



Cambios en la expresión génica inducidos por las mitramicinas

Carolina Vizcaíno Sarmiento Pérez

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

TESIS DOCTORAL

**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA INDUCIDOS POR LAS
MITRAMICINAS**

Carolina Vizcaíno Sarmiento Pérez

Barcelona, julio de 2014

Programa de Doctorado en Biomedicina
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Biología
Universitat de Barcelona

**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA INDUCIDOS POR LAS
MITRAMICINAS**

Memoria presentada por
Carolina Vizcaíno Sarmiento Pérez
para optar al grado de Doctora por la Universitat de Barcelona

Tesis Doctoral realizada bajo la dirección del Dr. José Portugal Minguela en el Instituto de
Biología Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC)

El Director,

El Tutor,

Dr. José Portugal Minguela

Dr. Albert Tauler Girona

La Doctoranda,

Carolina Vizcaíno Sarmiento Pérez

Barcelona, julio de 2014

A papá y mamá.
Ni siquiera más de 8500 km de
distancia han podido separarnos
...Mi amor por ustedes es mi
eterno agradecimiento...

A Tatiana.
No puedo evitar traer a mi memoria
toda nuestra infancia.
Eres la mejor hermana y amiga
que habría podido tener...

A ti Luciana.
Ni tu nombre puede expresar todo
lo que has iluminado mi vida...

"No llores porque ya se terminó, sonríe porque sucedió."

Gabriel García Márquez

AGRADECIMIENTOS

Las palabras limitan los sentimientos y resulta para mí muy difícil plasmar en un papel mi gratitud... Cuatro años compartiendo con tantas personas maravillosas que me han enriquecido infinitamente y que, indudablemente, han hecho parte de todo este proceso. Sin ellas seguramente este camino no habría sido el mismo. A todos, gracias por tantos momentos inolvidables y por hacer de esta etapa la mejor de mi vida. Gracias por la calurosa acogida y por mermar con su cariño la melancolía que causa la ausencia de los seres más queridos; la familia.

Al Dr. José Portugal Minguela, quien es el mejor ejemplo de disposición y de lo que representa un excelente jefe de grupo. Gracias por haber depositado su confianza en mí, por la paciencia, los buenos consejos, el rigor, la exigencia, la inspiración y el ejemplo intelectual. He sido afortunada al tenerlo como director de tesis, no cabe duda que fueron cuatro años muy provechosos.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y al Fondo Social Europeo por otorgarme la beca (JAE-Predoc2010) para llevar a cabo mis estudios. Al Dr. José Antonio Salas y a la Dra. Carmen Méndez de la Universidad de Oviedo/Instituto Universitario de Oncología, por la síntesis de las Mitramicinas. Al Dr. Francisco Moris y a la Dra. Luz Elena Núñez de Entrechem (Oviedo), por la Mitramicina DIG-MSK. Al Dr. Luis Alcaraz de Bioarray SL, por toda su asistencia técnica con los microarrays.

A la Dra. Sylvia Mansilla, por toda su ayuda, comentarios y enseñanza; pero ante todo por su AMISTAD. No puedo dejar pasar esta oportunidad para agradecerte tanto cariño y tan buenas y profundas conversaciones. Gracias a tí y a tu familia por ofrecerme desde el primer momento un espacio en sus vidas y por hacerme sentir como en casa. Debes saber que has sido un ángel en mi vida.

A todo el grupo del PBA3 gracias por facilitarme el trabajo y por estar dispuestos siempre a echarme una mano. Especialmente a Ali por su agradable disposición. A los ¡diegegerá! Gracias por ser un grupo de amigos genial. Gracias por la compañía, las risas, ¡la alegría! y por hacer tan amenos los largos días en el laboratorio... Nada hubiera sido lo mismo sin ustedes... Especialmente a Salva (“¡perquè jo no parlo així!”... Au Maria) a Albert Carbonell y a Paula Climent, mis compañeros de “U” (¡un espacio de trabajo absolutamente bien decorado!). A María... ya lo sabes, conectamos desde el primer momento. Nunca voy a olvidar a esa chica desparpajada y despierta. Gracias por traer alegría a mi vida, fue un placer compartir contigo y acompañarte durante estos meses en el desarrollo de tu proyecto; ¡solo puedo tener buenos deseos para tí!

A Gaylord Darras, por su sincero e incondicional amor, por su dedicación y entrega constante, por su tiempo. Gracias por haber llenado mi vida de ilusión y también, por qué no, gracias por tolerar mis espinas más agudas... A la familia Darras un gracias infinito... Nunca pensé que podría tener una familia en Francia. ¡Es todo un lujo!

A Juan Camilo Nieto, sin duda un regalo de la vida. Te adeudo la compañía constante durante estos años y tu amistad sincera. Sabes lo mucho que te quiero...

A los “Knorr-dícs”: ¡Mery Wallet!, Albert (Atxe), Carlos (el watcher), David (dictator), Rebe y Samu (el abuelo)... No encuentro palabras para agradecer que me hayan permitido entrar en sus vidas; aunque entre amigos quizás las frases de agradecimiento estén de más, tienen que saber que han llenado mi corazón “selvático” de felicidad.

A los que ya no están en Barcelona pero siguen en mi corazón: Felipe Turriago y Laura Pedraza, gracias por su amistad y por tan buenos momentos. A Skaiste Lazdauskaite, una nórdica con corazón latino, gracias por estar siempre "ahí" para mí, ¿sabes que tienes un lugarcito en Colombia para tí!

Elisabet Assens: gracias por tu especial cariño, por los bonitos despertares, por tus cafés, infusiones nocturnas y ¡sinónimos! ¡Gracias por tu arte! A la familia Gómez Camacho, a Claudia y a Juan Carlos Calderón por su hospitalidad y cariño.

A mis amigos de siempre, por su apoyo en la distancia: Diana Rodríguez, Paola Villafañe, Angela Drash, Daniel Aristizábal, Julio César Ríos y Verónica Rojas. A Manuel Alfonso Patarroyo porque ha estado siempre presente para mí. Gracias por su valiosa amistad...

Y como siempre, lo mejor para el final... A mi familia, infinitas gracias, porque este sacrificio no ha sido solo mío. Gracias por apoyarme siempre y alentarme a seguir adelante. Sin ustedes esto no hubiera sido posible.

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Regulación de la expresión génica	1
1.1.1	Elementos centrales de los promotores	1
1.1.2	RNA polimerasas eucarióticas	3
1.1.3	Transcripción génica	4
1.1.4	Etapas del proceso de transcripción génica	4
1.1.4.1	Iniciación	4
1.1.4.2	Elongación	5
1.1.4.3	Terminación	6
1.2	INHIBICIÓN DE LAS INTERACCIONES DNA-PROTEÍNA Y DE LA TRANSCRIPCIÓN POR FÁRMACOS QUE SE UNEN AL DNA	6
1.2.1	Factores de transcripción: dianas para la terapia antitumoral	8
1.2.1.1	Sp1 (<i>Specificity protein</i>)	8
1.2.1.2	E2F1	11
1.2.1.3	HIF-1 (<i>Hypoxia-inducible factor</i>)	11
1.2.1.4	NFκB	12
1.2.1.5	YY1 (<i>Yin Yang 1</i>)	12
1.2.1.6	Otros factores de transcripción	12
1.3	MOLÉCULAS QUE SE UNEN AL DNA COMO FÁRMACOS ANTITUMORALES	13
1.3.1	Compuestos de la familia del ácido aureólico	14
1.4	CICLO CELULAR	18
1.4.1	Fases del ciclo celular	19
1.4.2	Regulación del Ciclo Celular	21
1.5	MECANISMOS DE MUERTE CELULAR	24
1.5.1	Apoptosis	25
1.5.2	Necrosis y necroptosis	27
1.6	CÁNCERES DE COLON Y OVARIO	29
2.	OBJETIVOS	30
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1	FÁRMACOS	31
3.1.1	Preparación y determinación de la concentración de los fármacos	31
3.2	LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO	32
3.2.1	HCT116, células humanas de carcinoma de colon	32
3.2.2	A2780, células humanas de carcinoma de ovario	32

3.2.3	Condiciones de mantenimiento y crecimiento de los cultivos celulares	32
3.2.4	Tratamiento con tripsina-EDTA	33
3.2.5	Congelación y descongelación de líneas celulares	34
3.3	ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR	36
3.3.1	Inhibición del crecimiento celular: determinación de la citotoxicidad de las Mitramicinas	36
3.4	TRATAMIENTOS CON FÁRMACOS	37
3.4.1	Análisis de los efectos de las Mitramicinas sobre la viabilidad celular: tinción con azul de Tripano	38
3.4.2	Análisis de la distribución de fases del ciclo celular mediante citometría de flujo	39
3.4.3	Determinación del mecanismo de muerte celular	40
3.5	ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL	42
3.5.1	Extracción de RNA	42
3.5.2	Tratamiento con DNasa I	43
3.5.3	Determinación de la concentración y pureza del RNA	45
3.5.4	Reacción de transcripción reversa: síntesis de DNA complementario	45
3.5.5	PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	47
3.5.5.1	Diseño de oligonucleótidos cebadores	48
3.5.5.2	PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR): cálculo de la eficiencia de los oligonucleótidos, amplificación y cuantificación	51
3.5.6	Análisis de la expresión génica mediante <i>microarrays</i>	52
3.5.6.1	Comprobación de la calidad y consistencia de los resultados de <i>microarrays</i>	53
3.5.6.2	Cuantificación de la expresión génica	53
3.6	CAMBIOS EN LOS NIVELES PROTEICOS COMO CONSECUENCIA DEL TRATAMIENTO CON LAS MITRAMICINAS	54
3.6.1	Extracción de proteína total	54
3.6.2	Determinación de la concentración de proteínas en los extractos	55
3.6.3	Electroforesis SDS-PAGE	55
3.6.4	Transferencia de las proteínas e inmunodetección (<i>Western blot</i>)	57
3.7	ANÁLISIS DEL EFECTO DE LAS MITRAMICINAS SOBRE LA UNIÓN DE Sp1 A SU SECUENCIA CONSENSO EN EL DNA	59
3.7.1	Ensayo de movilidad electroforética (EMSA- <i>Electrophoretic mobility shift assay</i>)	59
3.8	ESTUDIO DE INHIBICIÓN POR LAS MITRAMICINAS DE LA UNIÓN DE Sp1 A SUS SECUENCIAS CONSENSO EN PROMOTORES	64
3.8.1	Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	64
3.9	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS RESULTADOS	69
3.9.1	Análisis estadístico de la qRT-PCR	69
3.9.2	Análisis estadístico de los datos de <i>microarrays</i>	70

3.9.3	Ontología de los genes	71
3.9.4	Análisis de la presencia de secuencias de unión para factores de transcripción, en los promotores de los genes	71
3.9.5	Identificación de vías de señalización afectadas tras el tratamiento de células A2780 con DIG-MSK	72
3.9.6	Análisis de agrupamiento de los genes: identificación de patrones de expresión	73
4.	RESULTADOS	74
4.1	CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE DIG-MSK SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN EN CÉLULAS HCT116 DE CARCINOMA DE COLON HUMANO Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL	74
4.1.1	Las nuevas Mitramicinas MSK y DIG-MSK inhiben la proliferación de células HCT116	74
4.1.2	DIG-MSK reduce la viabilidad celular	75
4.1.3	Evaluación del mecanismo de muerte celular mediante citometría de flujo	75
4.1.4	Análisis de la distribución de fases del ciclo celular tras el tratamiento con MSK o DIG-MSK	76
4.1.5	DIG-MSK induce mayores variaciones que MSK en la transcripción de genes involucrados en la regulación del ciclo celular	78
4.1.6	El efecto inhibitorio de DIG-MSK afecta a genes incluidos en diferentes categorías funcionales	85
4.1.7	Identificación de factores de transcripción asociados a genes reprimidos por MSK y DIG-MSK	87
4.1.8	MSK y DIG-MSK interfieren con la interacción Sp1-DNA	94
4.1.9	DIG-MSK induce cambios en los niveles de proteínas implicadas en puntos de control del ciclo celular	95
4.2	CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE DIG-MSK SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN EN CÉLULAS A2780 DE CARCINOMA HUMANO DE OVARIO Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL	97
4.2.1	DIG-MSK inhibe la proliferación de células A2780 de carcinoma de ovario humano y reduce la viabilidad celular	97
4.2.2	El tratamiento con DIG-MSK induce muerte celular apoptótica en células A2780	98
4.2.3	DIG-MSK altera la progresión del ciclo celular en células A2780	99
4.2.4	Análisis del efecto de DIG-MSK sobre células A2780 mediante <i>microarrays</i>	101
4.2.4.1	Evaluación de la calidad del RNA obtenido en células tratadas y control	101
4.2.4.2	Evaluación de la calidad de los <i>microarrays</i> y las hibridaciones	104
4.2.4.3	DIG-MSK modula la expresión génica en células A2780	105
4.2.5	Ontología de genes diferencialmente expresados tras el tratamiento de células A2780 con DIG-MSK	108
4.2.6	Identificación de factores de transcripción asociados con la regulación de genes reprimidos por DIG-MSK	114

4.2.7	Análisis mediante <i>clustering</i> de la interacción de los genes diferencialmente expresados tras el tratamiento con DIG-MSK en células A2780 de carcinoma de ovario	116
4.2.8	DIG-MSK reprime genes sobreexpresados en células A2780	123
4.2.9	DIG-MSK compite con Sp1 por la unión a los promotores de los genes en células A2780 en cultivo	124
4.2.10	DIG-MSK induce cambios en los niveles de proteínas, consistentes con los cambios en la expresión génica	126
5.	DISCUSIÓN	128
6.	CONCLUSIONES	138
7.	BIBLIOGRAFÍA	140

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	Pág
Figura 1. Componentes involucrados en la regulación de la transcripción.	3
Figura 2. Ruta biosintética de la MTA.	15
Figura 3. Organización tridimensional de un dímero de MTA unido al surco menor de la secuencia de DNA d(TCGCGA) ₂ .	16
Figura 4. Fórmula química de MTA, MSK y DIG-MSK.	18
Figura 5. Esquema representativo de las fases del ciclo celular.	21
Figura 6. Vías de señalización extrínseca e intrínseca.	27
Figura 7. Esquema de la vía de activación de la necroptosis.	28
Figura 8. Recuento de la viabilidad celular transcurridas 72 horas de tratamiento con DIG-MSK en células HCT116.	75
Figura 9. Doble tinción con Anexina-V-Fluos e IP en células HCT116 tratadas con MSK y DIG-MSK.	76
Figura 10. Cambios en la distribución del ciclo celular a lo largo del tiempo, inducidos por el tratamiento de células HCT116 con MSK o DIG-MSK.	77
Figura 11. Morfología de las células HCT116 tratadas con 11 nM DIG-MSK, observadas por microscopía de contraste de fases a diferentes tiempos.	78
Figura 12. Distribución de los perfiles de expresión génica inducidos por el tratamiento con MSK o DIG-MSK en células HCT116.	81
Figura 13. Diagramas de Venn usados para representar el número de genes cuya expresión cambió de manera diferencial tras el tratamiento de células HCT116 con 23 nM MSK o con 11nM DIG-MSK.	85
Figura 14. Número de genes cuya expresión resultó inhibida por el tratamiento con MSK o DIG-MSK, que contienen en su región promotora (-600 +1) sitios de unión potencial para diversos factores de transcripción.	88
Figura 15. Efecto de MSK y DIG-MSK en la unión del factor de transcripción Sp1 al oligonucleótido de doble cadena de 22 nt que contiene un sitio de unión potencial.	95
Figura 16. <i>Western blot</i> de los cambios tiempo-dependientes en los niveles de algunas proteínas involucradas en los puntos de control del ciclo celular, tras el tratamiento con DIG-MSK.	96
Figura 17. Análisis del mecanismo de muerte celular determinado por doble tinción con Anexina-V-Fluos e IP en células A2780 tratadas durante 72 horas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK.	99

Figura 18.	Análisis por citometría de flujo de los cambios en la distribución del ciclo celular de células A2780, tratadas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK.	100
Figura 19.	Morfología de las células A2780 tratadas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK, observadas por microscopía de contraste de fases a diferentes tiempos.	101
Figura 20.	Análisis de la calidad y concentración del RNA de células A2780 control y células tratadas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK.	103
Figura 21.	Análisis de la Calidad global de los <i>microarrays</i> .	105
Figura 22.	Diagramas de Venn representando el número de genes afectados tras el tratamiento con DIG-MSK.	106
Figura 23.	Validación mediante qRT-PCR de los datos generados por los <i>microarrays</i> , para un grupo de genes diferencialmente expresados en células A2780 tratadas con DIG-MSK.	108
Figura 24.	Efectos del tratamiento de células A2780 con 8 nM u 80 nM DIG-MSK sobre un grupo de genes regulados por Sp1, relacionados con el desarrollo de “neoplasma de ovario”.	117
Figura 25.	Redes de interacción de genes modulados por 80 nM DIG-MSK.	120
Figura 26.	Electroforesis en gel de agarosa de cromatina sonicada, aislada de células A2780.	125
Figura 27.	Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de los sitios de unión a Sp1 en los promotores de los genes <i>XIAP</i> , <i>CRABP1</i> , <i>MDK</i> y <i>KCNMA1</i> en células A2780, en presencia o ausencia de 80 nM DIG-MSK.	126
Figura 28.	Análisis de los niveles de proteína por inmunotransferencia, en células A2780.	127
Tabla 1.	Compilación de algunos compuestos que se unen al DNA (naturales y semi-sintéticos) y que actúan reprimiendo la transcripción por interferencia con las interacciones factor de transcripción-DNA.	7
Tabla 2.	Perfil de tinción de las células viables, apoptóticas y necróticas con la doble tinción con IP y Anexina-V-Fluos.	41
Tabla 3.	Oligonucleótidos cebadores usados para la cuantificación mediante qRT-PCR.	50
Tabla 4.	Dosis IC ₅₀ e IC ₇₅ para las Mitramicinas SK y DIG-MSK, en células HCT116.	74
Tabla 5.	Determinación de la concentración y calidad del RNA mediante el NanoDrop.	79
Tabla 6.	Niveles de expresión de 89 genes analizados mediante qRT-PCR en células HCT116 de carcinoma de colon humano, tratadas con	81

concentraciones equitóxicas de MSK (23 nM) y DIG-MSK (11 nM).

Tabla 7.	Genes cuya expresión disminuyó significativamente ($p < 0.05$), tras el tratamiento de las células HCT116 con MSK o DIG-MSK.	84
Tabla 8.	Genes con expresión incrementada significativamente ($p < 0.05$), tras el tratamiento de células HCT116 con MSK o DIG-MSK.	84
Tabla 9.	Clasificación funcional (GO) de los genes que disminuyeron su nivel de expresión tras el tratamiento con concentraciones equitóxicas de MSK o DIG-MSK.	86
Tabla 10.	Compilación de los factores de transcripción cuyas secuencias consenso de unión se encontraban sobrerrepresentadas en la región promotora de los genes con expresión disminuida en células HCT116, luego de ser tratadas con MSK o DIG-MSK.	89
Tabla 11.	Número de sitios de unión potencial para una variedad de factores de transcripción encontrados por la base de datos TELiS, en los promotores los genes con nivel de expresión disminuida en células de carcinoma de colon HCT116, después del tratamiento con MSK.	91
Tabla 12.	Número de sitios de unión potencial para una variedad de factores de transcripción encontrados por la base de datos TELiS, en los promotores los genes con nivel de expresión disminuida en células de carcinoma de colon HCT116, después del tratamiento con DIG-MSK.	92
Tabla 13.	Dosis IC_{50} e IC_{75} para la Mitramicina DIG-MSK, en células A2780.	97
Tabla 14.	Porcentaje de mortalidad determinado mediante tinción con azul de Tripano en células A2780 tratadas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK, a diferentes tiempos.	98
Tabla 15.	Análisis de la concentración y calidad del RNA de células A2780 control y células tratadas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK.	102
Tabla 16.	Clasificación en categorías GO de los genes reprimidos por el tratamiento de células A2780 con 80 nM DIG-MSK.	110
Tabla 17.	Clasificación en categorías GO de los genes reprimidos por el tratamiento de células A2780 con 8 nM DIG-MSK.	111
Tabla 18.	Clasificación en categorías GO de los genes sobreexpresados por el tratamiento de células A2780 con 80 nM DIG-MSK.	112
Tabla 19.	Clasificación en categorías GO de los genes sobreexpresados por el tratamiento de células A2780 con 8 nM DIG-MSK.	113
Tabla 20.	Factores de transcripción cuyas secuencias consenso de unión están sobrerrepresentadas en la región promotora de los genes inhibidos por el tratamiento con 8 nM u 80 nM DIG-MSK en células humanas A2780 de carcinoma de ovario.	115

Tabla 21.	Redes biológicas afectadas por el tratamiento de células A2780 con 8 nM u 80 nM DIG-MSK.	121
Tabla 22.	Líneas celulares tumorales que sobreexpresan genes inhibidos por DIG-MSK.	124

LISTA DE ABREVIATURAS

- A:** Absorbencia
- APC/C:** Complejo promotor de la anafase o ciclosoma
- AP-1:** Proteína activadora-1
- A/T:** Adenina/Timina
- BSA:** albúmina sérica bovina
- CDKs:** Quinasas dependientes de ciclina
- cDNA:** DNA complementario
- ChIP:** Inmunoprecipitación de cromatina
- CIP:** Inhibidores de quinasas dependientes de ciclina
- c.p.s:** cuentas por segundo
- cRNA:** RNA complementario
- Ct:** *Cycle Threshold*
- Cy3:** Cianina 3
- C/G:** Citosina/Guanina
- DCE:** *downstream core element*
- DEPC:** dietilpirocarbonato
- DIG-MSK:** Demicarosil-3-D-β-D-digitoxosil-Mitramicina SK
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- DNasa I:** desoxiribonucleasa I
- dNTP:** desoxirubonucleótidos
- DPE:** Elemento promotor corriente-abajo
- D.O:** densidad óptica
- DTT:** ditioneitol
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- EMSA:** *Electrophoretic mobility shift assay*
- ε:** coeficiente de extinción molar
- FSB:** suero fetal bovino
- GAPDH:** gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- GEO:** *Gene Expression Omnibus*
- GePS:** *Genomatix Pathway System*
- GO:** *Gene Ontology*
- GTFs:** Factores de transcripción general

Hepes: Ácido N-2-hidroxietilpiperazín-N'-2-etanosulfónico

IC: Concentración inhibitoria

Inr: Iniciador

IP: Ioduro de propidio

MAP: *Mitogen-activated protein*

MPF: Promotor de la fase M

mRNA: RNA mensajero

MSK: Mitramicina SK

MTA: Mitramicina A

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NCI: *National Cancer Institute*

ODNs: Oligonucleótidos de doble cadena

ORC: Complejo de reconocimiento del origen

PANTHER: *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*

PARP: Poly ADP ribosa polimerasa

PBS: Tampón fosfato salino

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

PIC: Complejo de pre-iniciación de la transcripción

PMSF: Fenilmetil sulfonilflúor

PSA: Persulfato amónico

qRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RIPA: *Radio-Immunoprecipitation Assay*

RNasa: ribonucleasa

RNA Pol: RNA polimerasa

rNTP: Ribonucleósido trifosfato

rRNA: RNA ribosomal

r.p.m: Revoluciones por minuto

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS (*Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)

snRNA: RNA nuclear pequeño

TBE: Tampón Tris-Borato-EDTA

TBP: Proteína de unión a la caja TATA

TE: Tampón Tris-EDTA

TELiS: *Transcription Element Listening System*

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamida

Tris: Tris(hidroximetil)-amino-metano

tRNA: RNAs de transferencia

TSS: Sitio de inicio de la transcripción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Regulación de la expresión génica

La regulación de la expresión génica juega un importante papel en la compleja red de actividades que determinan el buen funcionamiento de las células vivas. La regulación génica se controla primordialmente a nivel transcripcional, por la interacción entre factores de transcripción y las regiones promotoras de los genes, pudiendo afectar el curso de varios estados patológicos incluyendo el cáncer (Fuda et al., 2009). En este contexto, el conocimiento y comprensión de los cambios en la expresión génica que se producen durante la oncogénesis es de importancia fundamental en el diseño de nuevos fármacos antitumorales (Gniazdowski et al., 2005).

1.1.1 Elementos centrales de los promotores

En eucariotas, el promotor (sitio localizado corriente-arriba de la región codificante de los genes) actúa como plataforma para el ensamblaje del complejo de pre-iniciación de la transcripción (PIC), que incluye a los factores de transcripción general (GTFs) TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIF y a la RNA polimerasa II (pol II). La formación del PIC usualmente comienza con la unión de TFIID a la caja TATA, el iniciador (Inr) y/o el elemento promotor corriente-abajo (DPE) que se encuentra en la mayoría de promotores; seguido por la entrada de otros factores de transcripción general y la pol II a través de un ensamblaje secuencial (Juven-Gershon and Kadonaga, 2010). La formación de este complejo de unión al promotor, es suficiente para iniciar la transcripción.

Los elementos centrales de los promotores son muy diversos en estructura y cada uno de ellos puede contener secuencias encontradas solamente en un sub-conjunto de genes. La caja TATA es uno de los elementos centrales del promotor, es una secuencia rica en A/T localizada de 25 a 30 nucleótidos corriente-arriba del sitio de inicio de la transcripción (+1). Contiene una secuencia consenso TATA(A/T)A(A/T)(A/G) reconocida por la proteína de unión a la caja TATA (TBP) (Juven-Gershon and Kadonaga, 2010; Sandelin et al., 2007). Existen muchos genes transcritos por el sistema de la pol II que no contienen secuencias TATA reconocibles, por lo cual los promotores de este tipo de genes se conocen como promotores TATA-less (Weinzierl, 1999). La transcripción de los promotores TATA-less

depende también de la presencia de TBP cuyo contacto con el DNA ocurre en la región -30, independientemente de la secuencia presente en esta posición (Weinzierl, 1999). Se cree que en los promotores *TATA-less* TBP no se recluta a través de su capacidad de unión a secuencias específicas en el DNA, sino que se ubica en el PIC mediante otros mecanismos (por ejemplo, a través de TFIID o del elemento Inr). TBP posteriormente interactúa con el DNA mediante un contacto relativamente “inespecífico” (Thomas and Chiang, 2006; Weinzierl, 1999).

Un segundo elemento central del promotor es el Inr que contiene una secuencia rica en pirimidinas alrededor del sitio de inicio de la transcripción. Inr, como hemos visto, es capaz de dirigir con precisión la iniciación de la transcripción sólo o en conjunto con TBP u otros elementos centrales del promotor. Un tercer elemento es el DPE, conteniendo la secuencia consenso A/G)G(A/T)CGTG, localizada de 29-35 nucleótidos corriente-abajo de sitio de inicio de la transcripción (Fig. 1) (Fuda et al., 2009; Novina and Roy, 1996; Thomas and Chiang, 2006).

Otros dos elementos centrales del promotor llamados MTE (*motif ten element*) y DCE (*downstream core element*) (Fig. 1), están situados corriente-abajo del sitio de inicio de la transcripción. El MTE con la secuencia consenso C(G/C)A(A/G)C(G/C)(G/C)AACG(G/C) encontrada en la región entre +18 y +29, funciona en conjunto con Inr para aumentar la transcripción mediada por la RNA pol II (Lim et al., 2004). Estos elementos pueden sustituir funcionalmente la carencia de la caja TATA en algunos genes y/o la carencia del elemento DPE, así como trabajar sinérgicamente con la caja TATA y el DPE, de una manera Inr independiente, fortaleciendo la actividad del promotor (Lim et al., 2004).

El sexto elemento central del promotor (el elemento B de reconocimiento (BRE)), es reconocido por GTFs diferentes (TFIIB, entre otros), a través del contacto del promotor con secuencias del DNA que se encuentran flanqueando la caja TATA. Es importante indicar que el elemento DPE y la caja TATA no son solamente específicos para la iniciación de la transcripción sino que también actúan como elementos reguladores para aumentar la función transcripcional (Smale and Kadonaga, 2003).

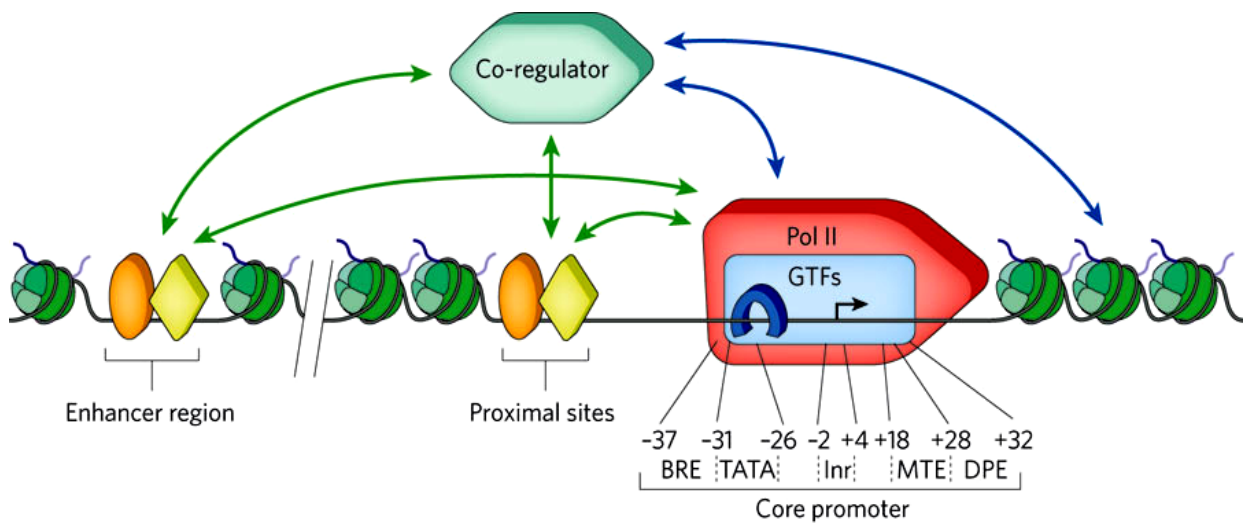


Figura 1. Componentes involucrados en la regulación de la transcripción. La figura indica los factores de transcripción general (GTFs) que se unen a elementos centrales con secuencias específicas en el promotor tales como, el elemento B de reconocimiento (BRE), la caja TATA, el iniciador (Inr), el *motif ten element* (MTE) y el elemento promotor corriente-abajo (DPE), señalando sus localizaciones proximales relativas al sitio de inicio de la transcripción (TSS, flecha en color negro). Los reguladores transcripcionales (óvalos naranja y diamantes amarillos), que bien son activadores o represores, se unen a secuencias de DNA específicas localizadas cerca del promotor del gen o a varias regiones distantes, llamadas *enhancers*. Los reguladores pueden interactuar (flechas verdes) con los GTFs, tales como TFIID (rectángulo azul), la proteína de unión a la caja TATA (TBP, herradura azul), y/o el complejo pol II (“cohetes” rojo) para aumentar o reprimir la transcripción. Ellos también interactúan (flechas verdes) con co-reguladores (hexágono verde) que puede interactuar a su vez (flechas azules) con la maquinaria de transcripción general o con factores que modifican la cromatina. Los co-reguladores pueden también unirse a los nucleosomas (verde) estabilizando la unión del co-regulador al gen. Tomado de (Fuda et al., 2009).

Indudablemente, el ensamblaje del complejo de transcripción ocurre sobre la región central del promotor, que sirve como un punto de convergencia para los eventos regulatorios y es de vital importancia para el entendimiento de los mecanismos de transcripción únicos en cada gen (Juven-Gershon and Kadonaga, 2010).

1.1.2 RNA polimerasas eucarióticas

Aunque los mecanismos de transcripción del DNA son similares entre procariontes y eucariotas, la maquinaria para realizar este proceso es considerablemente más compleja en eucariotas, quienes (desde levaduras hasta humanos) poseen tres RNA pols asociadas al núcleo, denominadas RNA pol I, II y III (Thomas and Chiang, 2006).

La RNA pol I se encuentra localizada en el nucleolo y participa activamente en la producción de los precursores del RNA ribosomal (rRNA). Aunque la RNA pol I reconoce una sola secuencia promotora, sus productos pueden llegar a representar cerca del 80% del RNA que está siendo sintetizado por una célula en crecimiento. Por otra parte, la RNA pol II, con localización específica en el nucleoplasma, se encarga de la producción de RNA mensajero (mRNA) y parte de la fracción del RNA nuclear pequeño (snRNA). Así, la RNA pol II determinará qué proteínas van a ser producidas por una célula, basándose en su habilidad de transcribir genes a partir del reconocimiento de una amplia variedad de secuencias promotoras. Finalmente, la RNA pol III, con localización nucleoplasmática, posee un papel fundamental en la formación de los RNAs de transferencia (tRNA), de la subunidad 5S del RNA ribosomal y de algunos snRNAs (Eick et al., 1994).

