegs amb una millora tan farmacològica com de les seves propietats toxicològiques i un millor coneixement dels seus efectes sobre l'expressió gènica podria obrir noves perspectives d'ús terapèutic per aquesta classe de compostos.

Aquests nous anàlegs de la MTA han estat produïts per la inactivació de gens implicats en la biosíntesi. Un aquest context, s'ha identificat un nou compost mitjançant la inactivació del gen *MtmW* que, com ja s'ha comentat anteriorment, codifica per una cetoreductasa implicada en la cetoreducció del pentil de la cadena lateral unida al carboni 3 (Figura I15). La inactivació es va dur a terme gràcies a la inserció d'un *cassette* de resistència a Apramicina (Remsing et al., 2003b). La pèrdua de la cetoreductasa *MtmW* provoca que en la cadena lateral unida la carboni 3 presenti un grup butil en lloc d'un grup pentil, on els grups funcionals ceto i alcohol apareixen en diferent posició (Barceló et al., 2007). Aquest nou compost es conegut amb el nom de Mitramicina SK (MSK) (Figura I15). Algunes de les soques analitzades també produeixen un nou compost conegut amb el nom de Mitramicina SDK (MSDK) (Figura I15) molt similar a la MSK; però en aquest cas el grup butil té dos grups ceto en lloc dels grups alcohol i ceto (Albertini et al., 2006).

Tot i que la MTA ha estat àmpliament estudiada, poc es sap dels seus anàlegs. La gran majoria dels estudis realitzats es basen en comparar els efectes d'aquests fàrmacs en línies cel·lulars per poder deduir la relació estructura-activitat entre les diferents molècules. D'aquesta manera es va comprovar que la MSK era capaç d'inhibir el creixement cel·lular i l'expressió del gen *c-src* mitjançant el desplaçament del factor de transcripció Sp1 de la mateixa manera que ho feia la MTA (Remsing et al., 2003a). Sorprenentment, tot i que la MSK té una especificitat idèntica a la MTA, presenta una relació més òptima entre la unió i la dissociació al DNA, fent que sigui menys tòxica que la MTA (Barceló et al., 2007). El *National Cancer Institute* va realitzar un cribratge sobre 60 tipus de línies tumorals humanes diferents revelant que en la majoria dels casos la MSK tenia un efecte d'inhibició del creixement fins a un ordre de magnitud

més gran que la MTA (Remsing et al., 2003b). A més, van demostrar que la MSK presentava toxicitat fins a 1500 vegades menor en assaigs *in vitro* (Remsing et al., 2003b).

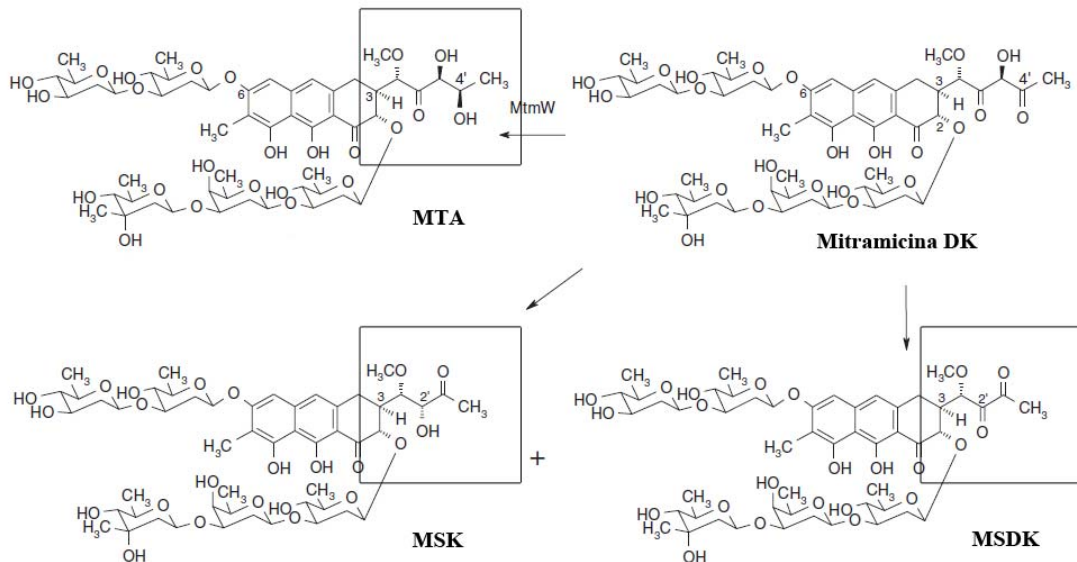


Figura I15. Biosíntesi de la MSK i MSDK, anàlegs de la MTA. La inactivació de MtmW evita la síntesi de la MTA, donant com a resultat l'acumulació del producte intermediari Mitramicina DK i la posterior transformació en MSK i MSDK. La única diferència estructural entre totes tres molècules es troba en la cadena lateral del carboni 3 (indicades amb un requadre). Adaptat de (Albertini et al., 2006), amb modificacions.