1.1.3 Transcripción génica

El control de la transcripción génica se realiza por dos vías diferentes, una llamada control en *Cis*, la cual se realiza por secuencias de DNA de control tales como las secuencias de promotores, las secuencias incrementadoras (*enhancers*), las secuencias silenciadoras (*silencers*) y las secuencias aisladoras (*insulators*). La otra es la vía de control en *Trans*, se realiza por proteínas que controlan la expresión de genes que incluyen: a) el código histona, b) las modificaciones covalentes del DNA y c) el control por pequeños RNA extracromosomales (Mellor et al., 2008).

1.1.4 Etapas del proceso de transcripción génica

1.1.4.1 Iniciación

La transcripción se encuentra a su vez dividida en las siguientes etapas: (1) localización y unión de la RNA pol a la secuencia del promotor, (2) desenrollamiento de la doble cadena de DNA para la formación de un complejo abierto, (3) inicio del proceso de transcripción, seguido de la (4) separación de la RNA pol de la región promotora (Herbert et al., 2008).

El proceso comienza cuando las RNA pols (como holoenzimas) empiezan a buscar las regiones promotoras localizadas de forma dispersa sobre la secuencia del genoma. Para ello,

se han propuesto dos alternativas: la RNA pol II puede unirse al DNA en una región no promotora, para luego (1) “deslizarse” aleatoriamente sobre la hebra, hasta que se encuentre con su región de interés o (2) “transferirse” de un segmento génico a otro (que pueden ser distantes o no) en el momento en que la enzima se una simultáneamente a otra región de DNA, proceso que repetirá hasta alcanzar una secuencia promotora (Herbert et al., 2008; Sakata-Sogawa and Shimamoto, 2004).

De esta forma, la fase de elongación del RNA se inicia con la unión de un ribonucleósido trifosfato (rNTP) complementario a la secuencia del DNA molde en la posición +1. Luego, ocurre la incorporación de un rNTP complementario a la posición +2 y la formación de un enlace fosfodiéster entre ambos rNTPs. Después, tanto el di-nucleótido de RNA formado como el DNA molde, se desplazan una posición hacia el canal de salida de la RNA pol, cediendo la posición para la incorporación de un nuevo rNTP y la formación de otro enlace fosfodiéster con el tercer rNTP (Borukhov and Nudler, 2008). Este ciclo de adición y desplazamiento (conocido también como translocación) se repite varias veces hasta que el RNA producido alcance una longitud aproximada entre 7 y 10 nucleótidos. Es importante mencionar que a lo largo de este proceso, la región promotora todavía se encuentra firmemente unida a la RNA pol II.

A partir de este punto puede ocurrir (1) una liberación espontánea del fragmento de RNA recientemente sintetizado junto con la nueva síntesis de otro RNA por parte de la misma RNA pol, en un proceso conocido como iniciación abortiva; o (2) la continuación del proceso de síntesis de RNA junto con la liberación del complejo enzimático (Revyakin et al., 2006).

1.1.4.2 Elongación

Como se mencionó anteriormente, durante el proceso de transcripción típico de un gen, la RNA pol desplaza en su interior al DNA molde, con el fin de generar una secuencia de RNA mediante la incorporación sucesiva de rNTPs y la formación de enlaces fosfodiéster. Durante la elongación del RNA, tanto el complejo de ácidos nucleicos como el complejo proteico se encuentran fuertemente estabilizados por varias interacciones, como (1) la unión del DNA (en una región corriente-abajo del sitio de inicio de la transcripción) con la RNA pol II, (2) el anillaje de ~9 nucleótidos entre la cadena de RNA naciente y la cadena de DNA molde, al interior del complejo enzimático y (3) la unión del RNA (~5 nucleótidos) con la

RNA pol II hacia el canal de salida de la enzima (Wilson et al., 1999). Esta estabilización, aunque impide una disociación de los distintos componentes moleculares, le permite una movilidad importante a todo el complejo transcripcional, reflejado en los eventos de translocación (Wilson et al., 1999).

En términos generales el proceso de elongación del RNA incluye complejos proteicos adicionales e intercala diferentes etapas de síntesis activa de RNA con etapas de interrupción (pausas) de la transcripción génica. Estos pasos de interrupción de la actividad enzimática por la RNA pol II funcionan como mecanismos para controlar los niveles de expresión génica, ocurriendo de forma frecuente. La importancia de este fenómeno radica en que, además de reducir las tasas de producción de mRNA, las pausas permiten el reclutamiento de factores adicionales de transcripción que puedan llegar a modificar el final de la transcripción y determinar las distintas modificaciones post-transcripcionales sobre los productos de RNA (Guenther et al., 2007; Herbert et al., 2008).

1.1.4.3 Terminación

Aunque el complejo de elongación transcripcional es muy estable, la RNA pol II debe finalmente disociarse en respuesta a señales de terminación, lo que da lugar a la liberación de la secuencia de RNA y del DNA molde. El proceso de terminación depende de la secuencia de nucleótidos, denominada terminación intrínseca, basada en la formación de una horquilla sobre la secuencia del RNA naciente. Básicamente la horquilla de terminación se genera por la formación de un fragmento de RNA rico en G y C, seguido por una secuencia rica en U, que en conjunto formarán un híbrido inestable de RNA-DNA al interior de la RNA pol II, conllevando a la disociación de todo el complejo transcripcional (Santangelo and Roberts, 2004; Touloukhonov et al., 2001).

1.2 INHIBICIÓN DE LAS INTERACCIONES DNA-PROTEÍNA Y DE LA TRANSCRIPCIÓN POR FÁRMACOS QUE SE UNEN AL DNA

Como hemos indicado, la unión de factores de transcripción a secuencias específicas del DNA es un paso crucial a través del cual se reclutan proteínas accesorias y se activa o reprime la maquinaria transcripcional. Muchos agentes anticancerígenos usados comúnmente en clínica se unen al DNA y, de esta manera regulan la expresión génica por interferencia en

las interacciones DNA-proteína, representando una de las más prometedoras estrategias terapéuticas (Yan and Higgins, 2013). En este sentido, si se tiene en cuenta que la mayoría de las vías de señalización oncogénica convergen en factores de transcripción que controlan los patrones de expresión génica característicos para la formación y progresión tumoral, así como para la metástasis, su inhibición selectiva podría inhabilitar la expresión de un gen diana. La Tabla 1 presenta algunos compuestos obtenidos de forma natural y algunos semi-sintéticos que se unen al DNA, compitiendo con factores de transcripción por los sitios consenso de unión.

Tabla 1. Compilación de algunos compuestos que se unen al DNA (naturales y semi-sintéticos) y que actúan reprimiendo la transcripción por interferencia con las interacciones factor de transcripción-DNA.

Factor de transcripción	Secuencia consenso	Compuestos que se unen al DNA
E2F1/E2F4	TTTGGCGC ¹	Doxorubicina, Nogalamicina, Mitoxantrona, Distamicina, Netropsina y Ecteinascidina.
EGR1	TGCGTGGGCGT ¹ CGCCCCGC (Bellorini et al., 1995)	Equinomicina, Nogalamicina, Cromomicina A3.
NFE1 (GATA1)/GATA4	GATAAG (Minuzzo et al., 2000)	Distamicina, Doxorubicina, Daunorubicina.
HIF-1	(A/G)CGTG (Lee et al., 2009)	Doxorubicina, Daunorubicina, Equinomicina, Mitomicina C.
NFκB	GGGGATTCCCC ¹ CTCAGCCAATCAGCG ¹	Actinomicina D, Doxorubicina, Daunorubicina.
NF-Y	CTCAGCCAATCAGCG ¹	Ecteinascidina.
Sp1	(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)(Mansilla and Portugal, 2008)	Cromomicina A3, Mitramicina A, Mitramicina SK, Actinomicina D, Elsamicina A, Doxorubicina, Daunorubicina, Mitroxantona, Ecteinascidina, WP631.
TBP/(TFIID)	GTATAAAAG ¹	Distamicina A, Netropsina, Cromomicina A3, Nogalamicina, Ecteinascidina.

¹ Acorde a la base de datos JASPAR (<http://jaspar.binf.ku.dk/>).
Tabla adaptada de (Portugal et al., 2011).

Una estrategia alternativa para inhibir la unión de los factores de transcripción a los promotores de los genes es la utilización de factores de transcripción “señuelo” (*decoy*). Esta estrategia consiste en emplear oligonucleótidos de doble cadena (ODNs) u horquillas de cadena sencilla para que mimeticen los sitios de unión para los factores de transcripción. Estos ODNs contienen secuencias consenso de reconocimiento que son diana para determinados factores de transcripción o, contienen secuencias modificadas que permiten una mayor interacción proteína-DNA (Mann, 2005). Los “señuelos” transfectados se unen a sus factores de transcripción correspondientes y previenen su interacción con los promotores diana, regulando la expresión génica. Una desventaja de esta estrategia radica en la dificultad de obtener factores de transcripción “señuelo” que sean estables *in vivo*, desventaja compartida con otros agentes basados en oligonucleótidos, lo que se ha convertido en uno de los mayores desafíos para su aplicación clínica (Mann, 2005).

1.2.1 Factores de transcripción: dianas para la terapia antitumoral

Las proteínas de unión al DNA juegan un papel importante en la biología y en otras actividades tales como la replicación del genoma, la transcripción de genes y la reparación del DNA. Una de las más diversas clases de proteínas de unión al DNA son los factores de transcripción que regulan la expresión génica y, como hemos indicado, su inhibición selectiva puede inhabilitar la expresión de un gen diana. A continuación mencionaremos algunos de los más importantes factores de transcripción, relacionados con procesos oncogénicos.

1.2.1.1 Sp1 (*Specificity protein*)

Sp1 es el miembro prototipo de una familia de factores de transcripción (Sp1, Sp2, Sp3, Sp4) que reconocen la secuencia consenso (G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)C/T y modulan la transcripción génica (Wierstra, 2008). Sp1 y Sp3 muestran preferencias de unión por la secuencia consenso en el DNA de manera similar pero no idéntica y se expresan de manera ubicua en células humanas, compitiendo por secuencias diana comunes. La expresión de *Sp1* está autorregulada, debido a que su promotor contiene regiones de unión tanto para Sp1 como para Sp3 (Safe and Abdelrahim, 2005; Wierstra, 2008). Interesantemente, se ha demostrado experimentalmente que en algunos casos, los sitios de unión para Sp1 se superponen con los sitios de unión para otros factores de transcripción, como es el caso de la proteína NF-Y; la

competición por dichos sitios representa un mecanismo de regulación de propio gen *Sp1* (Nicolás et al., 2003).

Los miembros de esta familia se caracterizan por la presencia de tres regiones reguladoras: (1) diversos dominios de transactivación, (2) un dominio implicado en la multimerización y en la modulación de la transactivación (3) y un dominio de unión al DNA ubicado en la región C-terminal que se encuentra altamente conservado en los miembros de esta familia, conteniendo tres dedos de zinc (Wierstra, 2008). En general, Sp1 es un activador, mientras Sp3 puede actuar ya sea como activador o represor transcripcional. *Sp3* codifica para tres distintos factores de transcripción: una proteína Sp3 de larga duración que puede activar la transcripción y dos isoformas descritas como inhibidores de la transcripción génica. Sin embargo, esta observación no es universal y parece depender del contexto celular (Wierstra, 2008).

Se conoce que la interacción de Sp1 con el DNA puede ser inhibida por algunos fármacos que se unen preferentemente a regiones en el DNA ricas en C/G (Gniazdowski et al., 2005; Mansilla and Portugal, 2008). Así, algunos antibióticos que se unen al surco menor del DNA como la Cromomicina A3 y la Mitramicina A (MTA) pueden competir con Sp1 por sus sitios de unión potencial (Mansilla and Portugal, 2008). En efecto, MTA se ha usado de manera rutinaria para demostrar el papel de los sitios de unión a Sp1 en el control de la expresión génica, por su potente efecto sobre la unión al promotor (Ghosh et al., 2010). Adicionalmente, se conoce que fármacos como la Bisantraciclina WP631, la Actinomicina D y la Elsamina A, pueden también inhibir la transcripción activada por Sp1 (Portugal et al., 2011).

Sp1 participa en la regulación de la mayor parte de los genes involucrados en el ciclo celular así como de varios oncogenes y genes supresores de tumor. Se ha analizado la habilidad de diferentes proteínas reguladoras del ciclo celular para interactuar con Sp1, afectando la actividad de su promotor (Tapias et al., 2008). En su estudio, los autores observaron mediante co-inmunoprecipitaciones que las proteínas CDK4, SKP2, Rad51, BRCA2 y p21, interactúan con Sp1 y activan su promotor. Entre las proteínas conocidas por interactuar con Sp1: E2F-DP1, ciclina D1, Stat3 y Rb se confirmó que activan el promotor de Sp1 mientras p53 y NFκB lo inhiben. Adicionalmente, las transfecciones transitorias de las proteínas CDK4, Rad51, E2F-DP1, p21 y Stat3 incrementaron la expresión del mRNA de *Sp1*

endógeno en células HeLa. De otro modo, la sobreexpresión de NFκB y p53, disminuyeron los niveles del mRNA de *Sp1* (Tapias et al., 2008). Los múltiples efectos observados de los reguladores del ciclo celular sobre *Sp1*, sugieren que este factor de transcripción puede ser un mediador clave de ciclo celular y de los cambios en la expresión génica (Safe and Abdelrahim, 2005; Tapias et al., 2008).

Se han identificado diversas dianas activadas por *Sp1* *in vivo* en células HeLa tratadas con un RNA de interferencia (siRNA) dirigido contra el mRNA de *Sp1* (Oleaga et al., 2012). El tratamiento con siRNA disminuyó la expresión de *Sp1* y de los genes activados por él. Se encontró que los genes reprimidos participan en procesos de proliferación celular y cáncer, procesamiento del mRNA, metabolismo lipídico, metabolismo glucosídico, transcripción y traducción. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se validó la unión de *Sp1* a los promotores de los genes *RAB20*, *FGF21*, *IHPK2*, *ARHGAP18*, *NPM3*, *SRSF7*, *CALM3*, *PGD* y el propio *Sp1*. Adicionalmente, se confirmó mediante ensayos de movilidad electroforética (*shift assay*), la unión a los promotores de los genes *RAB20*, *FGF21* y *IHPK2*, involucrados en proliferación celular (Oleaga et al., 2012).

En términos generales, la regulación de la transcripción dependiente de *Sp1* puede verse afectada por los cambios en la abundancia de *Sp1*, como ocurre durante el ciclo celular con un incremento durante la fase G1, en la actividad de unión al DNA o en la actividad de transactivación. Esto puede involucrar las interacciones directas proteína-proteína con otros factores nucleares que no necesariamente se encuentran unidos al promotor. *Sp1* interactúa con proteínas que incluyen varias proteínas virales, miembros de la maquinaria de transcripción basal, varios activadores de la transcripción y reguladores del ciclo celular (Tapias et al., 2008). En el último caso, la proteína Rb interactuaría físicamente con *Sp1* en un complejo, lo que aumentaría la activación transcripcional por *Sp1* (Noé et al., 1998).

Las modificaciones post-transcripcionales también regulan la actividad de *Sp1*, incluyendo la glicosilación, acetilación, fosforilación y sumoilación (Li et al., 2004a; Spengler and Brattain, 2006). Los complejos ciclina E-CDK2 y ciclina A-CDK2 que son importantes reguladores del ciclo celular, fosforilan a *Sp1* formando complejos estables con los factores de transcripción unidos al DNA (Banchio et al., 2004).

1.2.1.2 E2F1

La familia de factores de transcripción E2F (E2F1-E2F4) está involucrada en la regulación del ciclo celular y la síntesis del DNA en células mamíferas. Estos factores de transcripción se unen al sitio consenso: TTTCGCGC en los promotores (Portugal et al., 2011). La proteína supresora de tumores retinoblastoma (Rb) se une al factor E2F1 previniendo su interacción con la maquinaria transcripcional (Mansilla and Portugal, 2008). En la ausencia de Rb, E2F1 media la trans-activación de genes diana para E2F1 que resulta en el paso al punto de control G1/S del ciclo celular. Consistente con que el sitio consenso de unión en los promotores contiene A/T y C/G, se observa que las interacciones del promotor E2F son sensibles a los antibióticos Netropsina y Distamicina A así como a las Antraciclinas Doxorubicina y Nogalamicina que se unen a regiones C/G y a algunos agentes alquilantes (Gniazdowski et al., 2005).

1.2.1.3 HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor*)

HIF-1 es un heterodímero de HIF-1 α y HIF-1 β que regula la transcripción de los elementos de respuesta a hipoxia (HRE), los cuales contienen la secuencia consenso (A/G)CGTG (Lee et al., 2009). HIF-1 regula la transcripción de los HREs de secuencias regulatorias de genes diana, que resultan en la transcripción de genes tales como *VEGF*, aumentando la vascularización local y el transporte sistémico de oxígeno, así como de genes implicados en glicólisis, migración e invasión, procesos importantes en la progresión del tumor y la metástasis (Kong et al., 2005). La Doxorubicina y la Daunorubicina inhiben la transcripción génica mediada por HIF-1, bloqueando la unión al DNA y la migración de células angiogénicas circulantes (Lee et al., 2009).

La Equinomicina inhibe la actividad de unión de HIF-1 al DNA y la expresión de genes diana regulados por este factor de transcripción (Kong et al., 2005; Nickols et al., 2007). Sin embargo, se ha observado la Equinomicina además de inhibir a HIF-1 en condiciones hipóxicas en células HepG2 de hepatoma humano, actúa también reduciendo la actividad transcripcional de factores como la proteína activadora AP-1 y la proteína c-myc (Vlaminck et al., 2007). Además, la Equinomicina parece aumentar la actividad de HIF-1 en condiciones de normoxia (Vlaminck et al., 2007).

1.2.1.4 NFκB

Las proteínas NFκB son una familia de factores de transcripción eucarióticos estructuralmente relacionados, que se encuentran involucrados en el control de un gran número de procesos celulares. NFκB juega un papel clave en la regulación de la respuesta inmune a la infección, mientras su incorrecta regulación se ha relacionado con el cáncer (Gilmore, 2006). Estas proteínas se unen como dímeros a aproximadamente 10 pb de longitud en regiones del DNA conocidos como sitios κB. Existe evidencia de que muchos productos naturales son inhibidores efectivos de NFκB; mientras la Doxorubicina induce apoptosis de cardiomiocitos a través de la activación de NFκB, en células cancerígenas, NFκB usualmente inhibe la apoptosis inducida por dicho fármaco (Minotti et al., 2004).

1.2.1.5 YY1 (*Yin Yang 1*)

El factor de transcripción YY1, también forma parte de la clase de proteínas *GLI-Krüppel*. El dominio de unión al DNA de YY1 se encuentra en su región C-terminal. YY1 se expresa de manera ubicua y es una proteína evolutivamente conservada, consistente de 414 aminoácidos con múltiples dominios (Zhang et al., 2011). Este factor de transcripción está implicado en diferentes funciones biológicas que incluyen la proliferación celular y la apoptosis y, funciona activando o reprimiendo la transcripción de genes dependiendo del estímulo recibido por las células y su asociación con otros factores celulares. Desde su descubrimiento, se sugirió un papel biológico de YY1 en el desarrollo y progresión tumoral, debido a su actividad regulatoria sobre múltiples proteínas relacionadas con vías de señalización sobreexpresadas en el cáncer (Zhang et al., 2011).

1.2.1.6 Otros factores de transcripción

Se han analizado los efectos de los antibióticos que se unen al DNA sobre las interacciones DNA-proteína para varios factores de transcripción aparte de los descritos anteriormente (Tabla 1). El factor de transcripción NFE (GATA1) juega un importante papel en el desarrollo eritroide mediante la regulación del cambio de la hemoglobina fetal a hemoglobina adulta. La Distamicina A puede inhibir la unión de este factor a su sitio consenso en el DNA (Gniazdowski et al., 2005). El factor de crecimiento de respuesta temprana (EGR1) es un factor inducido en respuesta al estímulo de crecimiento. Su inducción

se considera importante en el sostenimiento y desarrollo tumoral (DeVita et al., 2005). EGR1 se une a secuencias consenso ricas en C/G (Welch et al., 1994). Sorprendentemente, la unión de EGR1 a sus sitios consenso no es afectada por la Actinomicina D, independientemente de la presencia de sitios GpC dentro de las secuencias (Welch et al., 1994). Sin embargo, se ha demostrado que la Cromomicina A3 puede inhibir la interacción DNA-EGR1 (Chiang et al., 1996).

Por otra parte, el factor conocido como NF-Y se une a la secuencia consenso CCAAT, reclutando a la RNA pol II y a las proteínas de unión a la caja TATA en algunos promotores (Kabe et al., 2005). En el promotor *HSP70* en condiciones de inducción de calor, la Ecteinascidina bloquea la transcripción a concentraciones biológicamente relevantes (Minuzzo et al., 2000).

1.3 MOLÉCULAS QUE SE UNEN AL DNA COMO FÁRMACOS ANTITUMORALES

Si bien la quimioterapia continúa siendo un tratamiento clínico fundamental, es evidente que es bastante inespecífica, dado que actúa tanto en células tumorales como en células normales y además, genera diversos efectos secundarios tales como toxicidades gastrointestinal, hepática, renal y de la médula ósea (DeVita et al., 2005). En la actualidad, se usan como fármacos antitumorales diversas moléculas de bajo peso molecular que se unen de manera reversible al DNA (Portugal, 2009). Estos fármacos interfieren con las interacciones DNA-proteína y pueden modular la expresión de determinados genes, inhibiendo de manera selectiva los complejos formados entre los factores de transcripción y el DNA (Hurley, 2002; Portugal, 2009). Esto puede ser una vía para suprimir la expresión de genes diana, específicamente de genes que se encuentran sobreexpresados en algunos tipos de cáncer. La supresión de la expresión de ciertos genes puede alcanzarse mediante el uso de fármacos capaces de competir con determinados factores de transcripción por sus sitios de unión potencial en determinados promotores.

Las moléculas que pueden afectar las interacciones DNA-proteína de forma reversible se clasifican en dos grupos: los intercaladores y las moléculas que se unen al surco menor del DNA. Dentro del primer grupo se encuentran las Antraciclinas (Daunorubicina y Doxorubicina), que son potentes agentes quimioterapéuticos en uso clínico, que actúan

intercalándose en regiones ricas en C/G del DNA (Mansilla and Portugal, 2008; Minotti et al., 2004; Waring, 1981). Por su parte, dentro del segundo grupo y de acuerdo a su preferencia por regiones en el DNA ricas en C/G o A/T, se pueden identificar dos categorías principales de antitumorales. La primera comprende los antibióticos miembros de la familia del ácido aureólico como la MTA (también conocida como Plicamicina), la Cromomicina A3 y la Olivomicina. La característica principal de este tipo de moléculas, es que se unen a tractos ricos en C/G en el surco menor del DNA requiriendo la presencia de dicaciones, normalmente Mg^{++} (Barceló et al., 2007; Ghosh et al., 2010; Jones et al., 1995; Waring, 1981). La segunda categoría, incluye dos antibióticos estrechamente relacionados, la Netropsina y la Distamicina A, los cuales muestran especificidad por sitios de unión en el DNA ricas en A/T y con una longitud de 4-5 pb (Waring, 1981).

1.3.1 Compuestos de la familia del ácido aureólico

Son poliquétidos tricíclicos producidos por diferentes especies de *Streptomyces*. Se encuentran glicosilados con dos cadenas de oligosacáridos de longitud variable, unidas al poliquétido aromático (Remsing et al., 2003). Estas moléculas interactúan con el surco menor del DNA en regiones ricas en C/G sin intercalación, y con un requerimiento de iones divalentes (Waring, 1981). La especificidad por las regiones ricas en C/G del DNA, hace de estos compuestos buenos inhibidores específicos de regiones promotoras, evitando la unión de factores de transcripción que incluyen la familia Sp1 que participa en procesos oncogénicos (Barceló et al., 2007). Este bloqueo o desplazamiento en la unión de los factores de transcripción a los promotores de los genes resulta en la inhibición de la transcripción de los genes regulados por estos factores (Albertini et al., 2006).

La MTA es uno de los miembros más representativos de la familia del ácido aureólico, es producida por la bacteria *Streptomyces argillaceus* y se ha usado como un agente quimioterapéutico para el tratamiento de varios tipos de cáncer y también en el tratamiento de la enfermedad de Paget, pero su uso ha sido muy reducido debido a su toxicidad potencial (DeVita et al., 2005). La MTA genera una variedad de efectos secundarios que incluyen toxicidad gastrointestinal, hepática, renal y de la médula ósea. Sin embargo, esta molécula es objeto de nuevos ensayos clínicos en tumores sólidos, particularmente en el sarcoma de Ewing (<http://www.ClinicalTrials.gov>; Identificador: NCT01610570), indicando un renovado interés en este tipo de compuestos para el tratamiento del cáncer.

De particular interés, el tratamiento de cáncer gástrico humano con Bevacizumab, un anticuerpo neutralizante usado para reducir la angiogénesis, suprime el crecimiento del tumor en ratones atímicos de una manera dosis dependiente (Wang et al., 2008a). Los análisis de expresión génica revelaron que el tratamiento con dicho anticuerpo genera la sobreexpresión de *Sp1* en el tejido tumoral (Wang et al., 2008a). Por su parte, el tratamiento combinado con el anticuerpo y MTA produjo un efecto sinérgico en la supresión del tumor y como consecuencia la supresión de la expresión de *Sp1* y la represión los genes regulados por este factor de transcripción (Wang et al., 2008a).

La biosíntesis de la MTA comienza con la condensación de múltiples monómeros de Acetil-coenzima A catalizados por poliquétidos sintetas de tipo II. Después de esta fase inicial de condensación, se forma el intermediario tetracíclico conocido como Premitramicinona, que modifica mediante la adición de cadenas de azúcar hasta la formación de la Premitramicina B (Fig. 2). Los últimos pasos, catalizados por la oxigenasa MtmOIV y la cetoreductasa MtmW, conllevan al anclaje oxidativo del cuarto anillo de la Premitramicina B, seguido de una decarboxilación y cetoreducción del pentil de la cadena lateral unida al carbono 3, dando como resultado la molécula de MTA (Fig. 2) (Albertini et al., 2006).

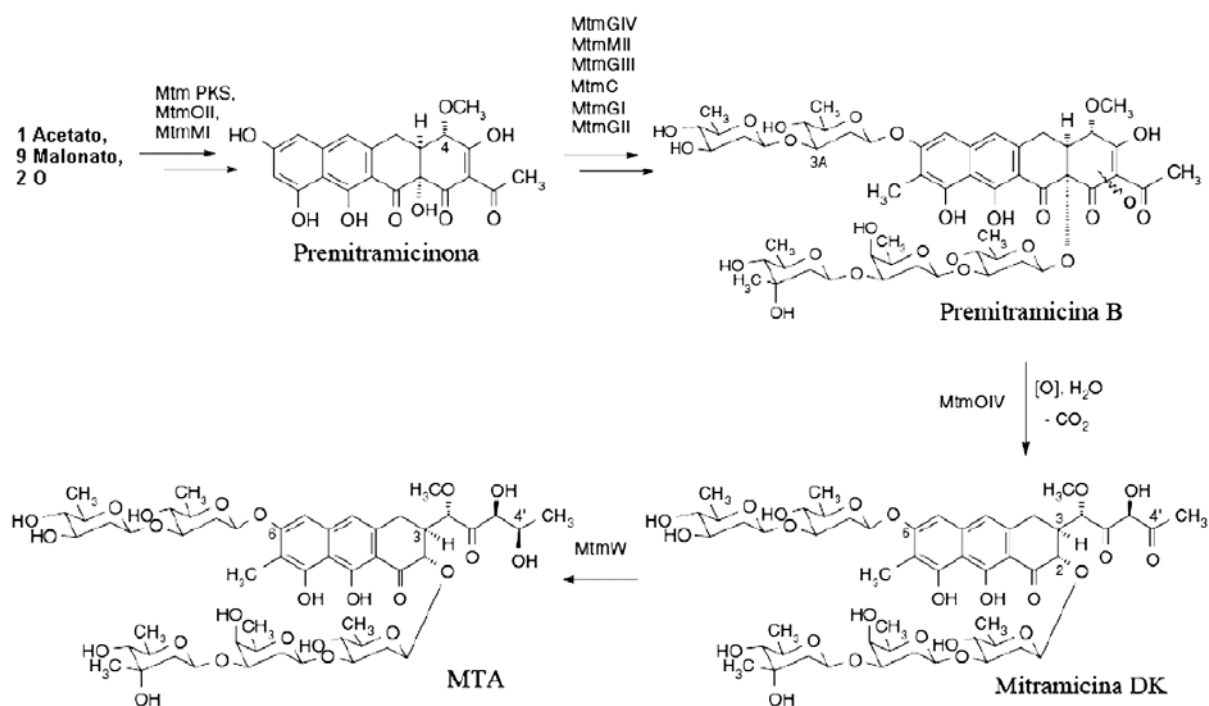


Figura 2. Ruta biosintética de la MTA. Se muestran las enzimas catalizadoras en cada una de las etapas. Adaptado de (Albertini et al., 2006).

La unión con el DNA del dímero de MTA coordinado con el Mg^{++} se produce con el cromóforo dispuesto paralelamente a los fosfatos de la cadena de DNA y las cadenas de azúcar rodeando parcialmente el surco menor (Figuras 2 y 3). Una vez unidos al DNA, los cromóforos forman puentes de hidrógeno con el NH_2 de las guaninas, determinando así la selectividad por las secuencias ricas en C/G (Barceló et al., 2007). Como consecuencia, la MTA es capaz de bloquear la unión de las proteínas al DNA, como factores de transcripción de la familia Sp1, que también tienen como preferencia esta secuencia (Jia et al., 2007). En este contexto, la MTA tiene el potencial de inhibir la expresión de muchos genes involucrados en la patogénesis del cáncer y con relevancia terapéutica (Albertini et al., 2006; Duverger et al., 2004; Phillips et al., 2006).

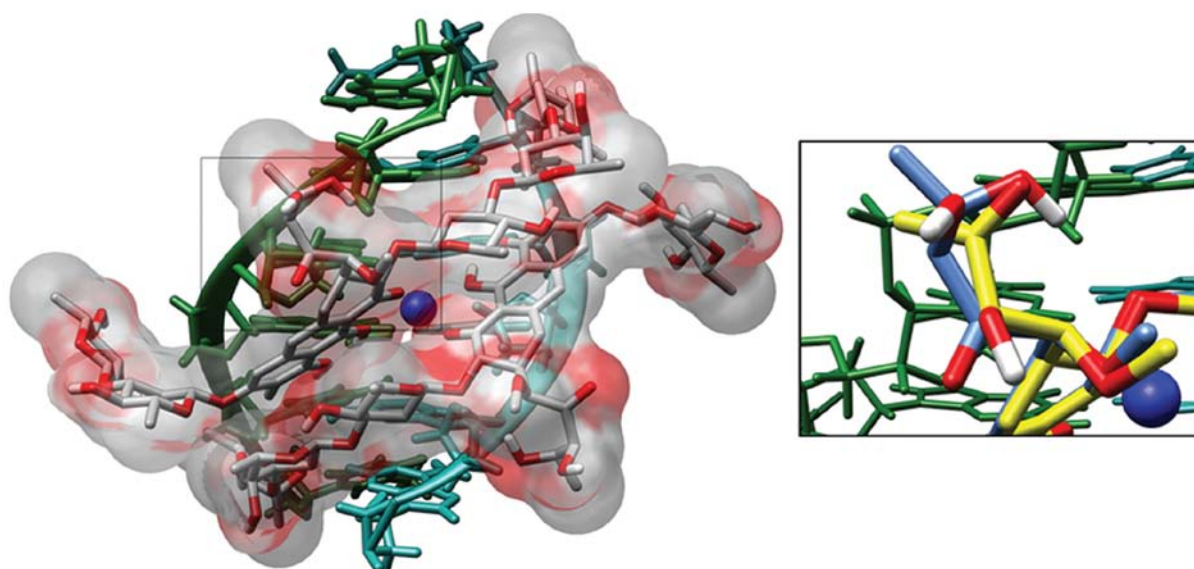


Figura 3. Organización tridimensional de un dímero de MTA unido al surco menor de la secuencia de DNA d(TCGCGA)₂. El panel de la derecha muestra una vista ampliada de la región seleccionada en el panel de la izquierda y también incluye los átomos de MSK estructuralmente equivalentes. Este panel pone en evidencia las diferencias entre las cadenas laterales de MTA (átomos de carbono en azul) y de MSK (átomos de carbono en amarillo) del carbono 3 del cromóforo. Tomado de (Barceló et al., 2007).

El conocimiento obtenido de la vía biosintética de la MTA y de los *clusters* de genes involucrados en ella (estudiados mediante secuenciación, mutación por inactivación insercional y expresión génica), ha permitido el diseño de experimentos de biosíntesis combinatoria con el objetivo de generar nuevos análogos bioactivos (Lombó et al., 2006).

La mayoría de los intermediarios biosintéticos en la ruta de síntesis de la MTA han sido aislados y caracterizados y algunos de estos componentes han mostrado una mayor actividad antitumoral en comparación con la MTA (Lombó et al., 2006). Tal es el caso de la Mitramicina SK (MSK) (Fig. 4), obtenida mediante inactivación del gen *MtmW*, a través de la

inserción de un *cassette* de resistencia a Apramicina (Remsing et al., 2003). La pérdida de la cetoreductasa MtmW provoca que la cadena lateral unida al carbono 3 presente un grupo butil en lugar de uno pentil, donde los grupos funcionales ceto y alcohol aparecen en diferente posición (Barceló et al., 2007). La MSK ha mostrado ser más activa que la MTA en diferentes tipos de cáncer y menos tóxica en ratones, indicando un mejoramiento significativo del índice terapéutico (superior en cuatro órdenes de magnitud, aproximadamente) (Remsing et al., 2003). La actividad biológica de esta molécula parece ser superior a la de la MTA (Bataller et al., 2008), pese a mostrar una menor afinidad por el DNA (Albertini et al., 2006; Barceló et al., 2007).

Una nueva molécula denominada **demicarosil-3-D-β-D-digitoxosil-Mitramicina SK (DIG-MSK; EC-8042)** (Fig. 4), se ha obtenido mediante la alteración por biosíntesis combinatoria de la ruta biosintética de la MSK. La nueva molécula presenta actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*, similar a otros análogos estructuralmente relacionados. Sin embargo, DIG-MSK es 10 veces menos tóxica *in vivo* que la MTA y 25% menos tóxica que la MSK (Núñez et al., 2012). Por otra parte, la evaluación *in vivo* de la actividad antitumoral de DIG-MSK mediante ensayos de *hollow fiber* y en modelos *xenografts* de cáncer de colon y melanoma, indica que DIG-MSK es un prometedor antitumoral (Núñez et al., 2012).

MSK y DIG-MSK difieren del fármaco parental MTA en la cadena lateral del carbono 3. Los nuevos análogos (Fig. 4) contienen la misma estructura central tricíclica (cromóforo) y, la diferencia radica en una modificación del azúcar en la posición E, eliminando el metilo de uno de los anillos tipo piranosa (Núñez et al., 2012).

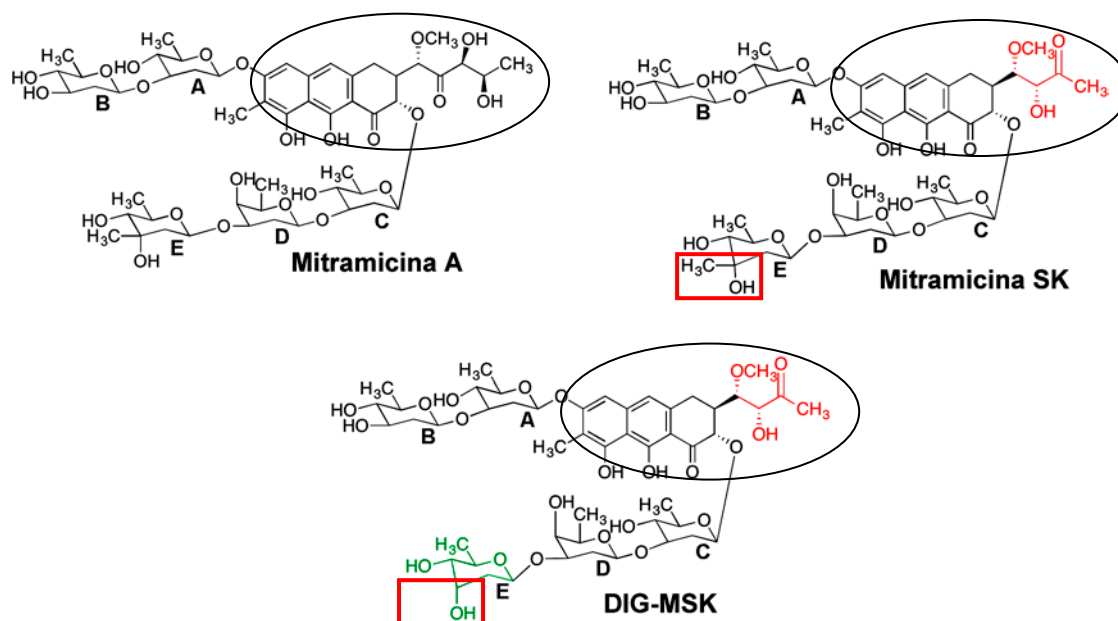


Figura 4. Fórmula química de MTA, MSK y DIG-MSK. Los cuadros rojos ubicados en el extremo del azúcar E (en verde en DIG-MSK), indican la diferencia. En rojo, la cadena lateral del carbono 3, diferencia estructural con respecto a la molécula parental (MTA). Los óvalos indican la estructura central tricíclica (cromóforo) presente en todos los miembros de la familia del ácido aureólico.

Nuestro grupo de investigación está interesado en la búsqueda y evaluación de moléculas de bajo peso molecular, capaces de unirse al DNA con mayor especificidad y con una afinidad comparable a la de los factores de transcripción. Si se logra inhibir con mayor eficacia la interacción de factores de transcripción con el DNA, esta estrategia puede ser utilizada para mejorar el diseño racional de fármacos y la generación de nuevos agentes terapéuticos, tal y como lo resaltan varias publicaciones (Gottesfeld et al., 2000; Hurley, 2002; Portugal et al., 2009; Priebe et al., 2001).

1.4 CICLO CELULAR

La capacidad de las células para realizar réplicas exactas de ellas mismas es fundamental para la vida y el desarrollo de los organismos. El ciclo celular es el proceso mediante el cual las células duplican sus componentes celulares así como su material genético que será transferido a las siguientes generaciones. Para que exista una correcta proliferación celular es necesaria la síntesis de moléculas que le permitan no solo crecer y dividirse sino también asegurar que las nuevas células sean copias exactas a su predecesora (Ewen, 2000).

Para que una célula se divida o entre en ciclo celular debe recibir estímulos que permitan la transcripción y traducción de genes involucrados en este proceso. Estos estímulos son transmitidos por moléculas conocidas como mitógenos, los cuales dan la señal a la célula para que se prepare e inicie su división. Estas moléculas de actividad paracrina o endocrina son reconocidas por receptores, los cuales desencadenan una serie de señales intracitoplasmáticas mediadas por proteínas MAP (*mitogen-activated protein*) que activan genes cruciales para la división celular (Ej. Ciclinas) (Wilkinson and Millar, 2000). La mayoría de estas sustancias mitogénicas son factores de crecimiento entre los que se encuentran: EGF, IGF-I y II, FGF, PDGF, HGF, NGF, VEGF, entre otros; sin embargo, sustancias tales como aminoácidos, hormonas, ácido retinoico y ácido lisofosfatídico también pueden inducir la división celular (Wilkinson and Millar, 2000).

1.4.1 Fases del ciclo celular

Para que una célula se divida correctamente debe seguir una serie de pasos que le permiten duplicar su material genético sin errores. Si llega a presentarse un error (por ejemplo, en la replicación del DNA o ausencia de mitógenos) la célula se detiene y corrige este error; de no ser corregido la célula podría convertirse en una célula cancerígena por lo cual esta deberá inducir su propia muerte bajo condiciones controladas.

Como se mencionó anteriormente, el ciclo celular comprende una primera fase denominada interfase, la cual a su vez se encuentra dividida en intervalos mejor conocidos como *Gaps* de los cuales se pueden distinguir 3 (G₀, G₁ y G₂). Dentro de las otras fases se encuentra una en donde se lleva a cabo la síntesis del DNA llamada fase S y una última fase, en donde se lleva a cabo la división nuclear y la citocinesis denominada fase M o mitosis (Fig. 5) (Israels and Israels, 2001).

- Gap₀ (G₀): Aunque no se puede decir que G₀ haga parte del ciclo celular, sí es un estado previo a este. En esta fase se encuentran aquellas células que están quiescentes o temporalmente fuera del ciclo celular. Si estas células reciben estímulos por mitógenos pasan a un estado activo del ciclo celular denominado Gap₁ (Israels and Israels, 2001). Sin embargo, existen células altamente especializadas que una vez diferenciadas no vuelven a entrar nuevamente a ciclo celular manteniéndose en G₀.

- **Gap1 (G1):** Este es el intervalo entre la mitosis y la síntesis de DNA, células en G1 se preparan para su división, sintetizan RNA y proteínas necesarias para el control y la progresión del ciclo. Durante esta fase se mantiene una constante estimulación por mitógenos que permiten el paso a la siguiente fase (Israels and Israels, 2001). Una vez en esta etapa la célula debe dividirse. Durante los primeros momentos de G1 las subunidades orc1-orc6 forman el complejo de reconocimiento del origen (ORC) que como su nombre indica, reconoce los orígenes de replicación. Posteriormente proteínas como Cdc6 y Cdt1 son orientadas por el ORC hacia el origen de replicación, estas dos proteínas a su vez reclutan las proteínas Mcm 2-7, formando el complejo complejo prerreplicativo (pre-RC) el cual se mantiene inactivo hasta la fase de síntesis o fase S (Machida and Dutta, 2005).
- **S:** Durante esta fase la célula incrementa su material genético mediante la completa replicación del DNA (Israels and Israels, 2001). Ya formado el complejo pre-RC durante G1, en la fase S y mediante varias fosforilaciones este se activa, permitiendo la llegada de varios factores, así como de polimerasas. Posteriormente, es activado el factor de replicación celular C (RF-C) el cual a su vez activa el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) dando inicio a la síntesis de DNA (Kaufmann and Paules, 1996).
- **Gap2 (G2):** Este es el intervalo entre la replicación del DNA y la mitosis (Israels and Israels, 2001). En esta fase persiste la síntesis de RNA y proteínas necesarias para la progresión del ciclo. Esta fase se caracteriza por cambios marcados en la estructura celular, un aumento en el tamaño así como en la cantidad de estructuras celulares y de material genético.
- **Mitosis o fase M:** En mitosis, el DNA es dividido en dos nuevas células. Esta fase va acompañada de cambios estructurales tanto en el núcleo como en el citoplasma, los cuales permiten una correcta segregación de los cromosomas. La Mitosis está a su vez constituida por cuatro fases: (1) profase, donde la cromatina se condensa en cromosomas y desaparece la envoltura nuclear, (2) metafase, en la cual los cromosomas se alinean en el plano ecuatorial, (3) anafase, donde las cromátides

hermanas se separan y el centrómero se divide y (4) telofase, en la que la cromatina se expande y el citoplasma se divide (citocinesis).

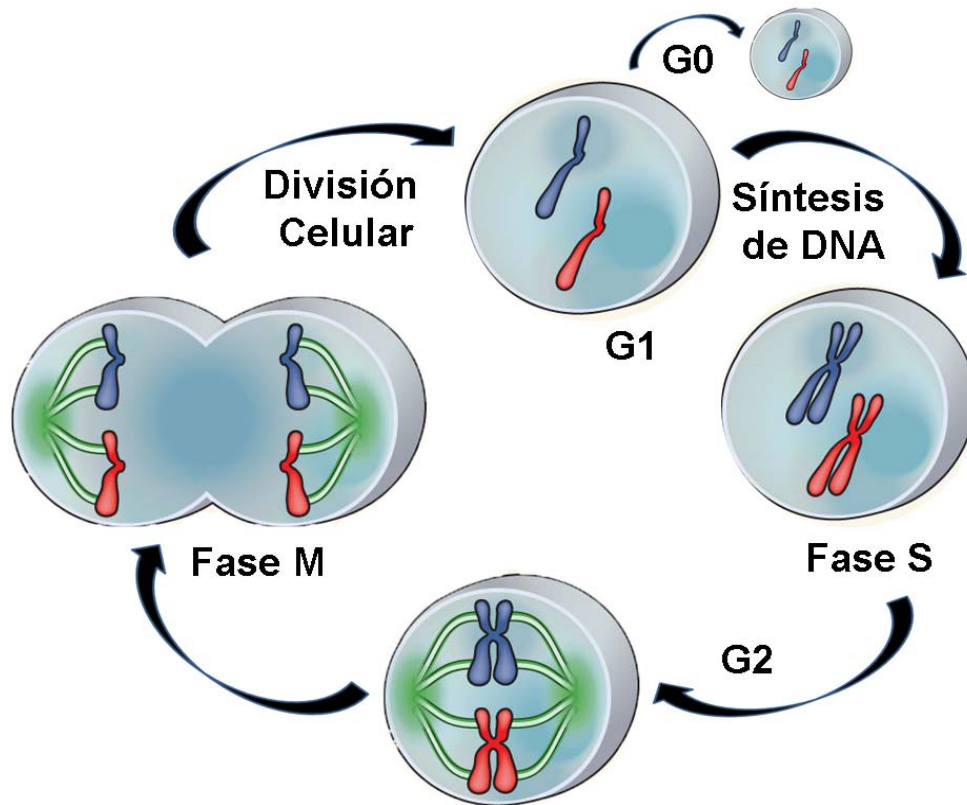


Figura 5. Esquema representativo de las fases del ciclo celular. Las células sufren ciclos de división en los cuales la fase S (cuando el DNA se replica) se separa de la fase M (cuando la división celular mitótica tiene lugar) mediante dos fases *gap*, G1 y G2. Fuera del ciclo se muestra una célula en estado quiescente (G0). Imagen adaptada de (Bosco, 2010).

1.4.2 Regulación del Ciclo Celular

La división celular es un evento regulado, donde varios puntos de control distribuidos a lo largo del ciclo son los encargados de permitir o bloquear el paso de una fase a otra, además de proveer más tiempo en caso de que sea necesaria la reparación del DNA (Kaufmann and Paules, 1996). Varias proteínas han sido descritas como controladores positivos o negativos del ciclo. La gran mayoría de eventos durante el ciclo celular depende de la activación secuencial de quinasas denominadas CDKs (quinasas dependientes de ciclinas) que al ser activadas por las ciclinas controlan positivamente el ciclo y permiten el paso de una fase a otra (Miller and Cross, 2001). Estas serin-treonin quinasas fosforilan diferentes sustratos que permiten el paso a través de las diferentes fases. Se conocen 11

miembros de CDKs que mantienen una concentración constante durante todo el ciclo; entre estas se destacan las CDK1, -2, -4 y -6 que permiten el paso a través de las diferentes fases. Por otra parte, 15 ciclinas fase-dependientes están en constante síntesis y degradación, por lo tanto, diferentes complejos ciclina/CDK actúan en las diferentes fases del ciclo celular, de tal forma que la ciclina D (D1– D3) interactúa con CDK4 o 6, las ciclinas A y E activan a CDK2, ciclinas A y B forman complejos con CDK1 y por último la ciclina H forma el complejo CAK con la CDK7 (Sridhar et al., 2006).

Entre las proteínas que regulan el ciclo negativamente y que evitan el paso de una fase a otra se pueden identificar tres tipos. El primero comprende una familia conocida como Cip/Kip (p21, p27, p57) las cuales tiene como diana las diferentes CDKs deteniendo el ciclo en cualquiera de sus fases. El segundo tipo son las proteínas INK4 (p15, p16, p18, p19) que inhiben la función de las CDKs que actúan en G1 (Sridhar et al., 2006). El tercer tipo corresponde a una serie de proteínas que reciben el nombre de proteínas supresoras de tumores, siendo las más importantes p53 y la proteína Rb (Bosco, 2010); estas dos proteínas desempeñan un papel crucial dentro de ciclo celular permitiendo el paso entre fases, así como deteniéndolo en caso de ser necesario (Israels and Israels, 2001).

Uno de los principales puntos de control en el ciclo celular es “el punto de control G1” y corresponde al primer punto de control del ciclo. Para pasar este punto, la célula debe recibir estímulos constantes generados por los mitógenos y el DNA debe estar intacto. En una etapa temprana de G1 la estimulación por mitógenos promueve la síntesis de la ciclina D, esta forma un complejo con la CDK4 o la CDK6. El complejo CDK4-6/ciclina D fosforila la proteína Rb o proteínas relacionadas a esta (como p107), las cuales interactúan con proteínas de la familia E2F. La hiperfosforilación de Rb por el complejo CDK/ciclina permite la liberación del factor E2F promoviendo la síntesis de otras CDKs así como de proteínas involucradas en la síntesis del DNA. Pero si la célula deja de recibir la estimulación para su división o es detectado un daño en el DNA, el complejo CDK4-6/ciclina D es inhibido por una INK4 evitando la fosforilación de Rb y por lo tanto, la síntesis de proteínas necesarias para la progresión del ciclo. En una etapa tardía de G1, un nuevo complejo CDK/ciclina fosforila Rb permitiendo el paso a la fase S. El proceso es similar al ejercido por el complejo CDK4-6/ciclina D, en este momento la fosforilación de Rb es llevada a cabo por el complejo CDK2/ciclina E permitiendo el paso a S. Este complejo también puede ser inhibido en caso necesario, y esta inhibición la producen por proteínas CIP (inhibidores de quinasas

dependientes de ciclina) tales como p21 o p27, que al igual que p16 evitan la fosforilación de Rb (Ewen, 2000).

Otro de los puntos de control es conocido como el punto de control de la fase S. En este punto fosforilaciones por parte de los complejos CDK2/ciclina A y Cdc7/Dbp4 (complejo Dbp4) inactivan las proteínas Cdc6 y Cdt1, activando el pre-RC. Esto permite, entre otras cosas, la llegada RF-C, que activa al PCNA y a su vez permite la activación de la DNA pol II iniciando la replicación del DNA. Para evitar que regiones ya sintetizadas del DNA vuelvan a sintetizarse los altos niveles del complejo CDK2/ciclina A bloquean el ensamblaje del pre-RC durante esta fase y durante G2. Así mismo una proteína denominada *Geminin*, inhibe a Cdt1 evitando la formación del complejo Mcm 2-7 (Kaufmann and Paules, 1996; Machida and Dutta, 2005).

El siguiente punto de control se se ubica en la fase G2 y permite el paso hacia mitosis. Este punto esta controlado por la formación del factor promotor de la fase M (MPF). Este complejo proteico esta formado por la CKD1 anteriormente conocida como cdc2 y por las ciclinas A y B siendo la mas frecuente la ciclina B, permitiendo que la célula presente todos los cambios estructurales que debe sufrir durante la mitosis (Jones, 2004; Kaufmann and Paules, 1996). Sin embargo, la sola formación del complejo CDK/ciclina no es suficiente para estar activo; dos proteínas Wee1 y Myt1 mantienen inactivado el MPF mediante fosforilaciones de la treonina 14 y la tirosina 15. Fosfatasas de la familia Cdc25 eliminan los grupos fosfatos de los aminoácidos 14 y 15, y esto sumado a la fosforilación de la treonina 161 activan el MPF (Jones, 2004). Se ha sugerido que el MPF regula a Cdc25c y que éste a la vez activa a MPF generando una retroalimentación que promueve la entrada a la mitosis (Kaufmann and Paules, 1996). Este complejo al igual que los otros complejos formados por CDKs/ciclinas es regulado por proteínas inhibitorias y en caso de que existan errores en la replicación del DNA o que haya un ambiente desfavorable, el MPF es inhibido. La inhibición se da por proteínas de la familia CIP tal como p21 (Ganier and Mechali, 2008), por fosforilación de la treonina 14 y la tirosina 15 o por la proteína GADD45 que inhibe a CDK1. Si todas las condiciones están dadas, el complejo MPF promueve el paso de G2 a M culminando con la formación de dos nuevas células.

Por último, el punto de control APC/C (complejo promotor de la anafase o ciclosoma), se localiza en la metafase. Una vez replicado y condensado el DNA, las cromátides hermanas

se mantienen unidas por una familia de proteínas denominadas Smc (*Structural Maintenance of Chromosomes*) conocidas como cohesinas y dos subunidades Scc1/Rad21 y SA/STAG/Scc3 (Stemmann et al., 2006). Durante la primera parte de la mitosis, las cohesinas están distribuidas a lo largo de los cromosomas pero, en la metafase estas proteínas se encuentran solo en la región centromérica (Harper et al., 2002). Si los cromosomas están correctamente anclados al huso mitótico y alineados en el plano ecuatorial de la célula, estas cohesinas son inactivadas permitiendo el paso de metafase a la anafase (Stemmann et al., 2006). En concentraciones altas de CDKs, la proteína Cdc20 se une al complejo APC/C activándolo; se cree que fosforilación por parte del complejo CDK1/ciclina B es la que permite la activación de complejo APC/C^{Cdc20}. Este complejo permite la unión de monómeros de ubiquitina en un determinado sustrato, de tal forma que APC/C^{Cdc20} ubiquitina una proteína denominada securina la cual mantiene inactiva a una separasa. Una vez la securina es reconocida por el proteosoma, la proteína separasa queda activa inhibiendo la subunidad Scc1 de las cohesinas permitiendo la segregación del material genético (Stemmann et al., 2006).

1.5 MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

La muerte de las células en los organismos multicelulares es un hecho normal que, en principio, no produce alteración de las funciones. El número de células en los diferentes tejidos está determinado por un balance homeostático entre la proliferación de células nuevas y la muerte de las células seniles, con una relación proliferación/muerte que varía de un tejido a otro. En el crecimiento y progresión del cáncer, la regulación de la muerte celular juega un papel central, así como en la eficiencia de la quimioterapia, debido a que las células tumorales pueden desarrollar mecanismos de evasión. La población de células resistentes a la muerte acumula alteraciones genéticas y epigenéticas, contribuyendo a la malignidad.

En respuesta al daño en el DNA, las células pueden parar en algún punto específico del ciclo celular, permitiendo la reparación del DNA, pero si el daño no puede ser reparado la célula programa o activa su muerte. Durante décadas se han incorporado en el tratamiento de diversos tipos de carcinomas, agentes que actúan alterando la integridad del DNA; el mecanismo por el cual un fármaco en particular puede inducir muerte celular, depende tanto del tejido y de su genotipo como del tipo de daño al cual las células hayan sido expuestas (Portugal et al., 2009).

La muerte celular se ha agrupado en dos grandes categorías: (1) muerte celular programada y (2) muerte celular accidental (no programada) (Degterev and Yuan, 2008). Dentro de la primera, la apoptosis es sin duda la mejor estudiada y dentro de la segunda, la necrosis. Sin embargo, se sabe que existen formas de necrosis que, de hecho, no son accidentales. En otras palabras, hay formas no apoptóticas de muerte celular programada, en las cuales las células mueren por mecanismos controlados. Dentro de esta categoría de muerte se encuentra la autofagia (como mecanismo funcional que conlleva a la muerte celular) (Shen and Codogno, 2011), la muerte celular mediada por PARP (Poly ADP ribosa polimerasa) (Degterev and Yuan, 2008) , la catástrofe mitótica (Portugal et al., 2010) y la necroptosis (Degterev and Yuan, 2008).

Por otra parte, es importante indicar que las células después de un número determinado de divisiones pueden morir por apoptosis o entrar en un estado no proliferativo irreversible llamado senescencia replicativa (Roninson, 2003). Este mecanismo fisiológico se desencadena principalmente por el acortamiento de los telómeros como consecuencia de diferentes formas de estrés. Las células senescentes son viables y metabólicamente activas, manteniéndose paradas en G1, debido a su incapacidad para sintetizar DNA. En algunos casos las células tumorales pueden inducir senescencia por manipulación genética o por el tratamiento con algunos agentes antitumorales (Roninson, 2003).

1.5.1 Apoptosis

La apoptosis es una forma programada de muerte celular caracterizada por distintos cambios morfológicos en la membrana plasmática, como la translocación de la fosfatidilserina de la cara interna a la externa, condensación de la cromatina (picnosis), fragmentación nuclear, pliegues en la membrana plasmática, desensamble del citoesqueleto y contracción celular. Finalmente la célula se rompe en pequeños fragmentos rodeados de membrana (conocidos como cuerpos apoptóticos), los cuales son eliminados por fagocitosis, sin iniciar una respuesta inflamatoria (Degterev and Yuan, 2008).

La apoptosis es mediada por una familia de cistein-proteasas conocidas como caspasas (Degterev and Yuan, 2008). Estas proteínas son se expresan inicialmente en las células como precursores inactivos (pro-caspasas) y se activan mediante una cascada proteolítica que puede ser iniciada por diferentes mecanismos. Las caspasas iniciadoras traducen las diferentes

señales de muerte en actividad proteasa, siendo los miembros más representativos las caspasas-2, -8, -9 y -10. Estas caspasas activan mediante proteólisis a las caspasas efectoras como lo son la caspasa-3, -6 y -7 que, a su vez, proteolizan diversos sustratos citoplasmáticos y nucleares (Mansilla et al., 2012).

Se han descrito dos vías principales por las que se activan las caspasas y se inicia la apoptosis: (1) vía extrínseca y (2) vía intrínseca (o mitocondrial) (Fig. 6) (Degterev and Yuan, 2008). La vía apoptótica intrínseca está mediada por la mitocondria y se desencadena en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula, tales como la activación de oncogenes o el daño en el DNA (Degterev and Yuan, 2008; Mansilla et al., 2012). El cambio de potencial de la membrana mitocondrial o el daño a la mitocondria se asocia con la liberación de diversas proteínas del espacio intermembrana hacia el citoplasma, entre ellas: el citocromo c, SMAC/DIABLO, AIF (factor inductor de apoptosis), EndoG (endonucleasa G) y Omi/HTRA2 y la caspasa-9 (Mansilla et al., 2012). Quizá la más importante de estas proteínas pro-apoptóticas sea el citocromo c, el cual se une y activa a la proteína adaptadora Apaf-1 (factor 1 activador de la proteasa apoptótica) en el citoplasma, lo que promueve que esta última se una a ATP/dATP y forme el apoptosoma, que media la activación autocatalítica de la caspasa-9 y esta a su vez, activa la principal caspasa efectora, la caspasa-3 (Fig. 6) (Mansilla et al., 2012).

La vía extrínseca es mediada por la activación de receptores de muerte, tales como TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), TRAIL (receptor para el ligando inductor de apoptosis TNF), DR4, DR5 y Fas (Ricci and Zong, 2006). La interacción de estos receptores con sus respectivos ligandos resulta en la trimerización de los receptores, y como consecuencia el inicio de una cascada de transducción de señales que conlleva al reclutamiento de factores citosólicos como FADD (*fas-associated death domain*) y la caspasa-8, formando el complejo DISC. Estas interacciones proteína-proteína, activan a las caspasas-8 y -10 que, a su vez, procesan y activan a las caspasas-3 y -7. Posteriormente, la proteína Bid es hidrolizada por la caspasa-8, resultando en una molécula modificada químicamente que es entonces diana para que ocurra la oligomerización de Bax y Bak (Fig. 6) (Degterev and Yuan, 2008; Mansilla et al., 2012).

La proteína supresora de tumor p53, es un regulador importante de la respuesta al daño en el DNA (Lowe et al., 1994; Vogelstein et al., 2000). Cuando p53 está activada estimula la

expresión de p21^{WAF} e inhibe las quinasas dependientes de ciclina, resultando en una parada en el ciclo celular en las fases G1 y G2/M (Vogelstein et al., 2000). Las células proliferantes en un tumor, evaden la apoptosis como mecanismo de supervivencia y de esta manera pueden llegar a ser invasivas y metastásicas.

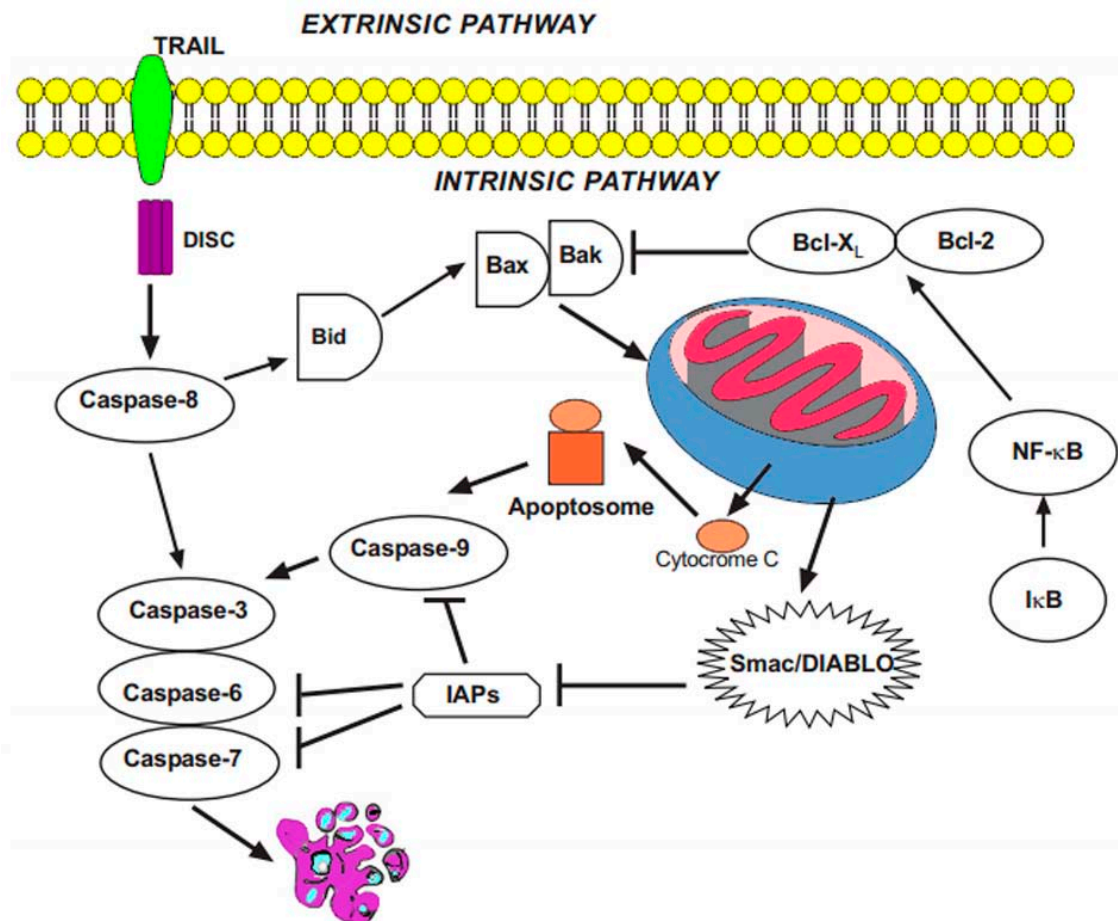


Figura 6. Vías de señalización extrínseca e intrínseca. El receptor de muerte TRAIL induce muerte celular mediante la vía extrínseca por reclutamiento y activación de las caspasas -9 y -10 para sus receptores R1 y R2. TRAIL puede activar también la vía intrínseca indirectamente. La vía intrínseca se inicia por acción de p53 y es mediada en la mitocondria. La figura muestra que el citocromo c se libera de la mitocondria, induciendo la formación del apoptosoma y, eventualmente media la activación de la caspasas efectoras -3 y -6. La extensión de la maquinaria apoptótica, mediada por las diferentes proteínas indicadas en la figura se encuentra de manera detallada en el texto. Imagen adaptada de (Mansilla et al., 2012).

1.5.2 Necrosis y necroptosis

La necrosis se define como un tipo de muerte celular que carece de características apoptóticas y autofágicas y, se describe como un respuesta severa a la exposición a tóxicos masivos asociados con infecciones, inflamación, trauma o isquemia, así como con

agotamiento de la energía celular o la inanición de nutrientes (Poon et al., 2010). Este tipo de muerte es el resultado final de una catástrofe bioenergética que tiene como consecuencia el agotamiento del ATP en la célula a un nivel incompatible con la supervivencia, provocando la disfunción de la membrana, pérdida de enzimas lisosómicas en el citoplasma, vacuolarización y, finalmente, la digestión celular. Cuando esto sucede, tiene lugar el desarrollo de una reacción inflamatoria alrededor del tejido, atribuida a la liberación del contenido celular. Las células necróticas son entonces internalizadas por macropinocitosis, contrario a lo que ocurre con las células apoptóticas en donde éstas son engolfadas completamente por fagocitosis (Proskuryakov and Gabai, 2010).

El término necroptosis se usa actualmente para designar la necrosis controlada o programada que depende de la actividad de receptores de muerte tipo RIP1 (*receptor-interacting protein-1*). Tanto la necrosis como la necroptosis convergen en los mismos cambios morfológicos comentados previamente (Degterev and Yuan, 2008). La quinasa RIP1 puede activarse mediante diversos estímulos que incluyen TNF α , TRAIL o el daño en el DNA. RIP1 puede transducir señales a la mitocondria y por ende, causar permeabilidad transitoria de la membrana mitocondrial. Más tarde, el colapso mitocondrial podría activar algunas proteasas y fosfolipasas, colaborando con la destrucción de la membrana plasmática y por ende la muerte celular (Degterev and Yuan, 2008) (Fig. 7).

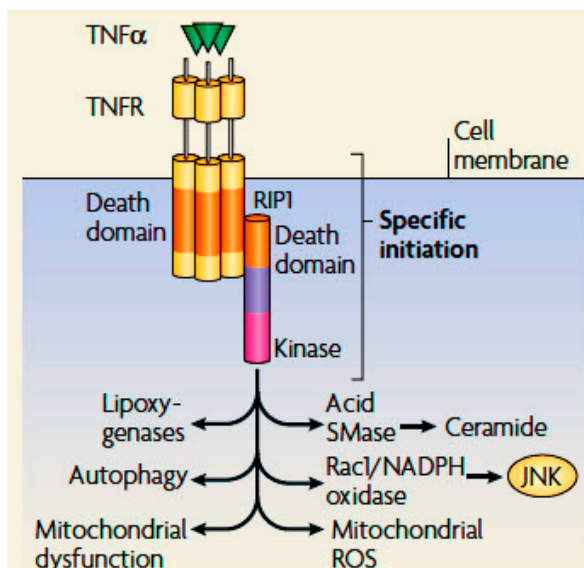


Figura 7. Esquema de la vía de activación de la necroptosis. La activación de la quinasa RIP1 por la interacción del TNF- α con su receptor (TNFR) en la membrana celular, incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (de la cadena respiratoria mitocondrial y el complejo oxidasa RIP1-Rac1-NADPH), activando a la quinasa *c-Jun N-terminal* (JNK). Los pasos de ejecución no específicos en la necroptosis son muy similares con la necrosis “clásica” no regulada, la principal diferencia entre estos dos mecanismos radica en la vía de activación, en la necroptosis regulada por mecanismos de señalización interna y en la necrosis causada por estrés celular. Tomado de (Degterev and Yuan, 2008).

1.6 CÁNCERES DE COLON Y OVARIO

Cada año la *American Cancer Society* estima el número de nuevos casos y muertes causadas por el cáncer en los Estados Unidos y, recopila los datos más recientes acerca de la incidencia y mortalidad basados principalmente en los datos generados por el *National Cancer Institute*. Durante el transcurso del año 2014, se ha calculado un total de 96.830 nuevos casos de cáncer de colon y 50.310 muertes, posicionándose como el más agresivo dentro del grupo de cánceres del sistema digestivo. Por otra parte, se han encontrado 21.980 de nuevos casos para el cáncer de ovario y 14.270 de muertes, siendo este el segundo cáncer más agresivo después del cáncer de próstata, dentro del grupo de los cánceres del sistema genital (Siegel et al., 2014).

El cáncer de colon es uno de los tres tipos de cáncer que causa más muertes entre hombres y mujeres (Siegel et al., 2014). La enfermedad es multifactorial e involucra tanto factores genéticos como la exposición a factores ambientales (incluyendo la dieta) y condiciones inflamatorias propias del tracto digestivo. Este tipo de cáncer es uno de los más frecuentes en los países desarrollados y, aunque su incidencia en los países en vías de desarrollo es menor, se está empezando a observar un aumento del impacto de la enfermedad (Hagggar and Boushey, 2009).

Pese a que la cirugía seguida de la quimioterapia es el tratamiento estándar del cáncer de ovario en estadios tempranos (Kigawa, 2013), la resistencia a la quimioterapia representa un inconveniente, contribuyendo al aumento de la mortalidad (Hennessy et al., 2009; Kigawa, 2013; Siegel et al., 2014). Por lo tanto, dado que el cáncer de ovario presenta un alto riesgo de recaída, es necesario mejorar la eficacia de las nuevas terapias dirigidas (Hall et al., 2013). En este contexto, la identificación de factores de transcripción que se encuentren involucrados en la tumorigénesis y la progresión del cáncer puede proporcionarnos dianas para la intervención terapéutica basada en moléculas de bajo peso que se unan de manera específica al DNA (Grivas et al., 2011; Yan and Higgins, 2013).

En esta tesis se han usado células humanas HCT116 de carcinoma de colon y A2780 de carcinoma de ovario para estudiar los efectos del tratamiento con los nuevos análogos de la MTA, sobre los cambios en la expresión génica y sobre la respuesta celular.

2. OBJETIVOS

En esta Tesis se profundiza en la comprensión de los efectos de las nuevas Mitramicinas, Mitramicina SK (MSK) y demicarosil-3-D-β-D-digitoxosil-Mitramicina SK (DIG-MSK; EC-8042), sobre la expresión génica, así como la respuesta de células humanas HCT116 de carcinoma de colon y A2780 de carcinoma de ovario al tratamiento.

1. Comparar las actividades antiproliferativas de los análogos MSK y DIG-MSK en células tumorales humanas.
2. Evaluar los cambios en la expresión génica tras el tratamiento farmacológico mediante técnicas cuantitativas (qRT-PCR y *microarrays*).
3. Determinar el efecto de MSK y DIG-MSK sobre la unión de factores de transcripción a regiones promotoras, a través de análisis *in silico* basados en los cambios en la expresión génica.
4. Caracterizar el efecto del tratamiento de células tumorales con MSK y DIG-MSK, sobre la interacción del factor de transcripción Sp1 con el DNA y con las regiones promotoras de una selección de genes.
5. Analizar a nivel celular la respuesta a los fármacos, incluyendo el mecanismo de muerte celular.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 FÁRMACOS

La Mitramicina SK y su análogo estructuralmente relacionado, DIG-MSK (demycarosil-3-D-β-D-digitoxosil-Mitramicina SK (DIG-MSK; EC-8042)) (Fig. 4) son compuestos aislados y purificados a partir de la especie productora: *Streptomyces argillaceus* (Rensing et al., 2003) en el Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo/Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias y en Entrechem SL (Oviedo).

3.1.1 Preparación y determinación de la concentración de los fármacos

Procedimiento

1. Pesar aproximadamente 1 mg de fármaco y añadir el volumen necesario de una solución 150 mM NaCl estéril, para obtener una concentración teórica de 1 mM. Mezclar hasta disolver el fármaco, evitando el contacto con la luz.

La concentración “real” de cada fármaco se determinó mediante la fórmula:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Donde,

A = Lectura espectrofotométrica de la absorbencia de MSK a 422 nm o DIG-MSK a 420 nm.

ε = Coeficiente de extinción molar: $\varepsilon_{\text{MSK}} = 10600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\varepsilon_{\text{DIG-MSK}} = 10600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

l = Paso de luz en la cubeta en cm (generalmente 1 cm).

El *stock* de cada fármacos se conservó a -20 °C. Para la realización de cada uno de los experimentos los fármacos se descongelaron y se prepararon las diluciones de trabajo necesarias, llevándolas a la concentración final con medio de cultivo justo antes de su uso.

Soluciones

- 150 mM NaCl en agua Milli-Q, filtrado con una jeringa y un filtro de 0.22 μM, en campana de flujo laminar.

3.2 LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

3.2.1 HCT116, células humanas de carcinoma de colon

Cedida por el Dr. B. Vogelstein (John Hopkins University, Baltimore). Esta línea celular se estableció a partir de un carcinoma de colon primario en humano y se ha descrito que es tumorigénica en ratones atímicos (Brattain et al., 1983), siendo ampliamente utilizada en el estudio de la biología del cáncer. Presenta morfología epitelial y crece en monocapa, adhiriéndose a la superficie de los frascos de cultivo.

HCT116 tiene una mutación en el codón 13 del proto-oncogen *Ras* y sobreexpresa *TGFβ1* y *TGFβ2* (*transforming growth factor β1* y *β2*). Adicionalmente, los puntos de control dependen tanto del daño al DNA como de la integridad de los husos mitóticos, convirtiéndola en una línea celular idónea para la realización de ensayos de recombinación homóloga (Bunz et al., 1998; Schroy et al., 1995).

3.2.2 A2780, células humanas de carcinoma de ovario

Línea celular establecida originalmente a partir del tejido tumoral de una paciente sin tratamiento. Estas células presentan morfología epitelial y crecen en suspensión o en monocapa adhiriéndose a la superficie de los frascos de cultivo. A2780 es la línea parental de la línea A2780 cis: resistente al Cisplatino y de la línea A2780 ADR: resistente a la Adriamicina (doxorubicina) (Behrens et al., 1987; Hamilton et al., 1984).

3.2.3 Condiciones de mantenimiento y crecimiento de los cultivos celulares

Las células HCT116 se mantuvieron en medio de cultivo conteniendo 50% de Dulbeccos's MEM (Invitrogen) y 50% del medio Ham's F12 (Lonza), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Invitrogen), 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomycin, a una temperatura de 37 °C en atmósfera húmeda conteniendo 5% de CO₂. Por su parte, las células A2780 se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Invitrogen), en presencia de 2 mM piruvato sódico, suplementando de la misma forma anteriormente detallada.

Soluciones y materiales

- FSB: suero fetal bovino que debe estar previamente inactivado antes de suplementar el medio de cultivo, de esta manera se desnaturalizan las proteínas y se evita la producción de cascadas de lisis en las células, ocasionadas por las proteínas del complemento.
-Inactivar a 56 °C por 30 minutos.
-Hacer alícuotas de 50 mL en campana de flujo laminar.
-Conservar a -20 °C.
- Penicilina/Estreptomicina: 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina.
-Conservar a -20 °C.
- Frascos estériles de poliestireno para cultivos celulares de 25 cm², 75 cm² o 175 cm².

3.2.4 Tratamiento con tripsina-EDTA

Debido a que usamos líneas celulares adherentes, fue necesario desprenderlas del frasco de cultivo con tripsina-EDTA, cada vez que se lleva a cabo un sub-cultivo.

Procedimiento

1. Eliminar el medio de cultivo.
2. Adicionar el volumen necesario de tripsina-EDTA, de acuerdo al tamaño de frasco utilizado. Por ejemplo, para un frasco de 25 cm² adicionar 0.5 mL de tripsina-EDTA, para uno de 75 cm² 1.0 mL o para uno de 175 cm² 1.3 mL.
3. Incubar a 37 °C por un par de minutos.
4. Adicionar 5 mL, 10 mL o 13 mL de medio de cultivo para inhibir la tripsina-EDTA, de acuerdo al tipo de frasco utilizado.
5. Recuperar el cultivo en un tubo de polipropileno (Falcon) de 15 mL y centrifugar a 1.000 r.p.m por 5 minutos.
6. Aspirar el sobrenadante y resuspender el precipitado con la solución necesaria, de acuerdo al tipo de experimento que se quisiera llevar a cabo.

Soluciones y materiales

- *Stock* 0.5% tripsina.
 - Resuspender 100 mg de tripsina (Sigma) en 20 mL de agua Milli-Q. Hacer alícuotas de 5 mL en tubos de polipropileno de 15 mL y conservar a -20 °C.
- 25 mM EDTA pH 8.0 (10 mL).
 - 0.5 mL 0.5 M EDTA.
 - 9.5 mL H₂O Milli-Q.
 - Esterilizar mediante filtración.
 - Mantener a -20 °C
- Tampón TD (500 mL).
 - 17.125 mL de 4M NaCl.
 - 625 µL de 4 M KCl.
 - 0.087 g de Na₂HPO₄·H₂O.
 - 10 mL de 1 M Tris·HCl pH 6.8.
 - Ajustar pH a 7.4 y llevar al volumen final con H₂O Milli-Q.
- Tripsina-EDTA (50 mL).
 - 2.5 mL de tripsina.
 - 1 mL de EDTA.
 - 46.5 mL de Tampón TD.
 - Hacer alícuotas de 15 mL y conservar a -20 °C. Una vez descongelada una alícuota, mantener a 4 °C.

3.2.5 Congelación y descongelación de líneas celulares

Para congelar y descongelar las líneas celulares se siguieron los siguientes procedimientos:

Protocolo de congelación

1. Descartar el medio de cultivo del frasco.
2. Desadherir las células del frasco con 0.025% tripsina-EDTA a 37 °C. Se utilizó el volumen de solución tripsina-EDTA necesario para cubrir las células.

3. Inhibir la acción enzimática de la tripsina-EDTA añadiendo 26 mL de medio de cultivo atemperado.
4. Lavar las células dos veces con 1x PBS estéril, mediante centrifugación por 5 minutos a 1.000 r.p.m.
5. Resuspender el precipitado en medio de congelación (90% medio de cultivo más 10% DMSO (Sigma)).
6. Dispensar en crioviales (1 mL por criovial).
7. Guardar los crioviales a -80°C , un mínimo de 5 días.
8. Pasado este tiempo, guardar los crioviales en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento de su descongelación.

Protocolo de descongelación

1. Descongelar el criovial rápidamente.
2. Una vez descongelado, transferir el total del contenido a un tubo de polipropileno con 5 mL de medio de cultivo frío.
3. Centrifugar durante 5 minutos a 1000 r.p.m.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 5 mL de medio de cultivo previamente atemperado.
5. Tomar las células con una pipeta y pasarlo a un frasco de 25 cm².
6. Guardar el frasco dentro de la incubadora y controlar el crecimiento celular.

Soluciones y materiales

- Medio de cultivo suplementado, descrito en el apartado 3.2.3.
- DMSO (Sigma).
- 10x PBS (pH 7.4): tampón fosfato salino (73 g NaCl, 26.9 g Na₂HPO₄, 11.7 g KH₂PO₄ en agua Milli-Q; pH ajustado con HCl). Solución esterilizada mediante autoclavado.
- Solución Tripsina-EDTA: 0.025% Tripsina, 0,5 mM EDTA pH 8.0 en TD.
- Crioviales (*Corning Costar*).

Después de descongelar un *stock*, las células se dividen en dos frascos: uno para la realización de los experimentos y otro para volver a congelar, asegurando así la disponibilidad

de todas las líneas celulares. Por otra parte, se congelaban aproximadamente 2×10^7 células en medio de cultivo conteniendo DMSO.

3.3 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

3.3.1 Inhibición del crecimiento celular: determinación de la citotoxicidad de las Mitramicinas

El efecto de DIG-MSK o MSK sobre la proliferación celular se determinó mediante el método del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), después de 72 horas de incubación con los fármacos. Este ensayo también conocido como Test de Inhibición de la Succinato Deshidrogenasa, mide colorimétricamente la actividad metabólica de las células en fase de proliferación activa. Está basado en la rotura del anillo de tetrazolio del MTT por diferentes mitocondriales, formándose cristales de formazán. Los cristales de formazán son insolubles en agua pero pueden solubilizarse con disolventes orgánicos, siendo la cantidad de formazán formado proporcional al número de células proliferantes (metabólicamente activas) (Mosmann, 1983). Típicamente se calculan las dosis IC_{50} e IC_{75} (dosis de fármaco que inhibe la proliferación celular de un 50% o un 75%, respecto a las células sin tratar).

Procedimiento

1. Realizar los experimentos por triplicado, con tres triplicados técnicos cada uno. Para ello, sembrar 3 placas de microtitulación con 100 μ L de cultivo conteniendo 25 células/ μ L en cada pocillo, inóculo inicial que asegura trabajar en condiciones de crecimiento exponencial desde las 24 horas.
2. Incluir varios pocillos con 100 μ L de medio de cultivo fresco como blanco. Incubar por 72 horas a 37 °C en una atmósfera con CO_2 .
3. Realizar un banco de diluciones seriadas con cada uno de los fármacos y tratar las células con las diferentes dosis (por triplicado).
 - Añadir 20 μ L de medio de cultivo a los pocillos correspondientes a los controles:
 - ❖ Control positivo: células sin fármaco (donde se espera obtener un valor de densidad óptica (D.O) más alto).

- ❖ Control negativo: medio de cultivo fresco para hacer el blanco y para detectar posibles contaminaciones del medio (donde se espera obtener un valor más bajo de D.O).
 - Añadir a los pocillos restantes 20 μ L de la dilución correspondiente.
4. Incubar a 37 °C en una atmósfera con un 5% CO₂, sacar las placas y proceder con el ensayo del MTT:
- Añadir 10 μ L de una solución de MTT (5 mg/mL) e incubar durante 3 horas a 37 °C en una atmósfera con CO₂, protegiendo del contacto con la luz.
 - Solubilizar los cristales de formazán producidos con 100 μ L de 0.08M HCL en isopropanol, mezclando con una pipeta multicanal.
 - Agitar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 - Cuantificar en un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm. Se utilizó un equipo Elx800 (Bio-Tek) y el programa KCjunior (Bio-Tek). La absorbancia a 670 nm está correlacionada directamente con el número de células metabólicamente activas.
 - Construir una curva Concentración vs. Inhibición a partir de los resultados obtenidos (concentración del fármaco *versus* D.O), para calcular los valores IC₅₀ e IC₇₅.

Soluciones

- 10x PBS.
- MTT (5 mg/mL): bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Sigma), disuelto en 1x PBS autoclavado y/o filtrado.
- 0.08 M HCl en isopropanol.

3.4 TRATAMIENTOS CON FÁRMACOS

Los experimentos que se detallan a continuación se realizaron con las células en fase de crecimiento exponencial, sub-cultivadas a una densidad de 2.5×10^4 células/mL, mantenidas a 37 °C durante 24, 48 y 72 horas con la dosis IC₇₅ de cada uno de los fármacos, determinadas mediante el ensayo del MTT. Los ensayos se realizaron por triplicado.

3.4.1 Análisis de los efectos de las Mitramicinas sobre la viabilidad celular: tinción con azul de Tripano

El ensayo del MTT se utilizó para determinar la capacidad de las Mitramicinas de inhibir el crecimiento celular. Sin embargo, este tipo de ensayo no permite diferenciar la inhibición de la proliferación debida a una reducción de la actividad enzimática (quiescencia) o a una reducción de la viabilidad celular.

El azul de Tripano es un colorante vital que permite distinguir las células viables de las que no lo son. Es un método rápido que requiere únicamente una pequeña fracción del total de la población celular. Las células viables no incorporan el colorante, mientras que las células no viables quedan teñidas de azul, permitiendo determinar el porcentaje de viabilidad, calculado a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad (\%)} = (\text{número de células vivas} + \text{número de células muertas}) \times 100.$$

Donde, número de células vivas = células negativas para la tinción.

 número de células muertas = células positivas para la tinción.

Por otra parte, con este método se puede determinar la concentración celular (número de células/mL) en los cultivos celulares que habrán llegado a su nivel óptimo de crecimiento y densidad celular antes de realizar sub-cultivos rutinarios, congelación o cualquier experimento.

Procedimiento

1. Desadherir las células mediante tratamiento con tripsina-EDTA.
2. Añadir una alícuota de 10 μL de la suspensión del cultivo celular.
3. Mezclar con 5 μL de azul de Tripano.
4. Montar sobre una cámara de Neubauer y observar en el microscopio óptico.

La cámara de Neubauer tiene cuatro campos visibles. Se cuenta en número de células por campo. Luego, se obtiene la Media de células (número de células/4) y se multiplica por 1.5 (factor de dilución con el azul de Tripano y la suspensión del cultivo celular) y posteriormente el resultado se multiplica por 10^4 . El resultado obtenido corresponde al número de células/mL

de suspensión celular. La viabilidad celular se determina por la relación entre el número de células viables respecto al total.

Se realizó un recuento tanto de los controles como de las células tratadas con los fármacos en diferentes intervalos de tiempo.

Soluciones y materiales

- Azul de Tripano al 0.5% en 1x PBS (Sigma).
- Cámara de Neubauer (Brand).

3.4.2 Análisis de la distribución de fases del ciclo celular mediante citometría de flujo

Para el análisis del contenido de DNA de las células y su distribución en las fases del ciclo celular (proporción de células en G0/1, S y G2/M), se realizó tinción con ioduro de propidio (IP) a diferentes tiempos. Adicionalmente, se observó la morfología celular con un microscopio óptico.

Procedimiento

Protocolo basado en el método de Doyle (Doyle and Griffiths, 1998), con algunas modificaciones:

1. Sembrar 2.5×10^5 células en frascos de poliestireno estériles, con el medio de cultivo correspondiente.
2. Incubar durante 24 horas para que el cultivo esté en fase de crecimiento exponencial y tratar las células con la concentración de Mitramicina correspondiente a diferentes tiempos. Para cada tiempo sembrar un frasco de células sin tratar (control).
3. Una vez cumplidos los tiempos a evaluar, fijar de la siguiente manera:
 - Desadherir las células mediante tratamiento con tripsina-EDTA.
 - Centrifugar a 1000 r.p.m por 5 minutos y lavar con 5 mL de 1x PBS.
 - Centrifugar nuevamente y resuspender el precipitado en 0.5 mL de 1x PBS.
 - Añadir por goteo 4.5 mL de 70% etanol frío mientras se agita suavemente la muestra en un vórtex.
4. Centrifugar y lavar con 1x PBS.

5. Eliminar el sobrenadante y añadir 450 μ L de 1x PBS y 0.5 mg/mL RNAsa A, luego 20 μ g/mL de IP (Ioduro de Propidio).
6. Incubar a 37 °C por 30 minutos y mantener a 4 °C hasta su análisis en el citómetro de flujo (Coulter Epics Elite XL), utilizando un láser de argón blanco (488 nm, 15 mW). Detección de fluorescencia: 665-685 nm. Analizar los resultados con el programa Summit versión 4.3.

Soluciones

- 10x PBS.
- 70% etanol frío.
- 10 mg/mL RNAsa A.
- 5 mg/mL de ioduro de propidio (IP).

3.4.3 Determinación del mecanismo de muerte celular

La diferenciación entre la muerte celular apoptótica y necrótica y su cuantificación, se estableció mediante doble tinción con ioduro de propio (IP) y Anexina-V-fluoresceína. Para ello se utilizó el *kit* de tinción de Anexina-V-Fluos (Roche) y un citómetro de flujo Coulter Epics-XL.

En los primeros estadios de la apoptosis se producen cambios en la superficie celular. Uno de estos cambios es la alteración de la membrana plasmática con lo cual hay una translocación de la fosfatidilserina de la capa interna a la externa. La Anexina-V es una proteína dependiente de Ca^{2+} que se une a los fosfolípidos cargados negativamente con una alta afinidad por la fosfatidilserina (Vermes et al., 1995). La Anexina-V se utiliza como un marcador para detectar las células apoptóticas.

La integridad de la membrana plasmática se ve comprometida en las células necróticas, de manera que al teñirlas con IP, éste accede al núcleo celular y se une al DNA. La tinción simultánea IP y Anexina-V-Fluos permite diferenciar las células necróticas, y apoptóticas de las células viables (Vermes et al., 1995).

Las células viables no presentan translocación de la fosfatidilserina ni ruptura de la membrana plasmática, por lo tanto son negativas para ambas tinciones. La apoptosis temprana se determinó como: Anexina-V-fluos positivo/IP negativo, ya que las células tienen translocada la fosfatidilserina pero mantienen la integridad de la membrana celular. La necrosis temprana se determinó como Anexina-V-fluos negativo/IP positivo, debido a que la fosfatidilserina no está lo suficientemente accesible a la Anexina-V hasta los estadios más avanzados de la necrosis (necrosis secundaria o tardía). En el caso de las células en fase de apoptosis/necrosis secundaria, la fosfatidilserina se encuentra translocada y la membrana plasmática está alterada, por lo cual son doblemente positivas para la tinción (ver tabla 2).

Tabla 2. Perfil de tinción de las células viables, apoptóticas y necróticas con la doble tinción con IP y Anexina-V-Fluos.

	Población celular			
	Viable	Apoptótica temprana	Necrótica temprana	Apoptótica/Necrótica secundaria
Anexina-V-fluos	-	+	-	+
IP	-	-	+	+

Procedimiento

1. Sacar las muestras a diferentes tiempos de tratamiento y sus controles y lavar 1.25×10^5 células con 5 mL de 1x PBS.
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado con 100 μ L de solución de tinción: 100 μ L Hepes, 2 μ L de solución de Anexina-V-fluos y 2 μ L de solución de IP.
3. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y añadir 0,5 mL de tampón Hepes.
4. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Coulter Epics-XL con una longitud de onda de 488 nm y un filtro de 515 nm para la detección de la fluoresceína y un filtro de más de 600 nm para la detección del IP.

Soluciones y materiales

- 10x PBS
- *Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche)*

- Solución de Anexina-V-fluoresceína.
- Solución de yoduro de propidio.
- Tampón Hepes.

3.5 ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL

3.5.1 Extracción de RNA

En células HCT116 se aisló RNA total tanto del control (células sin tratamiento) DIG-MSK o MSK) como de células tratadas con la dosis IC₇₅ de DIG-MSK o MSK en un tiempo de 24 horas.

En el caso de las células A2780, se realizó extracción de RNA tanto del control (células sin tratamiento con DIG-MSK), como de células tratadas de manera individual con dos concentraciones diferentes de DIG-MSK (detallado posteriormente en Resultados), con el fin de observar si el efecto en la modulación de la transcripción era más agresivo o no, dependiendo de la concentración de fármaco usada. Los experimentos se realizaron a partir de tres réplicas biológicas.

Procedimiento

1. Eliminar el medio de cultivo a los cultivos celulares.
2. Tripsinizar.
3. Inhibir la tripsina.
4. Centrifugar durante 5 minutos a 1.000 r.p.m y descartar el sobrenadante.
5. Lisar las células añadiendo 1 mL de reactivo UltraSpecRNA, mezclar por pipeteo y completar la lisis usando una aguja de 18G.
6. Mantener el homogenado durante 5 minutos en hielo para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos.
7. Añadir cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (0.2 mL de cloroformo por cada mL de reactivo UltraSpecRNA), agitar vigorosamente durante 15 segundos y mantener en hielo durante 5 minutos.
8. Centrifugar 14.000 r.p.m a 4 °C, durante 15 minutos.
9. Después de la adición de cloroformo y de la centrifugación, el homogenado forma dos fases: la inferior (orgánica) y la superior (acuosa). Las proteínas y el DNA se

encuentran en la fase orgánica y en la interfase, mientras que el RNA está en la fase acuosa.

10. Precipitar el RNA transfiriendo la fase acuosa a un nuevo tubo de microcentrífuga, añadir 1 volumen igual de isopropanol y pipetear repetidamente. Mantener en hielo durante 10 minutos.
11. Centrifugar a 14.000 r.p.m a 4 °C durante 10 minutos.
12. Eliminar el sobrenadante. El RNA precipita después de centrifugar.
13. Lavar el precipitado dos veces con 75% etanol (1 mL etanol por cada mL de reactivo utilizado).
14. Centrifugar a 14.000 r.p.m a 4 °C durante 5 minutos.
15. Eliminar el etanol lo máximo posible, sin llegar a secar el precipitado completamente, ya que disminuye la solubilidad a la hora de resuspenderlo.
16. Resuspender el precipitado en 179 µL de H₂O libre de RNAsas (H₂O DEPC) y proceder con el tratamiento con DNAsa I.

Soluciones

- UltraSpecRNA (Biotecx).
- Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1).
- Isopropanol.
- 75% etanol.
- H₂O DEPC: agua libre de RNAsas: realizar una dilución 1/500-1/100 de DEPC (dietilpirocarbonato, Sigma) en agua Milli-Q, en una campana de flujo laminar, agitar de 4 a 16 horas con un agitador magnético y autoclavar dos veces para inactivar los restos de DEPC.

3.5.2 Tratamiento con DNasa I

Para eliminar posibles contaminaciones con DNA genómico que pudieran interferir a la hora de analizar los cambios en los perfiles de expresión génica, se trataron las muestras de RNA total con DNasa I libre de RNAsas.

Procedimiento

1. Preparar en tubos de microcentrífuga la siguiente reacción para cada muestra:

	Por reacción (Volumen final 200 μ L)
RNA total	179 μ L
10x tampón DNasaI	20 μ L
10 U/ μ L DNasaI	1 μ L

2. Incubar las reacciones a 37 °C durante 30 minutos.
3. Añadir 100 μ L de 10x Mix de Terminación a cada muestra y mezclar por pipeteo.
4. Para eliminar la DNasa, añadir 1 volumen igual de fenol ácido y agitar vigorosamente con un vórtex.
5. Centrifugar a 14.000 r.p.m durante 5 minutos.
6. Transferir la fase superior acuosa a tubos nuevos de microcentrífuga.
7. Añadir 1 volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y vortear vigorosamente.
8. Centrifugar a 1.000 r.p.m durante 5 minutos.
9. Transferir la fase acuosa (fase superior) a tubos de microcentrífuga nuevos.
10. Precipitar con isopropanol (ver apartado 3.5.1).
11. Lavar y resuspender el precipitado (ver apartado 3.5.1).

Soluciones

- 10 U/ μ L DNasa I libre de RNasas (Roche).
- 10x tampón para DNasa I: 400 mM Tris·HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 60 mM MgCl₂.
- 10x Mix de terminación: 0.5 M EDTA (pH 8.0), 0.25% acrilamida, en H₂O DEPC.
- Fenol ácido: fenol a pH 4.3 \pm 0.2 saturado con 0.1 M tampón citrato (Sigma), conteniendo 1 mg 8-hidroxiquinoleina (Fluka) y β -mercaptoetanol (Sigma).
- Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1).
- Isopropanol.
- 75% etanol, en H₂O DEPC.

3.5.3 Determinación de la concentración y pureza del RNA

La evaluación de la concentración y pureza del RNA se realizó espectrofotométricamente a 260 y 280 nm en un espectrofómetro NanoDrop ND-1000. La relación entre $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ permite determinar la calidad (pureza) del RNA. El RNA puro tiene una relación de 2. Se considera un buen grado de pureza cuando el rango de relaciones se encontraba entre 1.8 y 2 (Sambrook et al., 1989). Por su parte, la relación A_{260}/A_{230} usada como medida secundaria de la pureza del RNA, indica el grado de contaminación con componentes con absorción espectrofotométrica cercana a 230 nm tales como el tiocianato de guanidina (presente en el reactivo de extracción del RNA), carbohidratos, péptidos y fenol (o componentes aromáticos en general), en un RNA “limpio” se esperan valores entre 2 y 2.3.

Adicionalmente, la integridad, calidad y concentración del RNA se determinó mediante electroforesis en *chip* de nanocapilares, separando las moléculas por tamaño en un equipo Agilent 2100 Bioanalyzer. El equipo detecta a través de fluorescencia, moléculas teñidas con un intercalador y compara los tamaños de los fragmentos de RNA con un marcador de peso molecular (*RNA 6000 ladder*) usado como estándar para el análisis de los datos. El *RNA 6000 ladder standard* contiene seis fragmentos de RNA en un rango de 25 a 4000 pb (25, 200, 500, 1000, 2000 y 4000 pb), con una concentración total de 150 ng/ μL . El software compara automáticamente las muestras dadas para el análisis con los fragmentos del marcador de peso molecular, determinando la concentración de las muestras de RNA e identificando los picos de fluorescencia correspondientes al RNA ribosomal (rRNA).

En un RNA de buena calidad la relación (*ratio*) entre el rRNA 28S y el rRNA 18S debe tener valores cercanos a 2 y el número de integridad del RNA (RIN) debe ser superior a 7.

3.5.4 Reacción de transcripción reversa: síntesis de DNA complementario

Se utilizó el *kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche) para retrotranscribir 2 μg de RNA total. La reacción se realizó en un volumen final de 20 μL , aunque después se añadieron otros 20 μL de agua, con tal de tener una concentración final de 50 ng/mL de cDNA. En paralelo se realizó un control negativo *RT minus* (RT-) para cada

condición experimental, con el fin de asegurar que los RNAs extraídos no se hubieran contaminado con DNA genómico.

Procedimiento

Por cada reacción de transcripción reversa, se debe realizar un control (RT *minus*) que contendrá todos los componentes a excepción de la enzima transcriptasa reversa.

1. Mezclar en tubos de microcentrífuga diferentes los siguientes componentes:

	Reacción de transcripción reversa	Reacción RT <i>minus</i> (control)
2 µg RNA	Volumen variable	Volumen variable
50 pmol/µl ligod(T)	1 µL	1 µL
Agua	hasta 13 µL	hasta 13.5 µL

2. Desnaturalizar para eliminar estructuras secundarias en el RNA.
 - Incubar durante 10 minutos a 65 °C.
 - Inmediatamente colocar en hielo.
3. Añadir el resto de componentes a cada tubo (volumen final = 20 µL):

	RT	RT <i>minus</i>
5x Tampón	4 µL	4 µL
40 U/µL Inhibidor de RNAsas	0.5 µL	0.5 µL
10 mM desoxinucleótidos	2 µL	2 µL
20 U/µL Transcriptasa reversa	0.5 µL	0 µL

4. Mezclar sin usar vórtex.
5. Incubar durante 1 hora a 50 °C.
6. Inactivar a 85 °C durante 5 minutos y pasar a hielo.
7. Añadir 20 µL más de agua y guardar a -20 °C hasta su uso.

3.5.5 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

La técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) permite cuantificar la expresión de un gen de interés, relativa a un gen utilizado como control interno de normalización. El DNA complementario (cDNA) previamente sintetizado a partir del RNA, se amplifica con oligonucleótidos específicos para cada gen. Esta técnica se basa en la unión del fluorocromo *SYBRGreen* a la doble cadena del ácido nucleico y en la monitorización de la fluorescencia detectada, descrita como una curva sigmoideal.

En los ciclos iniciales de la qRT-PCR la señal es muy débil y no es fácilmente distinguible del ruido de fondo. A medida que el producto de amplificación se acumula, la identificación de la señal crece exponencialmente hasta alcanzar la fase de saturación, en donde se habrán consumido todos los componentes de la reacción. En la parte lineal de la fase exponencial, la fluorescencia es proporcional a la cantidad de DNA amplificado y éste a su vez es proporcional al número de copias de cDNA inicial de la muestra. Para cuantificar las moléculas presentes en la muestra inicial del gen de interés, hay que determinar el número del ciclo a partir del cual la señal es superior al ruido de fondo, indicado como *Ct* (*cycle threshold*).

La curva que se obtiene en la detección de la fluorescencia sigue la ecuación:

$$N = N_0 (1 + E)^{ct}$$

Donde,

N = Número de copias.

N_0 = Número de copias iniciales.

E = Eficiencia de la reacción.

Ct = *Cycle Threshold*.

Para evaluar los niveles de transcripción de un gen entre diversas muestras, hay que comparar los valores de los *Ct* obtenidos para cada una de ellas. El método de cálculo que se utiliza es el $\Delta\Delta Ct$, en donde se normaliza respecto a cada gen y la condición control. De esta manera para cada muestra experimental, el número de copias representadas con valor del *Ct* del gen de interés, se corrige respecto al gen usado como referencia y se obtiene un ΔCt . A partir de este valor se vuelve a normalizar, tomando como referencia la muestra de la condición control obtenida $\Delta\Delta Ct$. La función resultante de la expresión génica o *Fold Change* se calcula como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Pfaffl, 2001).

En este trabajo se realizaron experimentos de qRT-PCR con cuatro finalidades:

1. Determinar la eficiencia de cada una de las parejas de oligonucleótidos.
2. Analizar el perfil de expresión génica en células HCT116 de 89 genes involucrados en la regulación del ciclo celular, incluidos en el panel: *Human Cell Cycle RT2 Profiler PCR Array* (SABiosciences).
3. Validar los resultados de los *microarrays* realizados con células A2780 tratadas con DIG-MSK, seleccionando aleatoriamente genes diferencialmente expresados.
4. Cuantificar cromatina inmunoprecipitada con anti-Sp1 de células control (sin tratamiento) y células tratadas con DIG-MSK.

3.5.5.1 Diseño de oligonucleótidos cebadores

Para llevar a cabo los ensayos de qRT-PCR se diseñaron oligonucleótidos cebadores específicos para cada uno de los transcritos seleccionados, utilizando el programa Gene Runner versión 3.05, en base a la secuencias codificantes obtenidas en la web del NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (última visita: 09 de mayo de 2014). En el caso de genes con isoformas, se diseñaron oligonucleótidos en regiones conservadas de los exones entre las isoformas.

Parámetros para el diseño de los oligonucleótidos:

- Longitud aproximada de 50 pb.
- Temperatura de anillamiento: 56 °C y/o 58 °C.
- Probabilidad reducida de formación estable de horquillas, bucles y dímeros.

Criterios establecidos considerando los parámetros recomendados para la qRT-PCR, según la casa comercial Roche (LightCycler 480 *Gene Scanning Software*).

En el caso de los oligonucleótidos usados para la cuantificación de cromatina inmunoprecipitada (ChIP), descrito más adelante en el apartado 3.8.1, se emplearon las secuencias promotoras de los genes a evaluar, obtenidas de los sitios web:

UCSC Genome Bioinformatics: <http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?redirect=auto&source=genome.ucsc.edu> y Ensembl: <http://www.ensembl.org/index.html> (última visita: 09 de mayo de 2014).

El diseño de los oligonucleótidos se basó en la presencia de sitios de unión para Sp1 en la secuencia promotora de cada gen, siendo verificada a través de la base de datos TELiS (Cole et al., 2005) (*Transcription Element Listening System*) disponible en: <http://www.telis.ucla.edu/index.php?cmd=transfac> (última visita: 09 de mayo de 2014) y en el programa MatInspector (Cartharius et al., 2005) de la *suite* de *Genomatix Software* (<http://www.genomatix.de/solutions/genomatix-software-suite.html>) (última visita: 09 de mayo de 2014). De esta manera, cada producto de amplificación contiene el motivo de unión para el factor de transcripción.

Para detectar hibridación con otras secuencias, los oligonucleótidos se alinearon mediante el algoritmo BLASTn incluido en la web del NCBI: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome (última visita: 09 de mayo de 2014), usando como conjunto de búsqueda la base de datos de DNA genómico y transcritos humanos, y seleccionando el programa *megablast* para la comparación de secuencias altamente similares.

Se verificó que los resultados dados por la herramienta incluyeran un alto porcentaje de identidad entre la secuencia estudiada y la alineada por el programa, acompañado por un valor esperado (*E Value*) inferior a 0.05. Los resultados de BLASTn más significativos corresponden a un valor esperado menor, siendo más conservativo cuando la secuencia de búsqueda es corta, de manera que para secuencias de longitud menor a 40 nucleótidos los resultados del $E Value < 0.05$ se pueden considerar específicos (Altschul et al., 1997). En la Tabla 3 se indican los diferentes oligonucleótidos cebadores usados en este trabajo.

Tabla 3. Oligonucleótidos cebadores usados para la cuantificación mediante qRT-PCR.

Gen	Oligonucleótidos (5' - 3')
<i>Sp1</i>	dir: CAGCTTCAGGCTGTTCCAAACT rev: CTGCCAACTGACCTGTCCATT
<i>Sp3</i>	dir: GCGACAGGTGATTTGGCTTC rev: CCATCGGTTTGGTGCTCCT
<i>CDKN1A</i>	dir: TGTGATGCGCTAATGGCG rev: CGAAGTTCCATCGCTCACG
<i>TFDP1</i>	dir: CAACGAAGTGGCAGACGAGCTG rev: GGTTGTTCGGCAGCACTGAACTC
<i>CCNA1</i>	dir: TCACCGTTCCTCCTTGGAAA rev: TGAATGGTGAACGCAGGCT
<i>TP53</i>	dir: CCCTTCCCAGAAAACCTACCA rev: AAGAAGCCCAGACGGAAACC
<i>MAPK1</i>	dir: GTTCTGCACCGTGACCTCAAGC rev: ACAGGTGGTGTGAGCAGCAGG
<i>CCNB1</i>	dir: CAGGATAATTGTGTGCCCAAGA rev: TGGCAGTGACACCAACCAGT
<i>GTSE1</i>	dir: TCCCGAACAGCCTCCGTTG rev: GGGCTCCAGGCAAAGGGAC
<i>E2F1</i>	dir: AAGCGGCGCATCTATGACAT rev: AATGAGCTGGATGCCCTCAA
<i>BRCC3</i>	dir: CGTTACGGAAACATCGCTGTCTG rev: GGCCGCTGTGAAACAATGCTC
<i>GAPDH</i> ^a	dir: TCTGCCCCCTCTGCTGAT rev: TTCTCATGGTTCACACCCATG
<i>XIAP</i> ^b	dir: GAAAGAAGAAACACTGGAGC rev: GCAGTGAGCACCTCGTAG
<i>CREBP1</i> ^b	dir: AGGGGCTGCGGGGGAG rev: AGGAGAGCGCCCCAAC
<i>MDK</i> ^b	dir: GTTCCTGACCTCTGCCC rev: GGAAGCCGGAGGGATCG
<i>KCNMA1</i> ^b	dir: GTGGAATCCAGTTGACAGC rev: AGTGGGGAGGGGAGGAG

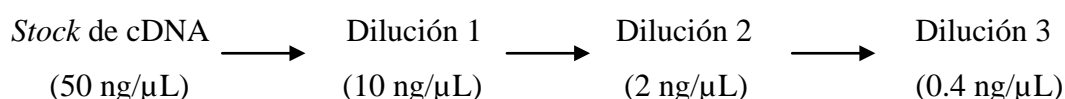
^a *GAPDH* se usó tanto para la normalización de los datos como control negativo para la qRT-PCR en los ensayos de ChIP.

^b Oligonucleótidos cebadores usados para la cuantificación por qRT-PCR de la cromatina inmunoprecipitada (ChIP).

3.5.5.2 PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR): cálculo de la eficiencia de los oligonucleótidos, amplificación y cuantificación

Procedimiento

1. A partir del cDNA obtenido, se realizó un banco de diluciones seriadas 1/5, para evaluar la eficiencia de cada pareja de oligonucleótidos mediante qRT-PCR, según el siguiente esquema:



2. Preparar para cada pareja de oligonucleótidos la siguiente reacción en forma de *Master Mix*:

	Para una reacción
SyberGreen (Roche)	5.0 μL
10 μM oligonucleótido directo	0.3 μL
10 μM oligonucleótido reverso	0.3 μL
Agua	2.4 μL

Para cada reacción se obtuvo un volumen final de 10 μL (8 μL de la mezcla anterior y 2 μL de cDNA).

3. Dispensar 8 μL de *Master Mix* por pocillo en una placa para qRT-PCR de 96 pocillos (Roche).
4. Añadir 2 μL de cada cDNA (*Stock* de cDNA, Dilución 1, Dilución 2 ó Dilución 3), 2 μL de la reacción RT *minus* (control negativo 1) ó 2 μL de agua (control negativo 2) a los pocillos con la *Master Mix*. Los ensayos se realizaron por triplicado.
5. La qRT-PCR se realizó en un termociclador LightCycler 480 (Roche) usando las siguientes condiciones de termociclaje: una desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 45 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 10 segundos,

anillamiento a 60°C por 30 segundos y una extensión final a 72 °C por 10 segundos. Se generó una curva de disociación final que sirvió para verificar que se hubiera amplificado un único producto. Este protocolo de amplificación se usó tanto para la evaluar la eficiencia de los oligonucleótidos, como en el análisis de los perfiles de expresión génica y la cuantificación de cromatina inmunoprecipitada.

3.5.6 Análisis de la expresión génica mediante *microarrays*

Con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento con DIG-MSK en la expresión génica de células A2780 de carcinoma humano de ovario, se realizó un análisis de los patrones de expresión mediante el uso de *microarrays* (*SurePrint G3 Human Gene Expression Microarray*, 8 x 60K (Agilent, ID 028004), usando dos concentraciones distintas de DIG-MSK (detallado en Resultados). La fase técnica del análisis (marcaje, hibridación, pruebas de consistencia de los datos y determinación de los niveles de expresión) fue realizada en Bioarray SL (Elche). El diseño de las sondas contenidas en los *microarrays* está basado en la información disponible en las bases de datos: RefSeq, Ensemble, Unigene, GenBank así como sondas para *long intergenic non-coding* RNAs.

Se marcaron tres muestras por condición experimental (3 controles y 3 muestras tratadas con dos concentraciones distintas de DIG-MSK), para un total de 9 muestras correspondientes a réplicas biológicas. Previo a la hibridación de las muestras a los *microarrays*, se siguió el protocolo de marcaje *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis* v. 6.5 (Agilent), usando como material de partida 0.2 µg de RNA total de cada muestra y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizó una transcripción reversa del mRNA a cDNA usando la enzima MMLV-modificada (Promega) y luego la síntesis, amplificación y purificación a RNA complementario (cRNA) mediante el *Megascript T7 kit* (Ambion); amplificándose entre 10-500 veces la secuencia de cada mRNA inicial. Este método utiliza la enzima T7 RNA polimerasa, que sintetiza el cRNA e incorpora a la vez el fluorocromo Cianina 3 (Cy3).

Luego, las muestras marcadas se hibridaron a los *microarrays* con el *In Situ Hybridization Kit Plus* (Agilent). La unión de cada cRNA a las diferentes sondas (dispuestas en *spots* dentro de los *microarrays*) produjo una intensidad de fluorescencia que fue directamente proporcional al nivel de expresión del gen correspondiente a cada *spot*.

3.5.6.1 Comprobación de la calidad y consistencia de los resultados de *microarrays*

Se realizó análisis de marcaje, montaje de los *microarrays* y determinación del agrupamiento de las muestras entre sí mediante un análisis de componentes principales (PCA); identificando de manera visual cualquier *outlier* (réplicas de cada condición experimental cuyos valores de expresión para cada gen analizado, resultan mucho menores o mayores que la mayoría de los otros valores en el conjunto total de datos). En paralelo al proceso de extracción de datos, el programa *Feature Extraction* (Agilent) generó el archivo denominado *Quality Control Report* que se usó para descartar muestras que hubiesen sufrido errores durante el proceso de hibridación y/o escaneado. Este archivo recoge de manera global los parámetros más importantes para cada *microarray*, permitiendo hacer una evaluación inicial del resultado del experimento y proporcionando un criterio objetivo para rechazar o aceptar cada uno de los *microarrays*. Se espera que todos los *microarrays* tengan una distribución homogénea.

Para controlar las fuentes de variabilidad en la expresión del RNA, atribuidas a una variedad de factores que incluyen la calidad del material de partida, el nivel de celularidad, la eficiencia el RNA y el tipo de *microarray* empleado, entre otros, los *microarrays* contenían también un conjunto común de controles de RNA externo diseñados por el *External RNA Controls Consortium* (ERCC), un grupo organizado por el *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Los controles son un conjunto de transcritos poliadenilados no marcados adicionados después del aislamiento de las muestras, con el fin de lograr una medida de referencia estándar para la comparación de los datos, así como medir la sensibilidad (límite inferior de detección) y el rango dinámico de los experimentos, cuantificando la expresión génica diferencial.

3.5.6.2 Cuantificación de la expresión génica

La cuantificación de las señales y la sustracción del ruido de fondo se hizo con el programa *Feature Extraction* (Agilent) v. 10.7.3.1. Una vez escaneadas y procesadas las señales obtenidas de cada uno de los *spots* presentes en los *microarrays* hibridados, se generó una matriz de expresión sobre la que se realizó el análisis de expresión diferencial. Se consideró que un gen estaba sobreexpresando o reprimiendo su nivel de expresión cuando el

cambio observado en células tratadas con DIG-MSK respecto al control fue $\geq 1.5\text{-fold}$ o $\leq 0.67\text{-fold}$ respectivamente, acompañado de una $p < 0.05$.

Adicionalmente, se conservó una alícuota de cada una de las preparaciones de RNA usadas para el análisis mediante *microarrays*, para realizar una validación de los datos mediante qRT-PCR (Los oligonucleótidos cebadores diseñados para tal fin se presentan en el apartado 3.5.5.1). Para estos experimentos se mezclaron los RNAs de cada condición experimental en un mismo vial, sintetizando posteriormente cDNA y llevando a cabo tres cuantificaciones independientes para un conjunto de genes seleccionados, que se detallan en la sección de Resultados.

3.6 CAMBIOS EN LOS NIVELES PROTEICOS COMO CONSECUENCIA DEL TRATAMIENTO CON LAS MITRAMICINAS

Se analizaron los niveles de expresión de un grupo seleccionado de proteínas, codificadas por genes diferencialmente expresados tras el tratamiento con las Mitramicinas. Esto nos permitió correlacionar si el aumento o disminución de la expresión génica vistos mediante transcriptómica correspondían con los cambios a nivel de proteína.

3.6.1 Extracción de proteína total

Procedimiento

1. Obtener las células en forma de precipitado, para cada uno de los distintos tiempos evaluados.
2. Lavar 2 veces con 1x PBS estéril.
3. Resuspender el precipitado en 0.5 mL de tampón de lisis.
4. Mantener 30 minutos en hielo.
5. Centrifugar a 12.000 g a 4 °C durante 10 minutos.
6. Guardar el sobrenadante a -80 °C.

Soluciones

- 10x PBS.
- Tampón de lisis: 50 mM Tris·HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% Igepal, 0.1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), 2 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, en agua Milli-Q.

3.6.2 Determinación de la concentración de proteínas en los extractos

Se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Este método está basado en la utilización del reactivo azul de *Coomassie* brillante en condiciones acídicas, que forma complejos con las proteínas y cambia su máximo de absorción de 465 a 595 nm.

Procedimiento

1. Diluir 1/5 el volumen necesario del reactivo para Bradford (BioRad).
2. Preparar las muestras para la recta patrón con cantidades conocidas de BSA: 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12 y 14 µg, y las diluciones adecuadas del extracto proteico a valorar.
3. Añadir 1 mL del reactivo de Bradford diluido a cada muestra. Incubar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos para que se produzca la reacción.
4. Medir la densidad óptica a 595 nm de las muestras en un espectrofotómetro.
5. Construir una recta patrón a partir de los resultados obtenidos e intrapolar la concentración de proteínas de los extractos.

Soluciones y Materiales

- BSA (albúmina sérica bovina) (20 mg/mL) (Roche).
- Reactivo para Bradford *BioRad Protein Assay* (BioRad).

3.6.3 Electroforesis SDS-PAGE

Para separar las proteínas en función de su tamaño, se realizaron electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (Laemmli, 1970). El detergente SDS desnaturaliza las proteínas y les confiere carga negativa, permitiendo su separación en una matriz de poliactrialmida cuando se aplica un campo eléctrico.

Los geles de SDS-poliacrilamida usados constan de dos partes: un gel concentrador (*stacking*) de bajo porcentaje de acrilamida (5%), que alinea las proteínas de las muestras antes de su separación y un gel con mayor porcentaje de acrilamida (10-15%), que separa las proteínas en función de su peso molecular.

Procedimiento

Preparar el gel para SDS-PAGE, con el porcentaje de acrilamida necesario para separar la proteína de interés en el gel separador. Debido al tamaño de las proteínas analizadas en este trabajo, los geles separadores contenían un 12% de acrilamida, separando así proteínas entre 10 y 70 kDa.

1. Desnaturalizar las muestras:
 - Tomar el volumen necesario de extracto que contenga la concentración adecuada de proteínas, determinada según lo descrito en el apartado 3.6.2.
 - Añadir el volumen necesario de 5x “Tampón de Carga”.
 - Hervir las muestras durante 5 min y cargar en el gel, junto con un marcador de peso molecular pre-teñido, que permita monitorizar la electroforesis y la transferencia a la membrana.
2. Separar las muestras aplicando un campo eléctrico de 25 mA, en tampón Laemmli.

Soluciones y materiales

- 29:1 Acrilamida: Bisacrilamida Mix (40%) (AppliChem).
- Tampón para el gel concentrador: 1.5 M Tris· HCl pH 6.8 y 0.1% SDS.
- Tampón para el gel separador: 1.5 M Tris· HCl pH 8.8 y 0.1% SDS.
- 10% persulfato amónico.
- Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Sigma).
- 5x “Tampón de Carga”: 250 mM Tris·HCl (pH 8.0), 50% glicerol, 10% SDS, 0.05% azul de bromofenol, 2% DTT, 1 mM β -mercaptoetanol (Sigma).
- Marcador de peso molecular pre-teñido *PageRulerTM Plus* (Thermo Scientific).
- 10x tampón de Laemmli: 25 mM Tris·HCl, 192 mM glicina, 0.1% SDS, en agua Milli-Q.
- Sistema de electroforesis *mini-protean tetra system* (BioRad).

3.6.4 Transferencia de las proteínas e inmunodetección (*Western blot*)

La técnica de *Western blot* permite detectar las proteínas separadas por SDS-PAGE, utilizando anticuerpos específicos. Está basada en la transferencia de las proteínas separadas en un gel de SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa, donde quedan inmobilizadas. La detección de las proteínas con los anticuerpos específicos se realiza directamente sobre la membrana.

Procedimiento

1. Montar un “*sándwich*”, teniendo en cuenta que las proteínas correrán del polo negativo al positivo, en el siguiente orden:
 - Dos esponjas humedecidas en tampón de transferencia.
 - Dos papeles *Whatman* humedecidos en tampón de transferencia.
 - Una pieza de membrana de nitrocelulosa humedecida en tampón de transferencia.
 - El gel de proteínas, humedecido también en tampón de transferencia.
 - Dos papeles *Whatman* humedecidos en tampón de transferencia.
 - Dos esponjas humedecidas en tampón de transferencia.

Colocar el *sándwich* en la cubeta de transferencia y cubrir con tampón de transferencia. Transferir a 80 V durante 1:30-2:00 horas (en función al tamaño de la proteína que se quiere detectar) a 4 °C, utilizando un agitador magnético.

2. Desmontar el “*sándwich*” y teñir la membrana y el gel, para asegurar que la transferencia ha sido correcta:
 - Tinción del gel: incubar con solución de tinción durante 15-30 minutos y desteñir con la solución de destinción, haciendo varios cambios para acelerar el proceso.
 - Tinción de la membrana: incubar con la solución de tinción de membranas y desteñir con agua destilada.
3. Inmunodetección:
 - Incubar la membrana con solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación.
 - Eliminar la solución de bloqueo e incubar con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C, en agitación.

- Realizar tres lavados de 10 minutos cada uno con 0.05% Tween-20 (Sigma) en 1x PBS.
- Incubar con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación.
- Realizar tres lavados de 10 minutos cada uno con 0.05% Tween-20 (Sigma) en 1x PBS.
- Eliminar el exceso de tampón de lavado de la membrana e incubar durante 1 minuto con una dilución 1:1 del revelador (InmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore).
- Realizar exposiciones a diferentes tiempos en una película de autorradiografía y revelar.

Soluciones y materiales

- Tampón de transferencia (pH 8.3): 25 mM Tris-base, 40 mM glicina, 0.05% SDS, 20% metanol.
- Solución de tinción de geles de proteínas: 10% ácido acético, 40% etanol, 0.05% *Comassie brilliant-blue* (Sigma).
- Solución de destinción de geles de proteínas: 30% metanol, 10% ácido acético.
- Solución de tinción de la membrana: 0.02% *Ponceau*.
- 1x PBS.
- Solución de bloqueo: 5% leche desnatada en 1x PBS/0.05% Tween 20.
- Soluciones de anticuerpos primario y secundario: preparadas en solución de bloqueo diluida 1/5 en PBS, utilizando las concentraciones de anticuerpo recomendadas por el proveedor.

Anticuerpos primarios:

- Anticuerpo monoclonal anti-p53 Pab240:sc-99 (Santa Cruz Biotechnology); obtenido en ratón y utilizado a una dilución 1/200.
- Anticuerpo monoclonal anti-p21^{WAF1} Ab-1 (Calbiochem); obtenido en ratón y utilizado a una dilución 1/100.
- Anticuerpo monoclonal anti-ciclina D1 (Santa Cruz Biotechnology); obtenido en ratón y utilizado a una dilución 1/100.

- Anticuerpo policlonal anti-Sp1 H-225 (Santa Cruz Biotechnology); obtenido en conejo y utilizado a una dilución 1/100.
- Anticuerpo policlonal anti-Sp3 H-225 (Santa Cruz Biotechnology); obtenido en conejo y utilizado a una dilución 1/100.
- Anticuerpo monoclonal anti-tubulina (Millipore); obtenido en ratón y utilizado a una dilución 1/5000.
- Anticuerpo monoclonal anti-GAPDH (Sigma); obtenido en ratón y utilizado a una dilución 1/5000.

Anticuerpos secundarios:

- Anticuerpo *anti-rabbit Ig horse radish peroxidase* (Amersham); utilizado a una dilución 1/5000.
- Anticuerpo *anti-mouse IgG horse radish peroxidase* (Sigma); utilizado a una dilución 1/5000.
- Membranas de nitrocelulosa Optitran BA-S85 (Schleicher & Schuell).
- Películas de autorradiografía Curix RP-2 Plus (AGFA).

3.7 ANÁLISIS DEL EFECTO DE LAS MITRAMICINAS SOBRE LA UNIÓN DE Sp1 A SU SECUENCIA CONSENSO EN EL DNA

3.7.1 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA-*Electrophoretic mobility shift assay*)

Se evaluó el efecto directo de las Mitramicinas MSK y DIG-MSK sobre la interacción del factor de transcripción Sp1 con su sitio consenso de unión potencial, contenido en un fragmento de DNA, partiendo de extractos proteicos nucleares de células HCT116.

Al incubar el fragmento de DNA marcado radioactivamente con un extracto de proteínas nucleares, su movilidad electroforética se verá reducida debido a la unión de diversas proteínas. Cuando se realiza una autorradiografía se observará cómo la banda se ha retardado en referencia al DNA libre. Los complejos de proteína-DNA formados bajo estas condiciones son específicos y/o inespecíficos, ya que el extracto proteico contiene proteínas que se unen a una secuencia en concreto como proteínas que se unen independientemente de la secuencia. Así, compiten con la proteína de interés por la unión a una secuencia específica del DNA.

Este inconveniente se puede minimizar mediante la inclusión de un competidor inespecífico (*carrier*) de DNA o polinucleótidos sintéticos como el Poly(dI-dC)•poly(dI-dC) que carecen del lugar de unión específica.

Por otra parte, la adición de un competidor específico, en exceso y sin marcaje radioactivo, es un control importante para verificar la especificidad de la unión de una proteína al fragmento de DNA marcado radioactivamente. El competidor específico típicamente tiene la misma secuencia que el fragmento de DNA marcado.

Procedimiento

Obtención de extractos proteicos nucleares

1. Tripsinizar las células (células sin tratar, en fase exponencial).
2. Inhibir la tripsina y lavar las células con 1x PBS, dos veces.
3. Descartar sobrenadante.
4. Resuspender el precipitado en 0.5 mL de tampón A.
5. Transferir el lisado a un tubo de microcentrífuga y mantener en hielo entre 10-15 minutos.
6. Centrifugar a 4 °C a velocidad máxima (~ 13.000 *xg*) durante 3 minutos.
7. Colocar el tubo en hielo y descartar el sobrenadante (restos de membrana plasmática y contenido citoplasmático).
8. Añadir 150 µL de tampón B a cada tubo y resuspender el precipitado (núcleos). Mantener en hielo.
9. Agitar en un orbital durante 2 horas, a 4 °C.
10. Centrifugar a 4 °C a máxima velocidad (~ 13.000 *xg*) durante 5 minutos.
11. Alicuotar el sobrenadante (contenido nuclear) en tubos nuevos previamente enfriados en hielo (alícuotas de 30 µL).
12. Usar una de las alícuotas para determinar la concentración de la proteína (Bradford).
13. Congelar el resto de las alícuotas a -80 °C.

Oligonucleótidos conteniendo un lugar Sp1-consenso

Se emplearon oligonucleótidos que contienen una secuencia de unión para Sp1 (Briggs et al., 1986). Se obtuvieron purificados por HPLC, por el proveedor (Sigma).

Sp1 directo: 5'-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3'

Sp1 reverso: 5'-GCTCGCCCCGCCCCGATCGAAT-3' (secuencia complementaria del oligonucleótido directo).

Anillamiento de oligonucleótidos complementarios

1. Mezclar en un tubo de microcentrífuga la misma cantidad de pmoles de oligonucleótidos complementarios, con tal de obtener 30 pmol de cada uno.
2. Incubar a 95 °C durante 15 minutos.
3. Apagar el baño y dejar los tubos protegidos de la luz durante toda la noche (o hasta que la temperatura del baño sea la ambiente ó 25 °C) para que haya un enfriamiento progresivo y se hibriden los oligonucleótidos.
4. Centrifugar brevemente.
5. Congelar hasta su uso.

Marcaje de los oligonucleótidos (Reacción de fosforilación)

1. En un tubo de microcentrífuga adicionar:
 - 13 µL H₂O.
 - 2 µL 10x Tampón T4 Polinucleótido quinasa.
 - 3 µL de un oligonucleótido de doble cadena (previamente hibridado): 4 pmol.
 - 1 µL T4 Polinucleótido quinasa.
2. En una Instalación Radioactiva adicionar:
 - 1 µL [γ -³²P] ATP (10 µCi/µL).

Para un volumen final de 20 µL:

3. Incubar la reacción durante 45 minutos a 37 °C.
4. Parar la reacción adicionando 5 µL 100 mM EDTA.
5. Aumentar el volumen de la reacción con 15 µL 1x TE (volumen final de 40 µL).

Purificación de los oligonucleótidos marcados mediante columnas de cromatografía (MicroSpin column S-300HR, GE Healthcare)

Para purificar los 40 µL de oligo marcado:

1. Resuspender la resina en la columna con un vórtex.
2. Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL tapa rosca como soporte.

3. Pre-centrifugar la columna a 735 *xg* (3.000 r.p.m) durante 1 minuto.
4. Colocar la columna en un tubo de 1,5 mL nuevo, retirar y descartar la tapa y, lentamente, adicionar la muestra a la parte superior central de la resina.
5. Centrifugar la columna a 735 *xg* durante 2 minutos. La muestra purificada se recoge en la parte inferior del tubo de soporte.
6. Disolver en agua hasta obtener ~ 25 – 30 c.p.s./ μ L.
7. Congelar.

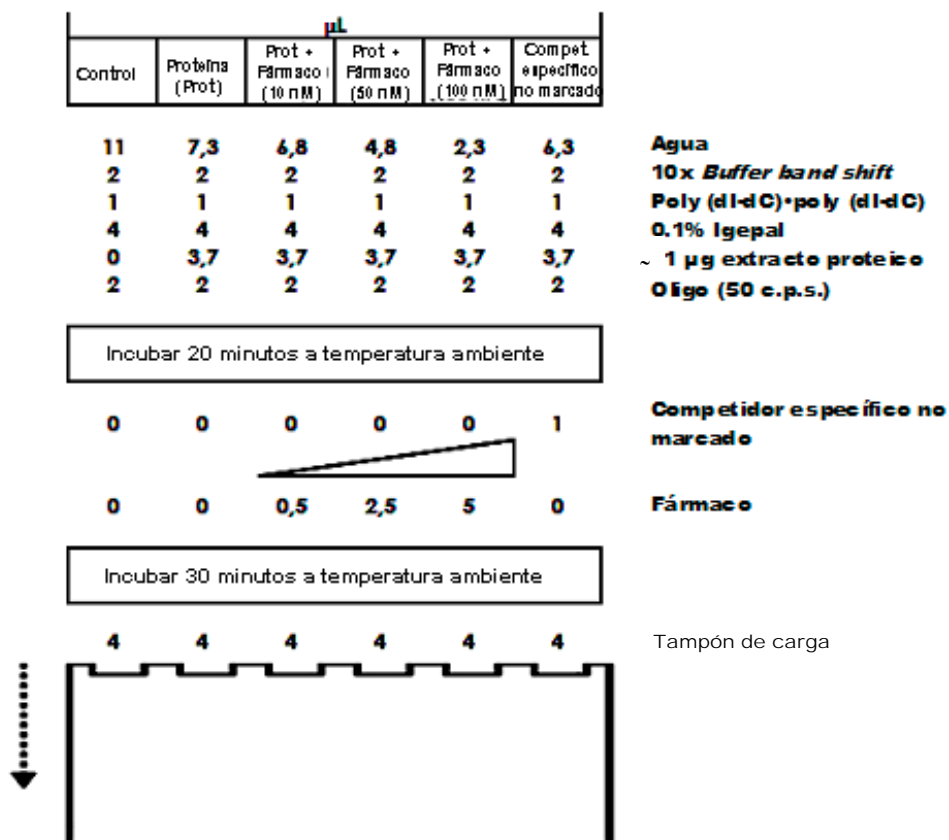
Reacciones de unión (*binding*)

1. Preparar en tubos de microcentrífuga las reacciones de *binding* y los controles, para 20 μ L de volumen final para cada reacción:

Para cada reacción adicionar:

- 2 μ L 10x Tampón de incubación (*Buffer Band Shift*).
 - 1 μ L 0.5 μ g/ μ L Poly(dI-dC)•poly(dI-dC): previamente tomar 30 μ L de un *stock* de 1 μ g/ μ L Poly(dI-dC)•poly(dI-dC) y diluir con 30 μ L de agua Milli-Q. Se utilizó este polinucleótido para suprimir uniones inespecíficas.
 - ~ 1 μ g de extracto proteico nuclear, excepto al control 1 (donde se espera observar únicamente una banda correspondiente al oligonucleótido radioactivo).
 - 4 μ L 0,1% Igepal (NP-40).
 - 2 μ L de oligonucleótido radioactivo (50 c.p.s), correspondiente aprox. a 0.05 pmol por reacción.
 - Completar a un volumen final de 20 μ L con agua Milli-Q.
2. Incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos.
 3. Adicionar a tres de las reacciones, fármaco a concentraciones crecientes, partiendo de la dosis IC₇₅.
 4. Adicionar a una de las reacciones (control 2) 1 μ L de oligonucleótido no marcado, como competidor específico en exceso (20 veces más, 1 pmol).
 5. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
 6. Añadir 4 μ L de 5x “Tampón de Carga” a cada tubo de microcentrífuga, mezclar suavemente (sin vórtex) y correr en un gel no desnaturizante de poliacrilamida.

A continuación se presenta el esquema del protocolo de un ensayo de EMSA.



Electroforesis

1. Preparar un gel nativo de 5% poliacrilamida en 0.5x TBE, utilizando 1 mm de grosor (los volúmenes de los reactivos para los siguientes apartados están optimizados para este tamaño de gel):

Para un volumen de 10 mL

10x TBE	500 μL
40% Acrilamida:Bisacrilamida (29:1)	1.3 mL
1% NP-40 o Igepal (20 μL NP-40 + 1980 μL agua)	833 μL
Agua Milli-Q	7276 μL
TEMED	7 μL
10% PSA	84 μL

2. Montar en la cubeta de electroforesis, llenar con 0.5x TBE y limpiar los pocillos.
3. Pre-correr el gel a 20 mA durante 5 minutos a 4 °C.
4. Cargar 20 μL de cada muestra más los 4 μL del “Tampón de Carga”.

5. Correr el gel a 12 V/cm a 4 °C hasta que el azul de bromofenol haya migrado 2/3 ó 3/4 partes.
6. Una vez haya corrido el gel, llevarlo en uno de los vidrios a una cubeta con agua para limpiarlo. Retirar el exceso de líquido con papel *Whatman*, cubrir con *film* transparente (*Saran Wrap*) y secarlo a 80 °C durante 20 minutos en un sistema de vacío. Exponerlo a una película de autorradiografía Curix RP- (AGFA).
7. Cuantificar las señales obtenidas con un densitómetro.

Soluciones

- Tampón A: 10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina, 0.8% Igepal, en agua Milli-Q.
- Tampón B: 20 mM Hepes pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 10% glicerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2 µg/mL aprotinina, 1 µg/mL leupeptina, en agua Milli-Q.
- 1x Tampón de Incubación (*Buffer Band Shift*): 10 mM Tris·HCl (pH 7.4), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 µM ZnCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 2.5% glicerol.
- Densitómetro Typhoon 860 (GE Amersham Molecular Dynamics).

3.8 ESTUDIO DE INHIBICIÓN POR LAS MITRAMICINAS DE LA UNIÓN DE Sp1 A SUS SECUENCIAS CONSENSO EN PROMOTORES

3.8.1 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Con el objetivo de determinar si DIG-MSK inhibe y/o compite con el factor de transcripción Sp1 por la unión a los sitios consenso en los promotores de los genes, se inmunoprecipitó cromatina usando un anticuerpo específico contra Sp1, a partir células control A2780 de carcinoma de ovario (sin tratamiento) y células tratadas con DIG-MSK durante 24 horas (tiempo en el cual se evaluó el efecto de la molécula sobre la transcripción).

Procedimiento

1. Sembrar en 1 frasco de 175 cm² (1 x 10⁷ células en 25 mL de medio de cultivo), por cada condición experimental (con o sin tratamiento con fármacos).

2. *Crosslinking*: Adicionar 0.67 mL de 37% Formaldehído a cada frasco de 25 mL (directamente al medio de cultivo), de esta manera quedará a una concentración final del 1%. Incubar 10 minutos en agitación.
3. Detener la reacción mediante la adición de Glicina a una concentración final de 0.125 M, usando una solución *stock* de 1 M en 1x PBS (3.2 mL 1M glicina). Agitación por 5 min a TA.
4. Descartar el medio de cultivo (de esta manera se eliminarán las células muertas) y adicionar en el frasco 10 mL de 1x PBS frío, agitar durante 5 minutos. Repetir el lavado 2 veces.
5. Adicionar 10 mL de 1x PBS y desprender las células. No tripsinizar.
6. Transferir cada condición a tubos de polipropileno de 15 mL y centrifugar 3 minutos a 1.500g a 4 °C.
7. Resuspender cada precipitado con 5 mL de 1x PBS frío para lavar las células. Volver a centrifugar 3 minutos a 1.500g a 4 °C. Realizar dos lavados.
8. Resuspender el precipitado en 10 mL de tampón ChIP *wash* A y transferir la suspensión a tubos de polipropileno de 15 mL.
9. Incubar 20 minutos en rotación a 4 °C. Centrifugar nuevamente.
10. Resuspender el precipitado en 10 mL de tampón ChIP *wash* B e incubar 20 minutos en rotación a 4 °C. Centrifugar nuevamente.
11. Adicionar 4.5 mL de tampón 1x TE y resuspender por pipeteo.
12. Adicionar 500 µL 10% SDS, invertir el tubo 5 veces y centrifugar durante 3 minutos a 1.500g a 4 °C.
13. Cuidadosamente descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado con 4 mL de 1x TE, invertir 5 veces, centrifugar 3 minutos a 1.500g a 4 °C.
14. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado con 4 mL de 1x TE, centrifugar 3 minutos a 1.500g a 4 °C.
15. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 1x TE y 1 mM PMSF hasta obtener un volumen final de 4 mL (40 µL 100 mM PMSF + 3.96 mL de 1x TE). Adicionar 40 µL 10% SDS. Mezclar por 10 minutos en rotación a 4 °C.
16. Hacer alícuotas de 500 µL en tubos de polipropileno de 15 mL que serán luego utilizadas para la sonicación.
17. Sonicación: Realizar ciclos de sonicación de 30 seg *on* / 30 seg *off* en potencia *High*. Hacer 2 ciclos de 10 minutos y 1 ciclo de 5 minutos (Los tiempos incluyen el *off state*). Antes y durante las sesiones enfriar el baño de agua con hielo.

18. Combinar los lisados de cada condición en un tubo y adicionar las siguientes soluciones en orden y entre cada adición incubar 2 minutos en rotación a 4 °C:
- 10% Triton X100, concentración final al 1% (420 µL)
 - 10% Desoxicolato sódico (DOC), concentración final 0,1% (42 µL)
 - 4 M NaCl, concentración final 140 mM (150 µL)
19. Incubar 20 minutos en rotación a 4 °C y centrifugar 5 minutos a máxima velocidad a 4 °C. Hacer alícuotas de 500 µL en tubos de microcentrífuga para cada condición y congelarlas a -80 °C.

Comprobación el tamaño de los fragmentos de DNA en un gel de agarosa:

- *Descrosslinkar* 100 µL de cromatina sonicada para verificar su tamaño.
 - Adicionar a los 100 µL de la cromatina sonicada 5 µL 4M NaCl (concentración final 200 mM).
 - Incubar toda la noche a 65 °C.
 - Preparar 1 mL:
 - 20 µL 20 mg/mL Proteinasa K (concentración final: 0.4 mg/mL)
 - 8 µL 10 mg/mL RNase (concentración final: 0.08 mg/mL)
 - 2 µL 20 mg/mL *pellet paint* (concentración final: 0.04 mg/mL)
 - 970 µL 1x TE
20. Adicionar 105 µL de la solución de Proteinasa K a los 105 µL de cromatina que se dejó incubando O/N con NaCl, de esta manera quedará a una proporción 1:1.
21. Incubar a 37 °C por 30 minutos y 1 hora 45 minutos a 50 °C.
22. Precipitar con 4M LiCl: Tomar 100 µL de cromatina desproteinizada y adicionar 100 µL de solución de Proteinasa K. Mezclar por pipeteo y adicionar 22 µL 4M LiCl (concentración final 0.4 M), mezclar por pipeteo.
23. Adicionar 200 µL de fenol/cloroformo y mezclar con un vórtex por 30 segundos.
24. Centrifugar por 4 minutos a máxima velocidad.
25. Tomar la fase acuosa y añadir aproximadamente 4 Vol de 100% etanol frío. Incubar por 30 minutos, o toda la noche, a -20 °C.
26. Centrifugar por 20 minutos a 4 °C a máxima velocidad.
27. Lavar con 1Vol de 70% etanol frío, centrifugar 10 minutos a máxima velocidad.
28. Descartar el sobrenadante y dejar secar el precipitado.
29. Resuspender en 10 µL 1x TE.

30. Cargar la muestra de en un gel 1% agarosa. Correrlo a 80 V (1V/cm) y 400 mA), junto con un control de cromatina sin *descrosslinkar* (fragmentos entre 200 y 600 pb).

Inmunoprecipitación de la cromatina sonicada:

1. Mezclar *Dynabeads protein A* (Invitrogen) por pipeteo y transferir 30 μ L de *Dynabeads* a un tubo de microcentrífuga (30 μ L por cada inmunoprecipitación).
2. Colocar los tubos de microcentrífuga sobre un Magneto (DynaMag, Invitrogen) durante pocos minutos para separar las perlas de la solución. Descartar el sobrenadante.
3. Retirar los tubos de microcentrífuga del magneto y realizar dos lavados con Tampón 1x RIPA de 10 minutos cada uno en rotación a 4 °C. Colocar los tubos de microcentrífuga en el magneto y eliminar el sobrenadante.
4. Bloquear las perlas con 1 mL de 5 mg/mL BSA/Tampón 1x RIPA por 2 horas en rotación a 4 °C. A la vez realizar un pre-aclarado de cada una de las muestras de cromatina, incubándolas con 80 μ L de *Dynabeads* (previamente lavadas con Tampón 1x RIPA) para eliminar posibles interacciones inespecíficas (2 horas en rotación a 4 °C).
5. Posteriormente, colocar los tubos de microcentrífuga sobre el Magneto y retirar el sobrenadante. Eliminar el exceso de BSA mediante tres lavados por 10 minutos con Tampón 1x RIPA, en rotación a 4 °C. y luego 3 lavados de 5 minutos cada uno con 1x TE.
6. Incubar cada vial de cromatina (500 μ L) previamente pre-aclarada con 6 μ g de anticuerpo anti-Sp1 ó 6 μ g de anticuerpo anti-IgG, por 2 horas en rotación a 4 °C. El anticuerpo anti-IgG se utilizó como control negativo para la inmunoprecipitación no específica, brindando una idea del *background* o ruido de fondo de la técnica, este control será nombrado en adelante como *Mock*.
7. Realizar 2 lavados con Tampón 1x RIPA para eliminar todo el material unido inespecíficamente.
8. Adicionar a las *Dynabeads* bloqueadas las muestras que han sido pre-incubadas con cada anticuerpo. Incubar por 10 minutos en rotación a 4 °C.
9. Colocar los tubos de microcentrífuga sobre el magneto y eliminar el sobrenadante. Realizar 3 lavados de 10 minutos a 4 °C con Tampón 1x RIPA, seguido de dos lavados por 2 minutos con 1 mL de 1x TE frío.

10. Resuspender las *Dynabeads* en 100 μL 1x TE y transferir a tubos de microcentrífuga nuevos para evitar la co-elución de de proteínas unidas a las paredes de los tubos.

Elución:

1. Eluir junto con las muestras de cromatina inmunoprecipitada, una fracción correspondiente al 10% de cromatina sonicada no inmunoprecipitada (*Input*) de cada condición experimental (material de partida); que servirá para la normalización de los datos, calculando la cantidad de material inmunoprecipitado. El *Input* da una medida del número total de sitios de unión en los promotores de los genes, antes de la inmunoprecipitación.
2. Eluir el volumen total del material inmunoprecipitado.
3. *Descrosslinkar* la cromatina inmunoprecipitada adicionando a los 100 μL de complejos Dynabeads-Anticuerpo-Antígeno-DNA 5 μL 4M NaCl (concentración final 200 mM). En el caso de cada *Input* (50 μL) adicionar 2.5 μL de NaCl.
4. Incubar toda la noche a 65 °C y posteriormente, retirar las perlas y recuperar el sobrenadante en tubos de microcentrífuga nuevos.
5. Desproteínizar de la misma manera que se hizo para comprobar el tamaño de los fragmentos de cromatina sonicada.

Cuantificación del DNA inmunoprecipitado por qRT-PCR:

1. Una vez se haya purificado el DNA, resuspender el precipitado en 20 μL 1x TE y cuantificar mediante qRT-PCR. Como control negativo de la qRT-PCR se amplificó una región codificante para la *GAPDH* que carece de sitios de unión para Sp1.
2. Comprobar las amplificaciones para cada gen mediante electroforesis en gel de agarosa del *Input*, *Mock* y DNA precipitado con anti-Sp1.
3. Realizar un análisis del enriquecimiento del DNA del *input* en las fracciones inmunoprecipitadas, para determinar la ocupación de Sp1 en los promotores de los genes. Para ellos, normalizar de los valores Ct obtenidos en cada qRT-PCR del DNA precipitado con anti-Sp1 y del *Mock* para cada condición experimental, en base al porcentaje de *input* como material de partida (10%), mediante la fórmula:

$$(\text{Ct}[\text{ChIP}] - \text{Ct}[\text{Input} \times \text{DF}])$$

Siendo DF el factor de dilución de la fracción de *input* usada como material de partida.
En este caso 0.1 (10% de *input*).

4. Luego, establecer el porcentaje de DNA inmunoprecipitado que contiene sitios de unión ocupados por Sp1:

$$((2^{-\Delta Ct}) \times 100\%)$$

Siendo $2^{-\Delta Ct}$ el valor obtenido tras normalizar por el *input*, las Cts de la amplificación de cada condición experimental.

Soluciones y materiales

- 1 M Glicina en 1x PBS.
- *ChIP wash A*: 10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA y 0.25% Triton X100.
- *ChIP wash B*: 10 mM, Hepes pH 7.9 , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA y 0.01% Triton X100.
- Tampón 10x RIPA: 140 mM NaCl, 10 mM Tris·HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1% Tritón X-100, 0.1% SDS, 0.1% DOC (Desoxicolato) y 1x Inhibidor de proteasas.
- LiCl ChIP: 250 mM LiCl, 10 mM Tris·HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5% Igepal (NP40) y 0.5% DOC.
- Inhibidor de proteasas 10x: Tomar una pastilla y diluirla en 10 mL de H₂O Milli-Q. Agitar a 4 °C hasta que se mezcle bien.
- Dynabeads protein A (Invitrogen).
- Magneto (DynaMag, Invitrogen).
- Anticuerpos: - Anti-Sp1 (H225X, Santa Cruz).
- Anti-IgG (Thermo Scientific).

3.9 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS RESULTADOS

3.9.1 Análisis estadístico de la qRT-PCR

El análisis de los datos generados en la qRT-PCR del panel de genes involucrados en el control del ciclo celular en células HCT116, se realizó usando el *PCR Array Data analysis template* (SABiosciences) así como el programa disponible en la web: <http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>, que genera un análisis estadístico de los datos.

Los valores de expresión relativa de los diferentes genes se calcularon a partir del *threshold cycle* (C_t) siguiendo el método $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001) y usando el gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) como control interno de normalización.

3.9.2 Análisis estadístico de los datos de *microarrays*

Los valores obtenidos sin procesamiento (*raw data*) están siempre sujetos a algún tipo de variación debida a la manipulación técnica. Deben, por tanto, ser pre-procesados para asegurar que los resultados sean lo más precisos posible. El tratamiento estadístico se realizó usando el programa Bioconductor con los paquetes de análisis de *microarrays*: Limma, affy, pcaMethods y EMA ejecutados bajo el entorno R. Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Luis Alcaraz de Bioarray SL (Elche).

1. Sustracción de ruido de fondo: Para ajustar y corregir las intensidades de las señales de fluorescencia obtenidas en cada *spot* se usó el método *normexp* con *offset=20* (valor por defecto para la compensación de las intensidades).
2. Normalización inter-*array*: Mediante la normalización se pretende asegurar que las diferencias en intensidad realmente reflejan la expresión diferencial de los genes y que no haya sesgos artificiales debido a factores técnicos. Los datos se sometieron a una normalización entre todos los *microarrays*, haciéndolos comparables entre sí. Para ello, se utilizó el método de cuantiles, bajo la notación M-A (M: Log *ratios* de la intensidad de la señal de fluorescencia; A: Media de los Log de la intensidad de la señal de fluorescencia).
3. Ajuste a un modelo lineal: Con el fin de extraer los genes con expresión diferencial significativa, minimizando la aparición de falsos positivos. Para ello, se eliminaron las sondas control para la construcción del modelo. De esta manera, se construyó la matriz de diseño y se extrajeron todos los contrastes de interés.

Se consideró que un gen cambió su perfil de expresión cuando disminuyó (≤ 0.67 *fold-change*) o aumentó (≥ 1.5 *fold-change*) sus niveles más de 1.5 veces ($p < 0.05$) respecto a las señales de intensidad de fluorescencia de los genes presentes en el *microarray* control normalizado.

3.9.3 Ontología de los genes

La clasificación funcional de los genes (*Gene Ontology* (GO)) cuya expresión se reducía o aumentaba tras el tratamiento con las Mitramicinas, se realizó en las categorías: “procesos biológicos y función molecular”. El análisis se basa en la comparación de todos los genes que disminuían o aumentaban su nivel de expresión frente al total de genes involucrados en el control del ciclo celular (incluidos en el análisis por qRT-PCR, en el caso de las células HCT116) o en los *microarrays* (en el caso de las células A2780). La comparación se realizó con el programa PANTHER (*Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships*) v. 7.0 (Thomas et al., 2003) disponible en: <http://www.pantherdb.org/tools/genexAnalysis.jsp> (última visita: 09 de mayo de 2014), que usa un *test* binomial para evaluar la significancia estadística. Se usó la herramienta GATHER disponible en: <http://gather.genome.duke.edu/> para obtener información adicional acerca de otras categorías (última visita: 09 de mayo de 2014).

3.9.4 Análisis de la presencia de secuencias de unión para factores de transcripción, en los promotores de los genes

Con el objetivo de analizar la prevalencia de motivos de unión para algunos factores de transcripción ricos en GC, en los promotores de genes que disminuyeron su nivel de expresión tras la exposición a MSK o DIG-MSK, se utilizó el programa TELiS (*Transcription Element Listening System*) (Cole et al., 2005) disponible en: <http://www.telis.ucla.edu/index.php?cmd=transfac> (última visita: 09 de mayo de 2014). El análisis de incidencia dado por el programa determina si un sitio de unión potencial para un factor de transcripción está presente en la mayor parte de la población de genes diferencialmente expresados, de esta manera proporciona el porcentaje de promotores con al menos un sitio de unión. El programa realiza un análisis binario (test binomial exacto) para el tratamiento estadístico de los datos.

Se utilizaron los parámetros por defecto, recomendados por el programa:

- *Microarray*: “All human genes”
- *Tamaño del promotor*: -600 bases.
- “Astringencia”: *High* (0.9).

La utilización de estos parámetros brinda un buen balance entre sensibilidad y especificidad.

Las secuencias consenso correspondientes a los sitios de unión para los factores de transcripción localizados en las regiones promotoras, se derivaron de múltiples análisis comparativos realizados por la herramienta informática TELiS (Cole et al., 2005).

3.9.5 Identificación de vías de señalización afectadas tras el tratamiento de células A2780 con DIG-MSK

La identificación de rutas biológicas de interés particularmente afectadas tras el tratamiento de células A2780 con DIG-MSK, así como el enriquecimiento de determinados factores de transcripción, se realizó mediante la herramienta GePS (*Genomatix Pathway System*) (Schaefer et al., 2009) disponible en la URL: http://www.genomatix.de/online_help/help_geps/geps_help.html#geps_access (última visita: 09 de mayo de 2014). Esta herramienta utiliza el *test* exacto de Fisher para realizar el tratamiento estadístico de los datos.

En el análisis se incluyó el total de genes con expresión diferencial significativa. Se evaluaron de la siguiente manera: un primer grupo conteniendo en aquellos genes que disminuyeron su nivel de expresión al realizar tratamientos individuales con dos concentraciones distintas de DIG-MSK (detallado más adelante en Resultados), un segundo grupo con los genes que aumentaron su nivel de expresión con una u otra concentración y un tercer grupo que incluía los genes diferencialmente expresados independientemente de la concentración de fármaco usada (aumento o disminución de la expresión con una u otra concentración).

Para generar las diferentes redes de interacción génica, GePS usa información de la literatura combinada con información de anotaciones de la propia herramienta, vías de señalización y términos *GO* y *MeSH*. En este caso, nos basamos en la información generada para Factores de Transcripción y *MeSH diseases* (sub-categoría: *Ovarian Neoplasm*). La

herramienta estima la asociación de términos biológicos con genes derivados de los listados dados para los análisis y, calcula los *p*-valor respectivos.

3.9.6 Análisis de agrupamiento de los genes: identificación de patrones de expresión

A partir de los patrones de expresión de las células A2780 (tratadas *versus* no tratadas), normalizados y previamente filtrados (valores Log_2), se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico (*clustering*) de los genes, usando el programa TIGR-MeV v. 4.9 (*MultiExperiment Viewer*) (Saeed et al., 2003). Este programa se usó para agrupar y clasificar los datos mediante los coeficientes de correlación de Pearson. Para el análisis se utilizó el conjunto de genes que aumentaban o reducían su nivel de expresión independientemente de las concentraciones de DIG-MSK usadas para el tratamiento (los detalles se describen en Resultados, apartado 3.9.5), seleccionando aquellos genes relevantes en carcinoma de ovario (derivados de un análisis previo en GePS, que contienen en sus promotores sitios consenso de unión para Sp1, verificados a través del programa TELiS (descrito en el apartado 3.9.4). El conjunto de genes usado, así como del criterio de selección empleado se presentan en detalle en Resultados.

Adicionalmente, usamos la herramienta *online* Enrichr: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/> (última visita: 09 de mayo de 2014) con el objetivo de obtener una idea no sesgada acerca de si los genes con nivel de expresión disminuido por el tratamiento con DIG-MSK en células A2780, se encontraban entre los genes descritos por incrementar su expresión en este tipo celular, participando por lo tanto, en las características del estado transformado del carcinoma de ovario. Enrichr funciona comparando los listados de genes derivados de los experimentos, con listados existentes creados a partir de datos de resultados experimentales analizados, publicados, curados y organizados en diferentes bibliotecas (Chen et al., 2013).

El listado de genes con expresión reprimida ($\leq 0.67\text{-fold}$, $p < 0.05$) tras el tratamiento con DIG-MSK se comparó con el listado de genes incluidos en la *Cancer Cell Line Encyclopedia* (Barretina et al., 2012). La herramienta Enrichr realiza un *test* exacto de Fisher (Chen et al., 2013) para evaluar la significancia estadística de la superposición entre el listado dado para el análisis y los genes sobreexpresados en células A2780.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE DIG-MSK SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN EN CÉLULAS HCT116 DE CARCINOMA DE COLON HUMANO Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL

En la primera parte de este trabajo, se comparó el efecto antitumoral de las Mitramicinas SK y DIG-MSK en células HCT116 de carcinoma de colon. Se usó esta línea celular, partiendo del conocimiento previo de la respuesta de esta células al tratamiento con MSK, descrito previamente en nuestro laboratorio (Bataller et al., 2008).

4.1.1 Las nuevas Mitramicinas MSK y DIG-MSK inhiben la proliferación de células HCT116

Para comparar el efecto antiproliferativo del nuevo análogo DIG-MSK con la molécula estructuralmente relacionada MSK en la línea celular HCT116 se usó el ensayo colorimétrico del MTT, incubando durante 72 horas con concentraciones crecientes de MSK o DIG-MSK (como se detalla en Materiales y Métodos). A partir de la capacidad antiproliferativa determinada mediante el método del MTT, se calculó la concentración de cada molécula que inhibía el crecimiento celular en un 50% o un 75% (IC_{50} e IC_{75}) con respecto a las células sin tratar. La Tabla 4 muestra los valores IC_{50} e IC_{75} calculados después de 72 horas de tratamiento continuo con MSK o DIG-MSK. El nuevo análogo DIG-MSK se comportó como un agente antiproliferativo más eficaz que la MSK, ya los valores obtenidos resultaron significativamente diferentes (*t-Student*; $p < 0.05$), indicando que se necesitaron concentraciones más bajas de DIG-MSK para obtener efectos equitóxicos.

Tabla 4. Dosis IC_{50} e IC_{75} para las Mitramicinas MSK y DIG-MSK, en células HCT116. Los valores son el resultado de la media \pm SD (desviación estándar) de tres experimentos independientes.

HCT116	DIG-MSK	MSK
	IC_{50} (nM)	6.93 \pm 0.88**
IC_{75} (nM)	11.40 \pm 0.34*	23.96 \pm 4.4

Las diferencias estadísticas de las dosis IC_{50} e IC_{75} entre la MSK y DIG-MSK son significativas: * $p < 0.05$ *t-Student*, ** $p < 0.01$ *t-Student*.

De acuerdo con los ensayos antiproliferativos descritos, los subsecuentes experimentos realizados con las células HCT116, se llevaron a cabo con la dosis IC_{75} de cada molécula.

4.1.2 DIG-MSK reduce la viabilidad celular

El ensayo del MTT permite determinar el porcentaje de inhibición de la proliferación tras el tratamiento con los fármacos, pero no discrimina si dicha inhibición se debe a la inducción de muerte celular (efecto citotóxico) o por el contrario, se debe a la detención de las células en alguna de las fases del ciclo celular (efecto citostático). Por esta razón, realizamos un recuento celular mediante tinción con azul de Tripano como método inicial de evaluación de citotoxicidad.

La Figura 8 muestra el número de células vivas totales adheridas al frasco de cultivo, tanto en el control (células sin tratamiento) como en las células tratadas con la IC_{75} (11 nM) DIG-MSK. Como puede observarse, el tratamiento provocó una inhibición del crecimiento de las células a partir de las 48 horas, manteniéndose hasta las 72 horas. El recuento celular con azul de Tripano se realizó también para las células del sobrenadante (datos no mostrados), en donde se contaron muy pocas células y se observaron detritos celulares.

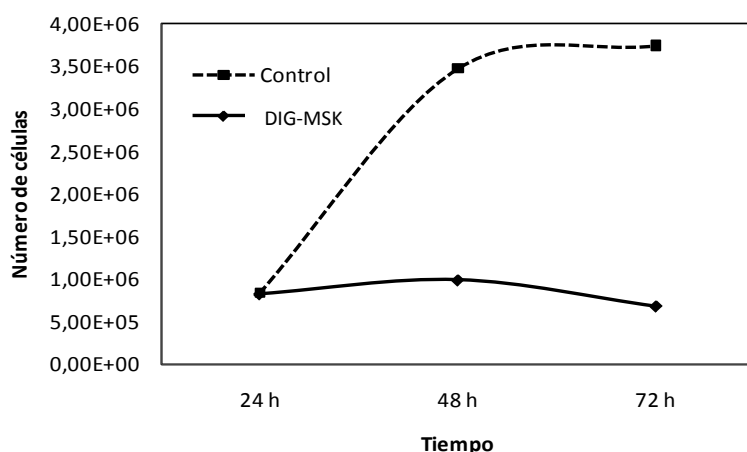


Figura 8. Recuento de la viabilidad celular transcurridas 72 horas de tratamiento con DIG-MSK, en células HCT116. Los datos representan la media \pm SD de tres experimentos.

4.1.3 Evaluación del mecanismo de muerte celular mediante citometría de flujo

Con el fin de determinar si el porcentaje de muerte celular observado mediante azul de Tripano correspondía a una muerte celular apoptótica o por el contrario necrótica, se realizó un análisis por citometría de flujo mediante doble tinción con Anexina-V-Fluos e IP, a partir de un *pool* de células adheridas y de células del sobrenadante.

Las células se analizaron a las 72 horas de tratamiento con tres concentraciones diferentes: (1) 11 nM DIG-MSK correspondiente a la IC_{75} , (2) 30 nM DIG-MSK, concentración usada para realizar una prueba en paralelo (correspondiente a aprox. la dosis IC_{90}) con el objetivo de identificar si la mortalidad celular aumentaba de manera dosis-dependiente ó (3) 23 nM MSK. Los porcentajes de muerte celular producida por DIG-MSK o MSK fueron diferentes, siendo MSK la molécula que provocó el mayor porcentaje de mortalidad (~ 90%), mayoritariamente con un fenotipo apoptótico/apoptótico secundario (Fig. 9). Por su parte, las células expuestas a 11 nM DIG-MSK mostraron un bajo porcentaje de muerte (~ 10%), básicamente por apoptosis/apoptosis secundaria (Fig. 9).

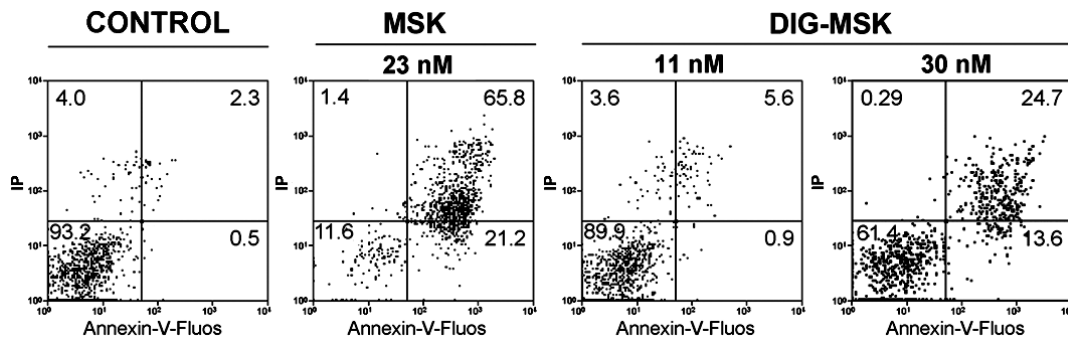


Figura 9. Doble tinción con Anexina-V-Fluos e IP de células HCT116 tratadas con MSK y DIG-MSK. Dentro de cada panel se encuentra la cuantificación del porcentaje de muerte celular por necrosis primaria (Anexina-V-/IP+), apoptosis primaria (Anexina-V+/IP-), necrosis/apoptosis secundaria (Anexina-V+/IP+) y el porcentaje para células viables (Anexina-V-/IP-).

El tratamiento de las células HCT116 con DIG-MSK, mostró mayor efecto antiproliferativo que con la MSK. Sin embargo, el porcentaje de muerte celular a las 72 horas fue más bajo, indicando que con la concentración usada el efecto tiende a ser citostático más no citotóxico. Cabe resaltar que el análisis con 30 nM, (Fig. 9 panel derecho), aún dentro del rango nanomolar, incrementó la muerte celular cerca de un 40%, siendo mayoritariamente dada por un mecanismo apoptótico/apoptótico secundario.

4.1.4 Análisis de la distribución de fases del ciclo celular tras el tratamiento con MSK o DIG-MSK

Si bien los resultados obtenidos con el ensayo del MTT mostraron inhibición del crecimiento celular, éstos no coincidieron completamente con el recuento de viabilidad/mortalidad ni con el análisis del tipo de muerte celular, ya que se observó mayor

inhibición de la proliferación que mortalidad celular. Consecuentemente, se decidió analizar las perturbaciones del ciclo celular inducidas por el tratamiento con DIG-MSK, con el fin de determinar si la causa de la inhibición del crecimiento podría estar determinada por una parada a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular.

La Figura 10 muestra las variaciones en la distribución del ciclo celular de células control y de células tratadas con concentraciones equitóxicas de MSK o DIG-MSK a diferentes tiempos de incubación. Como puede observarse, los controles (0 horas) presentan una distribución que corresponde a una proliferación de células inalteradas, mostrando un mayor pico en la fase G1 (entre el 54-65%) (Fig. 10(A) y 10(B), 0 horas).

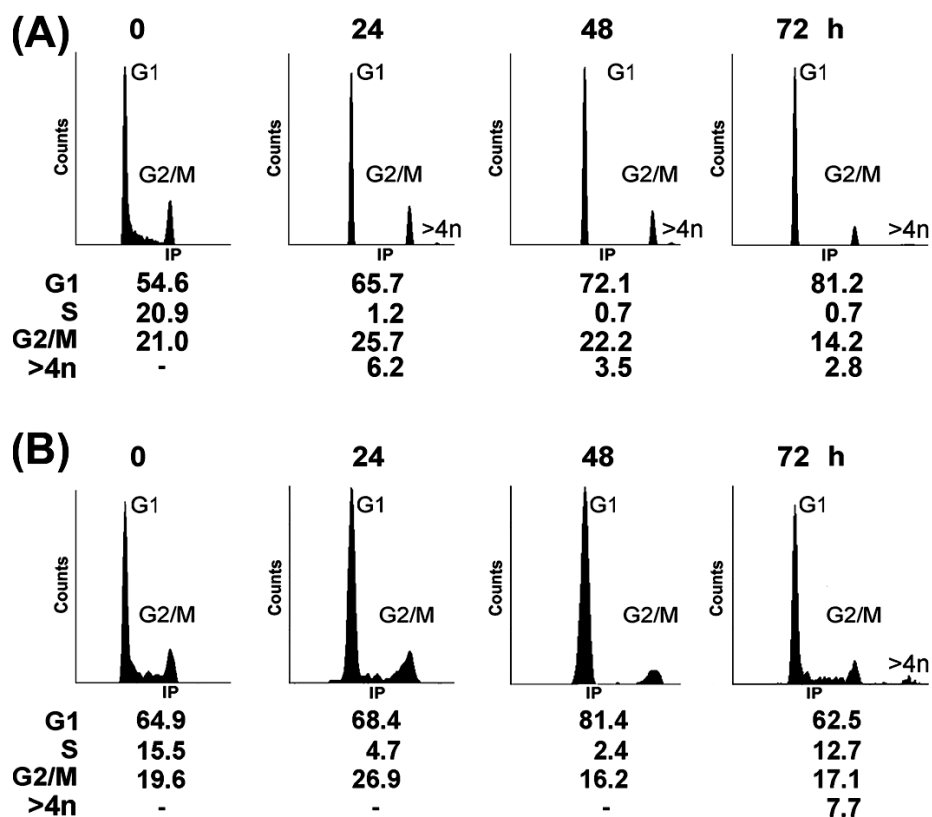


Figura 10. Cambios en la distribución del ciclo celular a lo largo del tiempo, inducidos por el tratamiento de células HCT116 con MSK o DIG-MSK.

Después del tratamiento de las células con 23 nM MSK, el análisis mediante citometría de flujo mostró que la mayor parte de las células se encontraban detenidas en la fase G1 del ciclo celular: 24 horas (65.7%), 48 horas (72.1%) y 72 horas (81.2%), con ausencia casi total de fase de síntesis (S): 24 horas (1.2%), 48 horas (0.7%) y 72 horas (0.7%) (Fig. 10(A)). En el caso del tratamiento realizado con 11 nM DIG-MSK, se observó un

comportamiento similar, fase G1: 24 horas (68.4%), 48 horas (81.4%) y 72 horas (62.5%), y una población minoritaria de células en fase S: 24 horas (4.7%), 48 horas (2.4%) y 72 horas (12.7%) (Fig. 10(B)).

Por otra parte, tal y como puede observarse en la Figura 10, un porcentaje minoritario de la población celular tratada con MSK presentó múltiples núcleos desde las 24 horas, a diferencia de lo observado para las células tratadas con DIG-MSK, donde únicamente a partir de 72 horas se observó cerca de un 8% de células poliploides. Esta observación se confirmó para las células tratadas con DIG-MSK mediante microscopía de contraste de fases (Fig. 11, panel derecho).

En general, las células mostraron una morfología normal hasta las 24 horas posteriores al tratamiento con DIG-MSK, luego, empezaron a presentarse células de mayor tamaño con múltiples núcleos, sugiriendo una mitosis aberrante (Fig. 11).

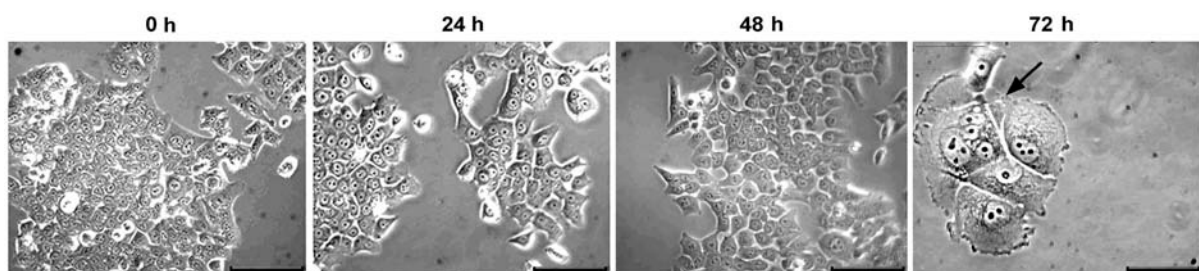


Figura 11. Morfología de las células HCT116 tratadas con 11 nM DIG-MSK, observadas por microscopía de contraste de fases a diferentes tiempos. La flecha ubicada en el panel de 72 h de tratamiento indica la presencia de algunas células multinucleadas. Barra, 50 μ m.

4.1.5 DIG-MSK induce mayores variaciones que MSK en la transcripción de genes involucrados en la regulación del ciclo celular

Para la evaluación de los cambios en el perfil transcripcional de las células HCT116 tratadas con MSK o DIG-MSK *versus* el control (células no tratadas), se realizaron experimentos de qRT-PCR usando el *array: Human Cell Cycle RT2 Profiler PCR Array* (SABiosciences). Para ello, se obtuvo RNA tanto de células control (sin tratamiento) como de células tratadas por 24 horas con MSK o DIG-MSK. La concentración y calidad del RNA determinada espectrofotométricamente por el NanoDrop ND-1000 (relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230}), estuvo en el rango esperado: entre 1.8 y 2 y ligeramente por encima de 2,

respectivamente. Estos resultados indican que las muestras eran aptas para la posterior síntesis de cDNA (Tabla 5).

Tabla 5. Determinación de la concentración y calidad del RNA mediante el NanoDrop ^a.

	NanoDrop		
	Concentración (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
Control	2309.78	1.94	2.25
Control	2312.45	1.92	2.24
Control	1802.83	1.98	2.31
11 nM DIG-MSK	2850.90	1.82	2.12
11 nM DIG-MSK	1132.03	1.99	2.36
11 nM DIG-MSK	2030.55	1.98	2.29
23 nM MSK	1406.85	1.99	2.32
23 nM MSK	1663.92	1.97	2.29
23 nM MSK	2134.27	1.95	2.27

^a La medición de la concentración se realizó para cada una de las tres réplicas biológicas obtenidas para cada condición experimental.

El *array* incluyó 89 genes involucrados en el control y regulación del ciclo celular (http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-020Z.html) además de un gen *housekeeping* (*GAPDH*), usado para la posterior normalización de los datos. De forma paralela, se analizaron diferentes controles incluidos en el panel del *array*, para prevenir la aparición de falsos positivos y negativos. Los controles permitieron validar la eficiencia ensayo y descartar posibles contaminaciones.

1. Control de contaminación con DNA genómico (GDC): detectando una secuencia específica del DNA genómico dentro de una región intergénica.
2. Control de Transcripción Reversa (RTC): detectando una secuencia control de RNA artificial externo en la primera hebra de cDNA sintetizado.
3. Control Positivo de la PCR (PPC): detectando un molde de DNA externo de número de copias conocidas para producir un valor Ct definido en condiciones de PCR adecuadas.

Los genes analizados pertenecen a diferentes categorías funcionales:

- **Fase G1 y transición G1/S:** *ANAPC2, CCND1, CCNE1, CDC34, CDK4, CDK6, CDKN1B, CDKN3, CUL1, CUL2, CUL3, SKP2.*
- **Fase S y replicación del DNA:** *ABL1, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, PCNA, RPA3, SUMO1, UBA1.*
- **Fase G2 y transición G2/M:** *ANAPC2, ANAPC4, DIRAS3, BCCIP, BIRC5, CCNB1, CCNG1, CCNH, CCNT1, CCNT2, CDK5R1, CDK5RAP1, CDK7, CDKN3, CKS1B, CKS2, DDX11, DNM2, GTF2H1, GTSE1, HERC5, KPNA2, MNAT1, SERTAD1.*
- **Fase M:** *CCNB2, CCNF, CDK1, CDC16, CDC20, MRE11A, RAD51.*
- **Puntos de control y parada del ciclo celular:** *ATM, ATR, BRCA1, BRCA2, CCNG2, CDC2, CDC34, CDK2, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CDKN3, CHEK1, CHEK2, CUL1, CUL2, CUL3, GADD45A, HUS1, KNTC1, MAD2L1, MAD2L2, NBN, RAD1, RAD17, RAD9A, RB1, RBBP8, TP53.*
- **Regulación del ciclo celular:** *ABL1, ANAPC2, ANAPC4, DIRAS3, ATM, ATR, BCCIP, BCL2, BRCA2, CCNB1, CCNB2, CCNC, CCND1, CCND2, CCNE1, CCNF, CCNH, CCNT1, CCNT2, CDC16, CDC2, CDC20, CDK2, CDK4, CDK5R1, CDK6, CDK7, CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CKS1B, DDX11, E2F4, GADD45A, KNTC1, MKI67, PCNA, RAD9A, RB1, SKP2, TFDPI, TFDP2.*
- **Regulación negativa del ciclo celular:** *ATM, BAX, BRCA1, CDKN2B, RBL1, RBL2, TP53.*

Para el análisis del perfil transcripcional de los genes en las células HCT116, se consideraron aumentos o disminuciones de la expresión génica (*fold change*) superiores a 2 veces respecto al control y una $p < 0.05$. Como resultado, de los 89 genes analizados, 28 (correspondientes a un 31.5%) mostraron diferencias estadísticamente significativas en su expresión entre las células tratadas con MSK y las células control, mientras 54 genes (60.7%) mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las células tratadas con DIG-MSK y las células control.

Los gráficos de dispersión de dos variables (Fig. 12), muestran los niveles de expresión de los genes analizados por qRT-PCR a las 24 horas de tratamiento con las dosis IC_{75} de cada molécula, comparándolos con los perfiles de transcripción génica de células no tratadas, controles. Como puede observarse, la dispersión de los genes afectados por el tratamiento con

DIG-MSK es mayor a la observada para MSK; dicha dispersión se produce mayoritariamente hacia una regulación a la baja, lo que indicaría que el tratamiento con DIG-MSK podría estar causando la represión de genes que tendrían un efecto directo en el desarrollo y control del ciclo celular. En la Tabla 6 se indica el número de veces de cambio (*fold change*) de los niveles de expresión del conjunto completo de genes analizados por qRT-PCR, comparados con el control normalizado por la *GAPDH*, junto con la significancia estadística de dichos cambios, así como el valor Ct promedio normalizado.

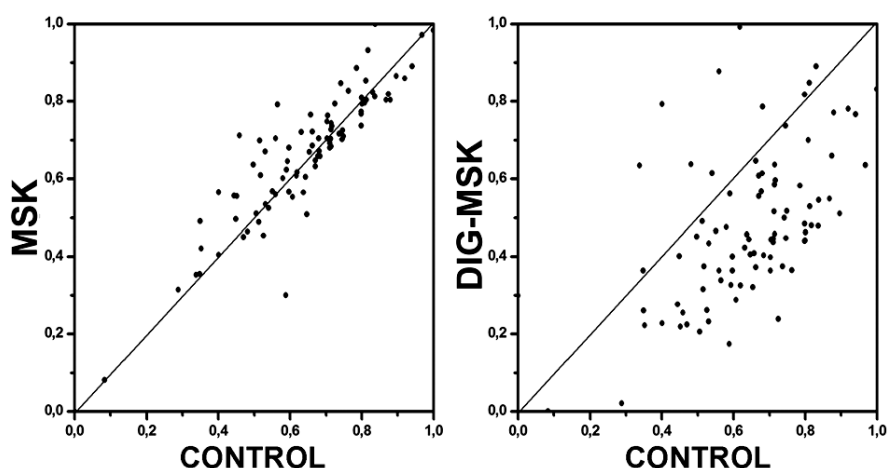


Figura 12. Distribución de los perfiles de expresión génica inducidos por el tratamiento con MSK o DIG-MSK en células HCT116. Los gráficos de dispersión muestran la comparación de los perfiles de expresión de células no tratadas (control) *versus* los perfiles de transcripción inducidos por los tratamientos a las 24 horas con 23 nM MSK u 11 nM DIG-MSK. Se realizó una corrección de los valores promedio de las Ct obtenidas a partir de los resultados de los experimentos de qRT-PCR realizados por triplicado, los cuales son presentados en escalas de 0-1 para facilitar la comparación.

Tabla 6. Niveles relativos de expresión de 89 genes analizados mediante qRT-PCR en células HCT116 de carcinoma de colon humano, tratadas con concentraciones equitóxicas de MSK (23 nM) y DIG-MSK (11 nM) ^(a).

GEN	GenBank ID	Fold change		t-Test p-value		Ct promedio normalizado		
		MSK	DIG-MSK	MSK	DIG-MSK	CONTROL	MSK	DIG-MSK
<i>ABL1</i>	NM_005157	-1.4	-1.8	1.4E-01	6.7E-03	24.17	24.44	25.92
<i>ANAPC2</i>	NM_013366	-1.2	-4.2	2.4E-01	1.2E-04	23.72	23.78	26.49
<i>ANAPC4</i>	NM_013367	-1.3	3.8	4.2E-02	3.4E-03	24.68	24.81	23.78
<i>DIRAS3</i>	NM_004675	1.0	-6.9	8.1E-01	6.8E-03	26.64	26.27	31.36
<i>ATM</i>	NM_000051	-1.3	-32.7	2.5E-01	1.9E-03	25.15	25.53	32.50
<i>ATR</i>	NM_001184	-1.5	1.2	4.4E-02	1.7E-01	25.50	25.92	26.49
<i>BAX</i>	NM_004324	-1.1	-8.0	5.5E-01	1.1E-03	21.53	21.78	25.34
<i>BCCIP</i>	NM_016567	-1.1	2.1	1.7E-01	7.4E-03	21.12	21.36	20.78
<i>BCL2</i>	NM_000633	-1.3	-853.2	3.5E-01	3.7E-03	19.92	20.27	31.91
<i>BIRC5</i>	NM_001168	-1.1	-62.0	9.6E-01	1.3E-03	21.07	20.70	28.04
<i>BRCA1</i>	NM_007294	-7.9	1.2	6.0E-06	1.1E-01	26.02	28.50	26.50
<i>BRCA2</i>	NM_000059	-1.8	1.3	7.3E-02	3.8E-01	27.18	28.48	27.79

GEN	GenBank ID	Fold change		t-Test p-value		Ct promedio normalizado		
		MSK	DIG-MSK	MSK	DIG-MSK	CONTROL	MSK	DIG-MSK
<i>CCNB1</i>	NM_031966	-14.7	1.3	1.1E-05	6.3E-02	21.00	24.82	21.43
<i>CCNB2</i>	NM_004701	-12.2	1.3	0.0E+00	1.1E-02	22.43	25.95	22.83
<i>CCNC</i>	NM_005190	-1.4	2.4	1.3E-02	6.7E-03	23.01	23.56	22.81
<i>CCND1</i>	NM_053056	1.5	2.3	1.2E-03	4.9E-02	21.84	21.33	20.65
<i>CCND2</i>	NM_001759	-1.4	-66.0	1.3E-01	1.6E-03	23.64	24.61	33.16
<i>CCNE1</i>	NM_001238	-1.6	-4.2	1.7E-01	3.6E-03	21.98	22.31	24.79
<i>CCNF</i>	NM_001761	-1.9	-9.3	4.7E-02	4.9E-04	22.59	23.10	26.18
<i>CCNG1</i>	NM_004060	1.2	3.4	8.9E-02	2.7E-04	22.85	22.66	21.92
<i>CCNG2</i>	NM_004354	-1.0	-7.9	9.7E-01	7.6E-03	23.39	23.23	27.39
<i>CCNH</i>	NM_001239	-1.2	1.7	9.2E-02	6.1E-03	23.85	24.17	24.13
<i>CCNT1</i>	NM_001240	-1.0	-18.9	9.8E-01	2.6E-03	24.46	24.29	28.57
<i>CCNT2</i>	NM_001241	-1.8	-13.6	5.1E-02	6.0E-03	23.28	24.61	27.74
<i>CDC16</i>	NM_003903	-1.3	-7.6	5.9E-01	1.8E-04	19.49	19.24	23.37
<i>CDC2</i>	NM_001786	-2.3	1.9	5.6E-03	2.7E-03	22.58	23.81	22.49
<i>CDC20</i>	NM_001255	-3.8	-1.1	2.2E-04	2.0E-01	20.82	22.36	21.34
<i>CDC34</i>	NM_004359	-1.4	-7.0	1.4E-01	7.1E-04	25.40	25.68	29.16
<i>CDK2</i>	NM_001798	-3.3	-1.9	5.4E-02	1.2E-01	21.19	23.09	23.44
<i>CDK4</i>	NM_000075	1.0	-79.5	1.0E+00	4.0E-03	14.72	14.90	22.08
<i>CDK5R1</i>	NM_003885	-1.3	-1386.0	6.1E-01	1.5E-03	22.82	22.70	36.46
<i>CDK5RAP1</i>	NM_016408	-1.3	1.3	1.5E-01	9.6E-02	24.11	24.46	24.72
<i>CDK6</i>	NM_001259	-1.4	-3.4	9.1E-02	8.5E-04	21.86	22.14	24.11
<i>CDK7</i>	NM_001799	-1.5	3.2	6.9E-04	1.4E-03	24.16	24.84	23.46
<i>CDK8</i>	NM_001260	-1.5	-6.1	1.2E-01	9.9E-03	27.68	28.43	31.07
<i>CDKN1A</i>	NM_000389	11.3	11.2	0.0E+00	3.2E-05	22.68	19.25	19.72
<i>CDKN1B</i>	NM_004064	-1.9	-7.9	6.6E-03	9.4E-04	23.72	24.77	27.10
<i>CDKN2A</i>	NM_000077	-1.3	2.6	2.8E-02	2.0E-02	25.83	26.22	25.95
<i>CDKN2B</i>	NM_004936	-1.4	-215.8	4.4E-01	2.4E-04	19.32	19.21	28.01
<i>CDKN3</i>	NM_005192	-2.6	2.0	1.1E-02	2.9E-03	23.49	24.48	23.54
<i>CHEK1</i>	NM_001274	-2.7	1.2	3.4E-03	1.1E-01	24.07	25.29	24.71
<i>CHEK2</i>	NM_007194	-1.8	-4.5	4.2E-02	9.5E-04	24.25	24.74	27.00
<i>CKS1B</i>	NM_001826	-3.5	1.9	3.0E-06	6.5E-02	20.98	22.63	20.86
<i>CKS2</i>	NM_001827	-4.7	-2.2	0.0E+00	8.8E-03	19.67	21.89	21.61
<i>CUL1</i>	NM_003592	-1.7	3.4	1.5E-03	7.3E-04	23.58	24.16	22.62
<i>CUL2</i>	NM_003591	-2.3	2.1	2.7E-02	4.1E-03	23.82	25.40	23.90
<i>CUL3</i>	NM_003590	-1.1	-4.8	6.2E-01	8.8E-03	26.91	27.30	31.04
<i>DDX11</i>	NM_004399	-2.4	-40.6	1.4E-03	1.4E-05	25.56	26.56	32.11
<i>DNM2</i>	NM_004945	-1.4	-542.4	5.5E-01	1.1E-04	22.23	21.96	30.98
<i>E2F4</i>	NM_001950	-1.3	1.7	1.2E-01	1.8E-03	24.74	24.84	24.71
<i>GADD45A</i>	NM_001924	1.1	1.5	6.1E-01	6.7E-02	26.10	25.87	26.41
<i>GTF2H1</i>	NM_005316	-1.1	-1.3	8.3E-01	1.8E-01	22.62	22.56	24.17
<i>GTSE1</i>	NM_016426	-4.2	-1.1	2.3E-04	2.9E-01	24.60	26.72	26.04
<i>HERC5</i>	NM_016323	-1.2	3.0	1.9E-01	7.9E-03	25.25	25.59	25.06
<i>HUS1</i>	NM_004507	-1.2	-27.5	8.2E-01	2.1E-03	21.80	21.57	27.39
<i>KNTC1</i>	NM_014708	-1.1	-1.3	7.7E-01	2.0E-01	24.42	24.53	25.99
<i>KPNA2</i>	NM_002266	-5.2	3.3	7.0E-06	4.7E-04	21.96	24.16	20.52
<i>MAD2L1</i>	NM_002358	-7.8	1.1	9.0E-06	3.8E-01	21.74	24.55	22.40
<i>MAD2L2</i>	NM_006341	-1.7	-3.6	4.8E-04	1.2E-04	22.56	23.38	25.02
<i>MCM2</i>	NM_004526	-4.9	2.2	7.0E-05	3.0E-02	25.67	27.55	24.92

GEN	GenBank ID	Fold change		t-Test p-value		Ct promedio normalizado		
		MSK	DIG-MSK	MSK	DIG-MSK	CONTROL	MSK	DIG-MSK
<i>MCM3</i>	NM_002388	-6.0	1.1	0.0E+00	4.6E-01	20.33	22.85	20.97
<i>MCM4</i>	NM_005914	-3.4	-1.2	1.8E-03	3.5E-01	23.15	24.57	23.89
<i>MCM5</i>	NM_006739	-5.1	-5.7	1.9E-05	5.0E-06	21.56	23.51	24.46
<i>MKI67</i>	NM_002417	-5.6	-1.1	1.6E-04	3.6E-01	22.25	24.67	22.92
<i>MNAT1</i>	NM_002431	-1.0	-1.4	8.9E-01	2.7E-02	23.26	22.92	24.72
<i>MRE11A</i>	NM_005590	-1.5	-56.2	8.4E-02	1.6E-03	25.57	26.20	32.54
<i>NBN</i>	NM_002485	-1.3	3.1	3.4E-01	6.6E-03	26.44	26.66	25.60
<i>PCNA</i>	NM_182649	-3.0	17.5	3.4E-04	3.9E-05	24.50	25.70	20.85
<i>RAD1</i>	NM_002853	-1.2	-4.6	4.6E-01	4.3E-04	23.75	23.68	27.48
<i>RAD17</i>	NM_002873	-1.1	1.4	5.4E-01	1.1E-01	24.04	24.19	24.94
<i>RAD51</i>	NM_002875	1.2	-8.7	5.3E-01	1.2E-02	26.02	25.75	31.06
<i>RAD9A</i>	NM_004584	-1.7	-4.1	1.0E-01	5.8E-03	24.04	24.61	27.11
<i>RBI</i>	NM_000321	-1.7	3.0	2.2E-03	4.3E-02	25.41	26.11	24.06
<i>RBBP8</i>	NM_002894	-3.2	1.2	1.6E-04	2.0E-01	22.77	24.30	23.58
<i>RBL1</i>	NM_002895	1.0	-2.4	8.5E-01	3.6E-02	26.11	25.79	28.07
<i>RBL2</i>	NM_005611	1.1	1.7	6.9E-01	2.6E-02	25.02	24.83	25.61
<i>RPA3</i>	NM_002947	-4.2	1.2	2.8E-05	4.1E-02	23.58	25.52	24.22
<i>SERTADI</i>	NM_013376	2.6	1.2	2.0E-06	8.4E-02	23.45	22.12	24.15
<i>SKP2</i>	NM_005983	-4.2	-2.1	1.1E-04	6.4E-03	25.24	26.97	26.82
<i>SUMO1</i>	NM_003352	-1.1	1.1	6.0E-01	3.6E-01	24.26	24.16	24.66
<i>TFDP1</i>	NM_007111	-2.0	-7.5	1.6E-02	1.7E-03	24.22	24.92	26.88
<i>TFDP2</i>	NM_006286	1.4	-1.7	1.6E-01	3.6E-03	23.22	22.53	24.94
<i>TP53</i>	NM_000546	-1.5	2.4	9.6E-02	5.6E-02	25.13	25.94	24.49
<i>UBA1</i>	NM_003334	-2.0	-4.8	1.9E-01	8.2E-02	20.03	21.64	23.42
<i>B2M</i>	NM_004048	-1.4	3.6	5.2E-04	7.1E-04	21.63	22.20	20.35
<i>HPRT1</i>	NM_000194	-2.9	5.4	2.3E-05	7.0E-04	24.95	26.50	23.48
<i>RPL13A</i>	NM_012423	-2.3	-1.3	0.0E+00	7.3E-03	19.70	20.93	20.69
<i>GAPDH</i>	NM_002046	1.0	1.0	0.0E+00	0.0E+00	16.22	16.22	16.22
<i>ACTB</i>	NM_001101	-1.5	4.8	5.0E-06	1.8E-03	18.85	19.47	16.43

^(a) Significancia estadística de los cambios en la expresión génica entre las diferentes condiciones experimentales para cada gen, determinada por mediante una prueba *t-Student* para datos independientes. Los valores Ct promedio normalizados se obtuvieron a partir de triplicados experimentales. El gen *housekeeping GAPDH* se usó para la normalización de los datos.

Del conjunto de genes cuyo perfil génico resultó alterado tras la exposición a los antitumorales, un total de 35 genes bajaron su nivel de expresión en presencia de 11 nM DIG-MSK, mientras que con el tratamiento con 23 nM MSK, 26 genes redujeron su expresión (Tabla 7). Se observó que se reprimió en forma coincidente la expresión de cinco genes en el tratamiento con MSK o con DIG-MSK (Tabla 7).

Tabla 7. Genes cuya expresión disminuyó significativamente ($p < 0.05$), tras el tratamiento de las células HCT116 con MSK o DIG-MSK. En la tercera columna se indican los genes que disminuyeron su expresión tanto con MSK como con DIG-MSK.

DIG-MSK		MSK		MSK /DIG-MSK
<i>RBL1</i>	<i>BAX</i>	<i>CCNB1</i>	<i>CDC20</i>	<i>CKS2</i>
<i>CDK6</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>CCNB2</i>	<i>CKS1B</i>	<i>DDX11</i>
<i>MAD2L2</i>	<i>CCNF</i>	<i>BRCA1</i>	<i>MCM4</i>	<i>MCM5</i>
<i>CUL3</i>	<i>CCNT2</i>	<i>MAD2L1</i>	<i>RBBP8</i>	<i>SKP2</i>
<i>RAD9A</i>	<i>CCNT1</i>	<i>MCM3</i>	<i>CHEK1</i>	<i>TFDPI</i>
<i>RAD1</i>	<i>ATM</i>	<i>MKI67</i>	<i>CDKN3</i>	
<i>CCNE1</i>	<i>HUS1</i>	<i>GTSE1</i>	<i>RPL13A</i>	
<i>ANAPC2</i>	<i>CCND2</i>	<i>RPA3</i>	<i>CDC2</i>	
<i>CHEK2</i>	<i>MRE11A</i>	<i>CUL2</i>	<i>PCNA</i>	
<i>DIRAS3</i>	<i>BIRC5</i>	<i>KPNA2</i>	<i>HPRT1</i>	
<i>CDK8</i>	<i>CDK4</i>	<i>MCM2</i>		
<i>RAD51</i>	<i>CDKN2B</i>			
<i>CDC34</i>	<i>DNM2</i>			
<i>CDC16</i>	<i>BCL2</i>			
<i>CCNG2</i>	<i>CDK5R1</i>			

Por otro lado, en presencia de DIG-MSK un total de 19 genes aumentaron significativamente su nivel de expresión con respecto al control, mientras que en células tratadas con MSK, solo dos genes (*CDKN1A* y *SERTAD1*) incrementaron significativamente su expresión. Ambas Mitramicinas indujeron la activación de la transcripción del gen *CDKN1A* ($p21^{WAF1}$) (Tabla 8).

Tabla 8. Genes con expresión incrementada significativamente ($p < 0.05$), tras el tratamiento de células HCT116 con MSK o DIG-MSK. En la tercera columna se indica el gen que aumentó su nivel de expresión tanto con MSK como con DIG-MSK.

DIG-MSK		MSK	MSK /DIG-MSK
<i>ANAPC4</i>	<i>HERC5</i>	<i>SERTAD1</i>	<i>CDKN1A</i>
<i>BCCIP</i>	<i>KPNA2</i>		
<i>CCNC</i>	<i>MCM2</i>		
<i>CCND1</i>	<i>NBN</i>		
<i>CCNG1</i>	<i>PCNA</i>		
<i>CDK7</i>	<i>RB1</i>		
<i>CDKN2A</i>	<i>B2M</i>		
<i>CUL1</i>	<i>HPRT1</i>		
<i>CUL2</i>	<i>ACTB</i>		

Adicionalmente, cinco genes mostraron un comportamiento diferente con uno u otro tratamiento, con transcripción reprimida en presencia de MSK pero aumentada en presencia de DIG-MSK; presentando diferencias estadísticamente significativas en los cambios de los niveles de expresión (*CUL2*, *KPNA2*, *MCM2*, *PCNA* y *HPRT1*) (Tabla 6). En la Figura 13 se presenta mediante Diagramas de Venn, un resumen del número de genes que reprimieron o activaron sus niveles de expresión tras la exposición a los fármacos, así como el número de genes comunes que variaron sus perfiles de expresión con cada tratamiento.

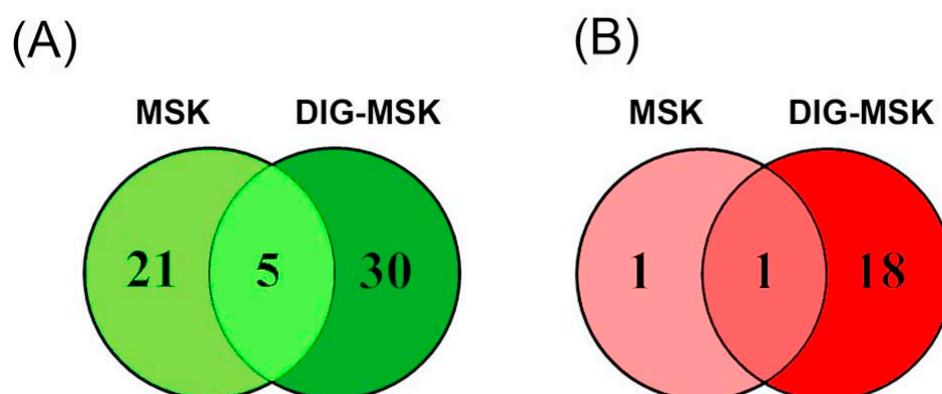


Figura 13. Diagramas de Venn usados para representar el número de genes cuya expresión cambió de manera diferencial tras el tratamiento de células HCT116 con 23 nM MSK u 11nM DIG-MSK. **(A)** Número de genes con nivel de expresión reprimida por MSK o DIG-MSK. **(B)** Número de genes cuya expresión aumentó con MSK o DIG-MSK. Los números dentro de las intersecciones corresponden a genes influenciados por ambos tratamientos (≥ 2.0 -fold change; $p < 0.05$).

4.1.6 El efecto inhibitorio de DIG-MSK afecta a genes incluidos en diferentes categorías funcionales

Se realizó una comparación dentro de las categorías (GO) de “procesos biológicos y función molecular”, de los 89 genes incluidos en el análisis por qRT-PCR con los inhibidos tras el tratamiento con uno u otro fármaco, para identificar las relaciones funcionales de dichos genes. En general, este análisis confirmó la disminución de la transcripción de genes involucrados en apoptosis, fase de transición G1/S y G2/M, segregación cromosómica y regulación de la reparación del DNA; así como de genes que codifican para factores de transcripción, proteínas que se unen al DNA y proteínas con actividad quinasa (Tabla 9).

Tabla 9. Clasificación funcional (GO) de los genes que disminuyeron su nivel de expresión tras el tratamiento con concentraciones equitóxicas de MSK o DIG-MSK^a ($p < 0.05$).

Principales funciones génicas	GOID	MSK	DIG-MSK	MSK y DIG-MSK
Apoptosis e inducción de apoptosis	0006915 0006917	<i>CUL2</i>	<i>BCL2; BAX; CDC34</i>	<i>TFDP1</i>
Mitosis y transición mitotic G2/M del ciclo celular ^b	0007067 0000086	<i>CDC2; CCNB1</i> (<i>cyclin B1</i>); <i>CCNB2</i> (<i>cyclin</i> <i>B2</i>); <i>MAD2L1</i> , <i>CUL2</i> ; <i>CDKN3; CHEK1</i>	<i>CCNE1</i> (<i>cyclin E1</i>); <i>CCNF</i> (<i>cyclin F</i>); <i>CCND2</i> (<i>cyclin</i> <i>D2</i>); <i>CDC16; CDC34</i> ; <i>MAD2L2; CCNG2</i> ; <i>CDK4; CCNT1; CCNT2</i> ; <i>CDK5R1; CDKN1B</i> ; <i>CDKN2B; DNM2</i>	<i>DDX11</i>
Segregación cromosómica	0007059	<i>MAD2L1</i>	<i>CDC34; MAD2L2</i>	<i>DDX11</i>
Factor de Transcripción	0008134	<i>RBBP8; BRCA1</i>	<i>RBL1; CCNT1; CCNT2</i>	<i>TFDP1</i>
Unión al DNA	0003677	<i>RBBP8; BRCA1</i>	<i>RBL1; CCNT1; CCNT2</i>	<i>TFDP1</i> ; <i>SKP2</i>
Unión a ácidos nucléicos	0003676	<i>CDC2; MCM3</i> ; <i>MCM4; RPL13A</i> ; <i>CDC20; RBBP8</i> ; <i>BRCA1; HPRT1</i> ; <i>PCNA</i>	<i>RBL1; CCNT1; RAD1</i> ; <i>CCNT2; MRE11A</i>	<i>TFDP1</i> ; <i>MCM5</i> ; <i>DDX11</i> ; <i>SKP2</i>
Actividad quinasa	0016301	<i>CCNB1</i> (<i>cyclin</i> <i>B1</i>); <i>CCNB2</i> (<i>cyclin B2</i>); <i>CKS1B; CDC2</i> ; <i>MCM3; CHEK1</i>	<i>CDK4; CDKN1B</i> ; <i>CDKN2B; CCNE1</i> (<i>cyclin</i> <i>E1</i>); <i>CCNF</i> (<i>cyclin F</i>); <i>CCND2</i> (<i>cyclin D2</i>); <i>CCNT1; CCNT2</i> ; <i>CDK5R1; RAD9A</i> ; <i>CCNG2; CDKN2B</i>	<i>CKS2</i>

Principales funciones génicas	GOID	MSK	DIG-MSK	MSK y DIG-MSK
Transición G1/S del ciclo celular ^b	0000082	<i>CCNE1; CCNT1;</i> <i>CDC34;</i> <i>CDKN1B;</i> <i>CDKN3; CHEK1;</i> <i>CUL2</i>	<i>CCNE1 (cyclin</i> <i>E1); CCNT1; CCNT2;</i> <i>CDC34; CDK4; CDK5R;</i> <i>CDKN1B ; CDKN2B</i>	<i>CKS2</i>
Regulación de la reparación del DNA ^b	0006282	<i>BRCA1</i>	<i>MRE11A; RAD;1 RAD9A</i>	<i>DDX11</i>

^a Genes analizados mediante el programa PANTHER en las categorías: “procesos biológicos y función molecular” y, agrupados en categorías *Gene Ontology* (GO).

^b Categorías adicionales (extra) obtenidas con el programa GATHER.

En paralelo, se realizó una clasificación funcional para los genes que aumentaron significativamente su expresión después de los tratamientos. Sin embargo, no se observaron resultados estadísticamente significativos en ninguna de las categorías analizadas.

4.1.7 Identificación de factores de transcripción asociados a genes reprimidos por MSK y DIG-MSK

Dado que las Mitramicinas tienen como característica ser inhibidores *in vitro* de la transcripción a través de la competición directa con proteínas que se unen al DNA (Gniazdowski et al., 2005; Portugal et al., 2011), exploramos si entre los factores de transcripción que se unen a regiones ricas en C/G hubo un “enriquecimiento” en los sitios de unión potencial en los promotores de los genes que redujeron su expresión, lo cual podría explicar la significativa inhibición de la expresión génica observada tras el tratamiento con MSK y DIG-MSK. En otras palabras, la posibilidad de que las Mitramicinas pudieran inhibir la unión de otros factores proteicos.

Para determinar si una secuencia de unión para determinado factor de transcripción en particular, estuvo significativamente sobrerrepresentada en los promotores de los genes reprimidos, la herramienta TELiS (Cole et al., 2005) realiza dos tipos de análisis estadísticos: un análisis de incidencia y otro de frecuencia. El análisis de incidencia resultó, en nuestro caso, más conveniente que el análisis de frecuencia, ya que es más apropiado para analizar

pequeños conjuntos de datos mediante un *test* binomial exacto ($p < 0.01$) (Cole et al., 2005). De esta manera esta herramienta determina si una secuencia consenso de unión está presente en una fracción mayoritaria de los genes diferencialmente expresados.

De 192 factores de transcripción incluidos en la base de datos de TRANSFAC que son usados por la herramienta TELiS para los análisis, seleccionamos 16 factores de transcripción que reconocen secuencias consenso ricas en C/G. La Figura 14 presenta los resultados del análisis de incidencia, indicando el número de genes reprimidos que contienen en su región promotora (-600 +1) sitios consenso de unión para una variedad de factores de transcripción. En general, entre los genes con nivel de expresión reducido, el número de genes que contienen en sus promotores sitios de unión para Sp1 es más elevado, que el número de genes que contienen cualquier otro sitio de unión potencial para los restantes factores de transcripción. Si bien, resultó evidente la sobrerrepresentación de sitios de unión para los diferentes factores de transcripción, encontramos que tras el tratamiento con DIG-MSK, el mayor número de genes inhibidos contenía sitios de unión para Sp1, al contrario de lo observado con el tratamiento con MSK.

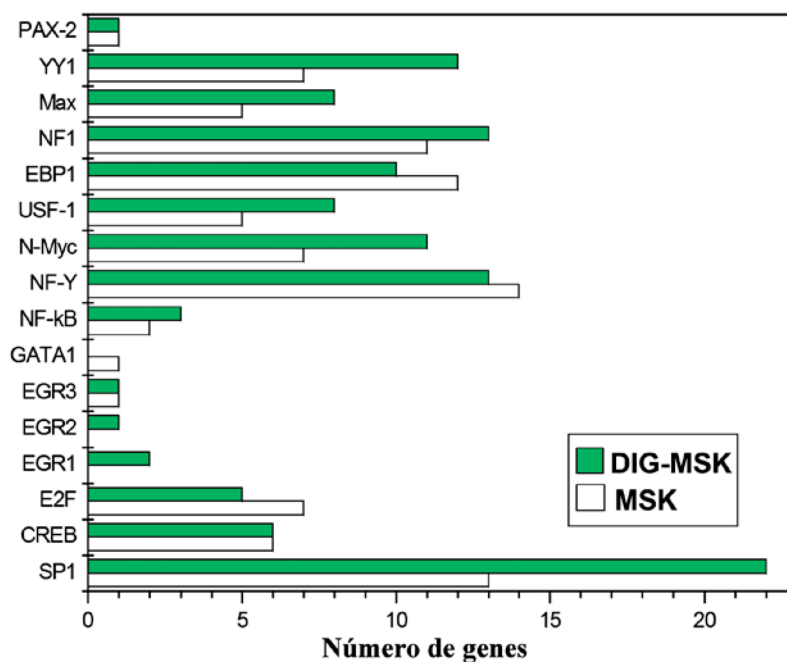


Figura 14. Número de genes cuya expresión resultó inhibida por el tratamiento con MSK o DIG-MSK y que contienen en su región promotora (-600 +1) sitios de unión potencial para los factores de transcripción indicados en el eje Y. Los histogramas indican la presencia de sitios de unión potencial para factores de transcripción ubicados en las regiones promotoras de los genes reprimidos por los análogos de la MTA en el conjunto total de genes analizados por qRT-PCR.

La Tabla 10 lista las secuencias consenso de unión para los diferentes factores de transcripción mostrados en la Figura 14. Las secuencias presentadas en dicha tabla, se generaron por el programa TELiS a partir de los promotores de todos los genes reprimidos por cada fármaco.

Tabla 10. Compilación de los factores de transcripción cuyas secuencias consenso de unión se encontraban sobrerrepresentadas en la región promotora de los genes con expresión disminuida en células HCT116, luego de ser tratadas con MSK o DIG-MSK.

Factor de transcripción	Secuencia consenso ^(a)
PAX-2	CCTCGTCACGCATGATGG(A/C)
YY1	CCGCGGCCATCTTGGCTGCT
Max	AAA(A/C)CACGTGGTTT
NF1	TCTTGGCAAGAAGCCAAA
EBP1	ACATTGC(A/G)TAATTA
USF-1	AGATCACGTGATCT
N-Myc	TCCCACGTGTC(A/C/G)
NF-Y	TAACCAATCAC
NFkB	(A/G/T)GGGGA(A/C)TTTCC(C/T)C
GATA1	AGG(A/C/G)AGATAA(C/G)CG(C/G)
EGR3	ATGCGTGGGCGT
EGR2	(A/T)TGCGTGGGCGT
EGR1	ATGCGTGGGCGT
E2F	TTT(C/G)GCGC
CREB	(C/T)(G/T)GGTGACGTCC
Sp1	GGGGCGGGGT

^(a) Secuencias consenso de unión, obtenidas a partir del análisis de los promotores de los genes reprimidos en la base de datos TELiS; análisis descrito en el texto principal.

Las Tablas 11 y 12 presentan el número de sitios de unión, resultado del análisis bioinformático realizado en la base de datos de TELiS, en los promotores para cada gen reprimido por uno u otro tratamiento. La Tabla 11 evidencia que MSK indujo la disminución de la expresión de genes que contenían como máximo 4 sitios de unión para Sp1 (*MKI67* y *HPRT1*). Además, MSK posiblemente también compitió por la unión a los sitios consenso, con otros factores diferentes a Sp1 tales como EBP1, NF1 o NF-Y (Figura 14 y Tabla 11). La Tabla 12 presenta un análisis equivalente de los efectos de DIG-MSK sobre la expresión génica. Sp1 estaría regulando la expresión de la mayoría de los genes, seguido por los factores NF1, NF-Y, YY1 y N-Myc. Dos de los genes con expresión reprimida (*CCNE1* y *CCNF*) contienen un alto número de sitios de unión para Sp1: 6 y 8 respectivamente, los cuales podrían estar siendo “desplazados” por este análogo. Por otra parte, los genes *CDK4* y *Bax*,

resultaron claramente reprimidos pese a no contener secuencias de unión para Sp1. Sin embargo, sus promotores contienen cuatro sitios de unión para los factores de transcripción N-Myc, USF-1 y Max, que podrían estar siendo “desplazados” por DIG-MSK.

Tabla 11. Número de sitios de unión potencial para una variedad de factores de transcripción encontrados por la base de datos TELiS, en los promotores los genes con nivel de expresión disminuida en células de carcinoma de colon HCT116, después del tratamiento con MSK.

	SP1	CREB	E2F	EGR1	EGR2	EGR3	GATA1	NFkB	NF-Y	N-Myc	USF-1	EBP1	NF1	Max	YY1	PAX-2
<i>CCNB1</i>	1							1		1	1	2	1	1		
<i>CCNB2</i>									3				1		1	
<i>BRCA1</i>		1							3			2	1			
<i>MAD2L1</i>													1			
<i>MCM3</i>			2						1			2				
<i>MKI67</i>	4	1														
<i>GTSE1</i>	1								1			1				
<i>RPA3</i>															3	1
<i>CDC20</i>									2							
<i>CKS1B</i>	1								4							
<i>MCM4</i>	2		1				6		1						1	
<i>RBBP8</i>	2	2								1		2	3			
<i>CHEK1</i>	2	1	1									3	2			
<i>CDKN3</i>									1							
<i>RPL13A</i>									1	1	1	1		1		
<i>CDC2</i>			1						1	1	1	3	2	1		
<i>CUL2</i>	1											3	2			
<i>KPNA2</i>									2			2				
<i>MCM2</i>									1			2				
<i>PCNA</i>		1						1		1	1		2	1	1	
<i>HPRT1</i>	4		1			1						3				
<i>CKS2</i>		1							1				1			
<i>DDX11</i>	2									1					1	
<i>MCM5</i>	2		1						3						1	
<i>SKP2</i>	1															
<i>TFDPI</i>			1							3	3		1	2	1	
Número de genes	12	6	7	0	0	1	1	2	14	7	5	12	11	5	7	1

Tabla 12. Número de sitios de unión potencial para una variedad de factores de transcripción encontrados por la base de datos TELiS, en los promotores los genes con nivel de expresión disminuida en células de carcinoma de colon HCT116, después del tratamiento con DIG-MSK.

	SP1	CREB	E2F	EGR1	EGR2	EGR3	GATA1	NFkB	NF-Y	N-Myc	USF-1	EBP1	NF1	Max	YY1	PAX-2
<i>RBL1</i>			3						1				2		1	
<i>CDK6</i>		1														
<i>MAD2L2</i>	3								1							
<i>CUL3</i>									1						1	
<i>RAD9A</i>	1	1							1	4	4			4		
<i>RAD1</i>								1		1	1	1	1	1	1	
<i>CCNE1</i>	6		1	1				1					1		1	
<i>ANAPC2</i>	2															
<i>CHEK2</i>												1				
<i>DIRAS3</i>																
<i>CDK8</i>	1															
<i>RAD51</i>	1											1				
<i>CDC34</i>	2	1								1						
<i>CDC16</i>	1		1						1	1	1		1	1		
<i>CCNG2</i>	2								2	1	1			1		
<i>BAX</i>		1								4	4			4	1	
<i>CDKN1B</i>	1								2				2			
<i>CCNF</i>	8								4						1	
<i>CCNT2</i>	3												1			
<i>CCNT1</i>				1	1	1							1		2	
<i>ATM</i>		1						1	1			1			1	
<i>HUS1</i>	2											1				
<i>CCND2</i>	1											1	1		1	
<i>MRE11A</i>	1								1				1			
<i>BIRC5</i>	1															

	SP1	CREB	E2F	EGR1	EGR2	EGR3	GATA1	NFkB	NF-Y	N-Myc	USF-1	EBP1	NF1	Max	YY1	PAX-2
<i>CDK4</i>										4	4			4		1
<i>CDKN2B</i>	1									1		2	1			
<i>DNM2</i>	1								4			1	3			
<i>BCL2</i>												1				
<i>CDK5R1</i>										2	1	2		1		
<i>CKS2</i>		1							1				1			
<i>DDX11</i>	2									1					1	
<i>MCM5</i>	2		1						3						1	
<i>SKP2</i>	1															
<i>TFDP1</i>			1							3	3		1	2	1	
Número de genes	21	6	5	2	1	1	0	3	13	11	8	10	13	8	12	1

Conforme a los resultados presentados en la Figura 14 y en las Tablas 11 y 12, los sitios potenciales para cuatro factores de transcripción, resultaron sobrerrepresentados en los promotores de los genes con nivel de expresión disminuida tras los tratamientos: Sp1, NF-Y, NF1 y YY1. Sin embargo, existieron algunas diferencias en cuanto al número de genes y a la frecuencia de aparición. Los efectos de DIG-MSK resultaron más fuertes que los de MSK tanto en el número de genes que bajaron su transcripción, como en la capacidad de competir por promotores que contienen múltiples sitios de unión para diferentes factores de transcripción que se unen a zonas promotoras ricas en C/G.

4.1.8 MSK y DIG-MSK interfieren con la interacción Sp1-DNA

La interacción entre el factor de transcripción Sp1 y sus sitios de unión potencial ha sido ampliamente caracterizada como una diana clave para varios análogos de la MTA (Ver Introducción). Debido a que entre los genes reprimidos, el mayor porcentaje de sitios de unión enriquecidos fue para Sp1, especialmente después del tratamiento con DIG-MSK (Fig. 14), buscamos una confirmación directa del efecto de DIG-MSK sobre las interacciones de Sp1 con el DNA, comparando con el efecto de MSK. Para ello, llevamos a cabo ensayos de movilidad electroforética (EMSA), incubando un extracto de proteínas nucleares con un oligonucleótido de doble cadena marcado radioactivamente, que contenía un sitio consenso de unión para Sp1.

Tanto MSK como DIG-MSK interfirieron directamente con la formación de complejos Sp1-DNA, aunque DIG-MSK resultó menos efectivo que MSK en inhibir la interacción de Sp1 con sus sitios de unión potencial (Fig. 15). La adición en exceso del oligonucleótido no marcado radioactivamente (competidor específico) permitió comprobar la especificidad de los complejos Sp1-DNA formados. Se observó una atenuación y/o eliminación de la banda correspondiente al complejo Sp1-DNA, resultante de la disminución de la cantidad de proteína disponible para reconocer la secuencia específica presente en el oligonucleótido de doble cadena marcado.

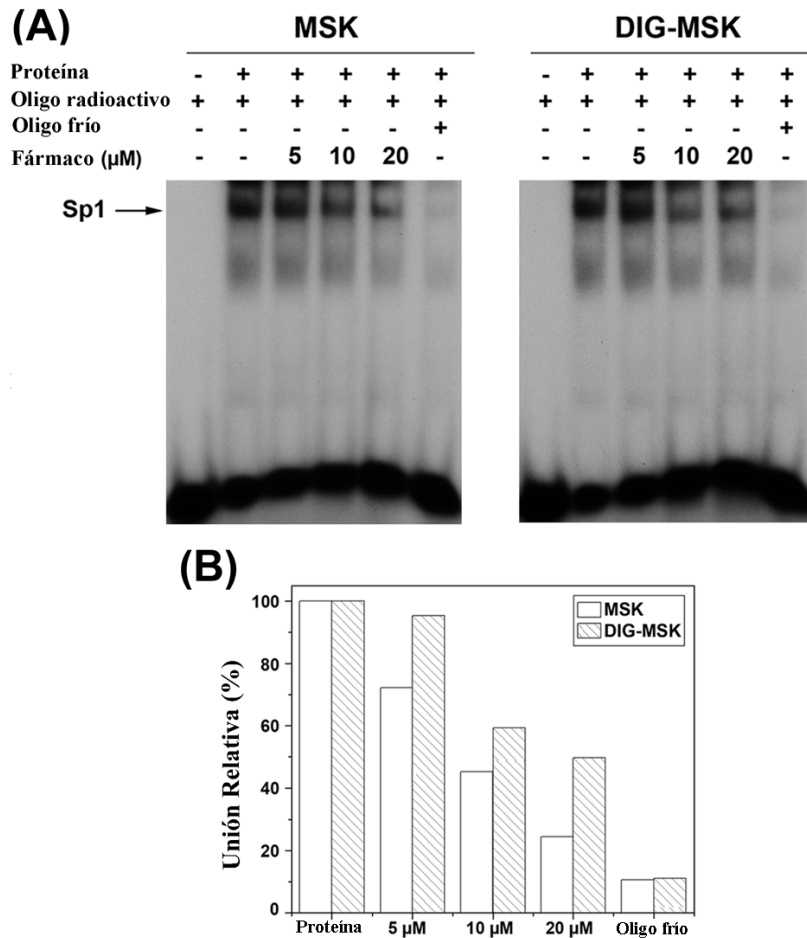


Figura 15. Efecto de MSK y DIG-MSK sobre la unión del factor de transcripción Sp1 a un oligonucleótido de doble cadena de 22 nt que contiene un sitio de unión potencial. **(A)** Ensayo de movilidad electroforética (EMSA). El oligonucleótido de doble cadena marcado radioactivamente se incubó con el extracto de proteínas nucleares y con concentraciones crecientes de MSK o DIG-MSK (0 μM , 5 μM , 10 μM y 20 μM). La flecha indica la posición del complejo Sp1-DNA, que se confirmó por adición de un exceso molar de oligonucleótido de doble cadena no marcado radioactivamente, actuando como competidor específico. **(B)** Cuantificación de la unión relativa de la proteína en ausencia/presencia de concentraciones crecientes de los fármacos. Los histogramas representan los promedios de los valores obtenidos a partir de dos experimentos diferentes con resultados similares. MSK alteró sustancialmente los complejos Sp1-DNA.

4.1.9 DIG-MSK induce cambios en los niveles de proteínas implicadas en puntos de control del ciclo celular

El análisis de los niveles de proteínas por *Western Blot* para un grupo de proteínas seleccionadas, permitió corroborar cambios observados en la transcripción de genes implicados en la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular. Se observaron cambios tiempo-dependientes en los niveles de p53, p21^{WAF1} y de la ciclina D1 (Fig. 16). Dichos cambios resultaron consistentes con los cambios en el transcriptoma y con el

hecho de que la mayoría de las células tratadas con DIG-MSK estuvieran detenidas en la fase G1 del ciclo celular hasta las 72 horas de tratamiento, con una disminución en los niveles de p53 después de 48 horas.

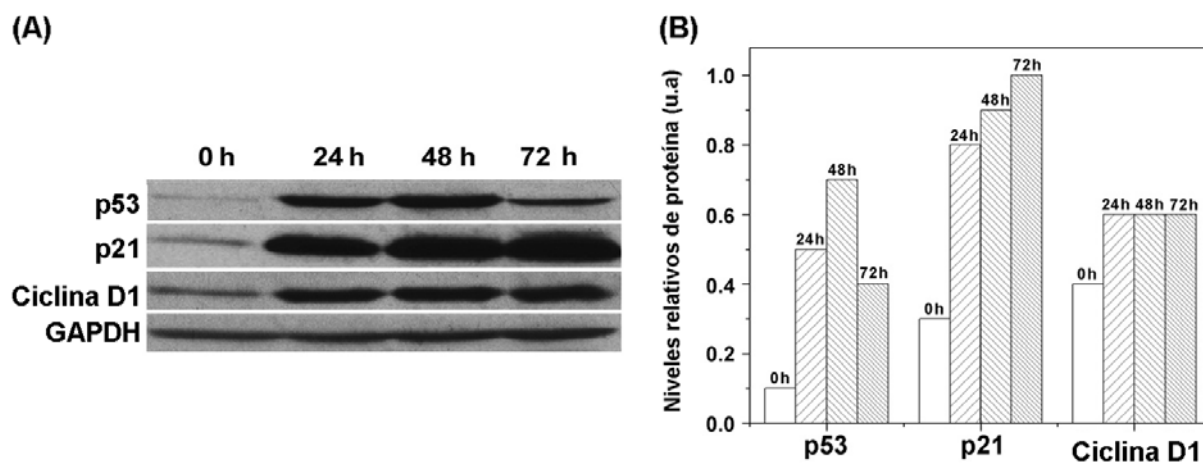


Figura 16. (A) *Western blot* de los cambios tiempo-dependientes en los niveles de algunas proteínas involucradas en los puntos de control del ciclo celular, tras el tratamiento con DIG-MSK. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado con resultados similares. (B) Cuantificación de los cambios en los niveles proteicos inducidos por DIG-MSK. Los histogramas representan el promedio de los valores obtenidos de dos experimentos independientes, como los que se muestran en (A).

Los niveles proteicos analizados tras el tratamiento con DIG-MSK fueron analizados previamente en nuestro grupo (Bataller et al., 2008). El tratamiento con la dosis IC_{75} MSK provocó un aumento inicial de las proteínas p53 y p21^{WAF1} acorde con los resultados obtenidos por qRT-PCR (Bataller et al., 2008).

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE DIG-MSK SOBRE LA TRANSCRIPCIÓN EN CÉLULAS A2780 DE CARCINOMA HUMANO DE OVARIO Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL

Partiendo del concepto de que la inducción de muerte celular por el tratamiento con fármacos antitumorales depende del mecanismo de acción de la molécula y del tipo de tumor, entre otras variables; decidimos caracterizar el efecto de DIG-MSK en un tipo celular diferente al de carcinoma de colon. La evidencia obtenida tras analizar la respuesta en células humanas HCT116, comparando el efecto de DIG-MSK con MSK, que se describe en los apartados anteriores, nos permitió concluir que si bien, DIG-MSK fue más eficaz que MSK, el mecanismo de acción puede ser es el mismo. Este hecho nos llevó a examinar más a fondo la capacidad antitranscripcional de DIG-MSK, por lo que nos planteamos analizar los perfiles de expresión de un amplio número de genes, mediante *microarrays* en células A2780 de carcinoma de ovario humano y caracterizar la respuesta de dichas células ante la exposición con en nuevo análogo.

4.2.1 DIG-MSK inhibe la proliferación de células A2780 de carcinoma de ovario humano y reduce la viabilidad celular

Transcurridas 72 horas de tratamiento continuo con concentraciones nanomolares de DIG-MSK, se evaluó su efecto antiproliferativo en células A2780 (Tabla 13), calculando las dosis IC_{50} e IC_{75} . Adicionalmente, con el objetivo de determinar en ensayos posteriores de análisis de la expresión génica, si aumenta o no el efecto del nuevo análogo al tratar las células con una mayor concentración, continuando en el rango nanomolar; calculamos la dosis IC_{85} .

Tabla 13. Dosis IC_{50} e IC_{75} para la Mitramicina DIG-MSK, en células A2780, determinadas en un ensayo de MTT a las 72 horas. Los valores son el resultado de la Media \pm SD (desviación estándar) de tres experimentos independientes.

A2780	DIG-MSK	
	IC_{50} (nM)	4.25 \pm 0.39
	IC_{75} (nM)	7.44 \pm 0.12
	IC_{85} (nM)	80.3 \pm 0.25

También, se realizó el recuento del número de células viables adheridas al frasco de cultivo, tras el tratamiento con la dosis IC₇₅, correspondiente a una concentración de ~ 8 nM o con 10 veces más esta dosis, correspondiente a la dosis IC₈₅=80 nM (Tabla 14). El tratamiento de las células con 8 nM DIG-MSK a las 24 horas, produjo alrededor de un 4% de muerte celular, hasta alcanzar cerca de un 8% a las 72 horas de tratamiento. Mientras que 80 nM DIG-MSK produjo aproximadamente un 16% de muerte celular después de 24 horas de tratamiento, y alrededor de un 90% después de 72 horas (Tabla 14).

Tabla 14. Porcentaje de mortalidad determinado mediante tinción con azul de Tripano en células A2780 tratadas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK, a diferentes tiempos. Recuento correspondiente a la Media de dos réplicas.

	24 h	48 h	72 h
Control (%)	0.3	1	2.9
8 nM (%)	3.6	4.2	8.3
80 nM (%)	16.2	49.9	89.3

4.2.2 El tratamiento con DIG-MSK induce muerte celular apoptótica en células A2780

El análisis por citometría de flujo a través de la doble tinción con Annexina-V-fluos e IP, permitió distinguir después de 72 horas de tratamiento continuo, las células que estaban muriendo por apoptosis de las que lo hacían por necrosis (Fig. 17).

De acuerdo a los resultados, el tratamiento con 80 nM DIG-MSK indujo el mayor porcentaje de muerte: apoptosis (22.4%) y apoptosis/necrosis secundaria (63.1%), aparentemente producida después de una rápida apoptosis, lo que resulta en un total de 85.5% de muerte celular.

La muerte celular dependió de la concentración de fármaco utilizada. Hubo un efecto minoritario al tratar las células A2780 con 8 nM DIG-MSK, observándose un total de 7% de muerte celular (5.4% de apoptosis más 1.6% apoptosis/necrosis secundaria), con fenotipo principalmente apoptótico.

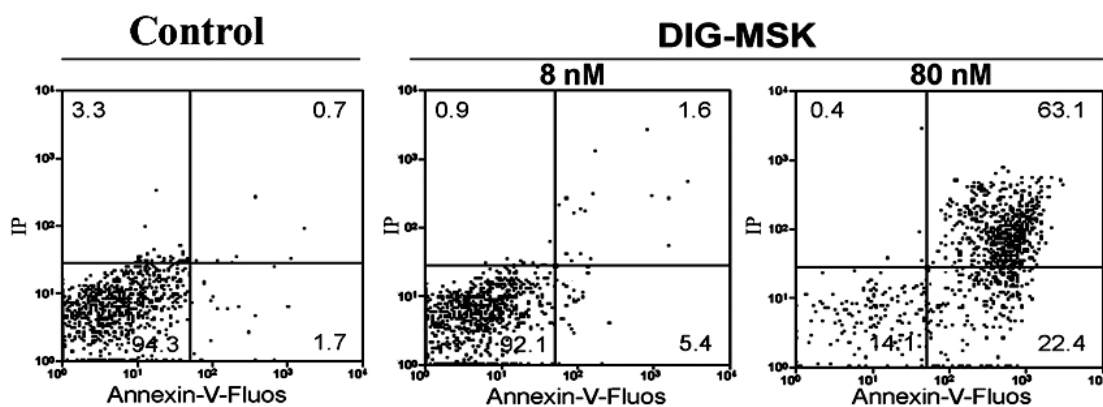


Figura 17. Análisis del mecanismo de muerte celular determinado por doble tinción con Anexina-V-Fluos e IP en células A2780 tratadas durante 72 horas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK. Los porcentajes de necrosis primaria (Anexina-V-/IP+), apoptosis primaria (Anexina-V+/IP-), necrosis/apoptosis secundaria (Anexina-V+/IP+) y el porcentaje para células viables (Anexina-V-/IP-) se indican en el interior de cada panel.

De acuerdo al ensayo del MTT, DIG-MSK fue capaz de inhibir el crecimiento y proliferación de las células A2780 a bajas dosis. Sin embargo, el efecto citotóxico de la molécula fue superior tras la exposición con la dosis IC_{85} .

4.2.3 DIG-MSK altera la progresión del ciclo celular en células A2780

El análisis por citometría de flujo mostró cambios dependientes del tiempo en la distribución del ciclo celular de las células A2780, después del tratamiento con ambas concentraciones de DIG-MSK (Fig. 18). La distribución de células sin tratar (controles (0 horas)) a lo largo del ciclo celular permaneció inalterada, mostrando un pico mayoritario de fluorescencia en la fase G1 (~ 70% de las células).

Las células tratadas con 8 nM DIG-MSK mantuvieron una distribución relativamente uniforme durante el experimento, con la mayoría de células en fase G1 (entre el 74% y el 79%). Mientras que con 80 nM DIG-MSK se observó un alto porcentaje de la población celular en fase G1 (entre el 40% y el 73%), pero se produjo también un incremento progresivo de la población sub G0, alcanzando cerca de un 41% tras 72 horas de tratamiento.

Estos resultados junto a los del análisis de mortalidad celular, sugieren que el tratamiento con la dosis IC_{75} de DIG-MSK en células A2780 de carcinoma de ovario, tiene un efecto citostático equiparable al observado con la dosis IC_{75} en células de HCT116 de

carcinoma de colon. Sin embargo, al aumentar las concentraciones del fármaco aún en el rango nanomolar, el efecto citotóxico se hizo evidente.

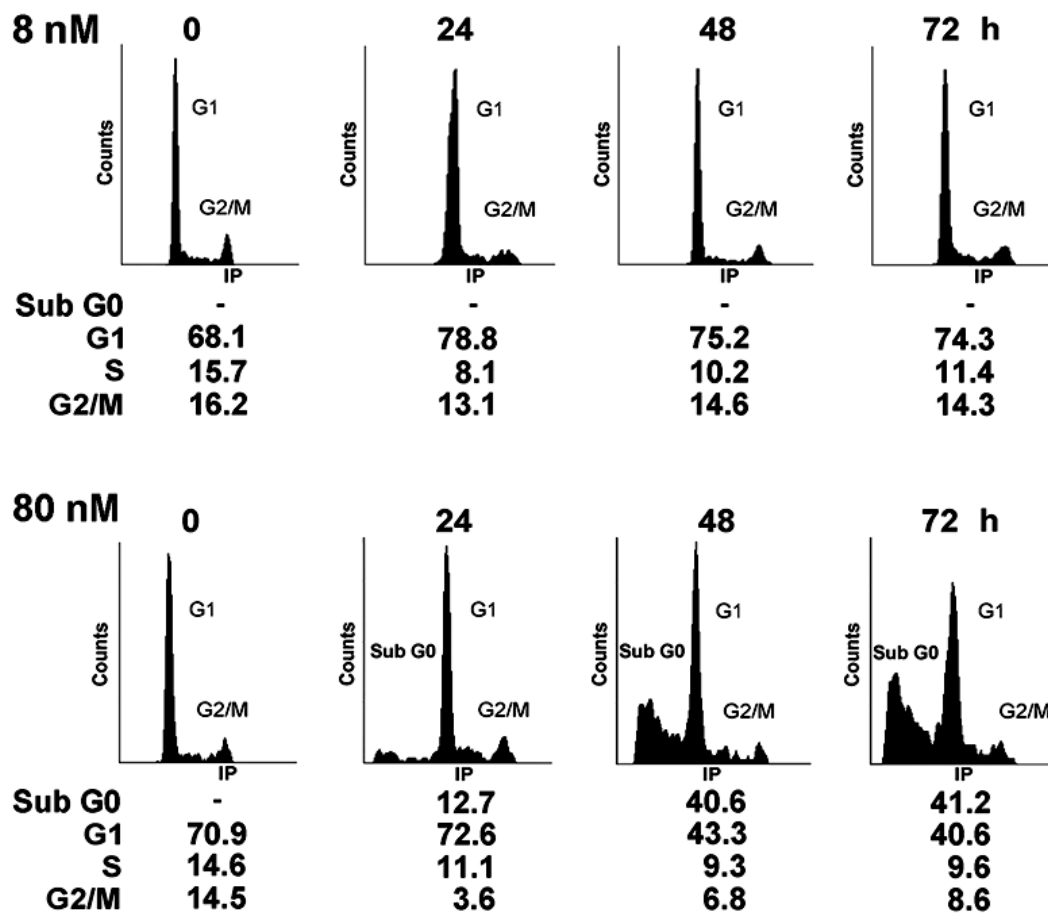


Figura 18. Análisis por citometría de flujo de los cambios en la distribución del ciclo celular de células A2780, tratadas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK.

A más a más, usando microscopía de contraste de fases, se observó la morfología celular tras uno u otro tratamiento (Fig. 19). Las células A2780 mantuvieron su morfología en presencia DIG-MSK (Fig. 19). En contraste, pasadas 24 horas de tratamiento con DIG-MSK en células HCT116, parte de la población celular incrementó tanto su tamaño como el número de núcleos (Fig. 11).

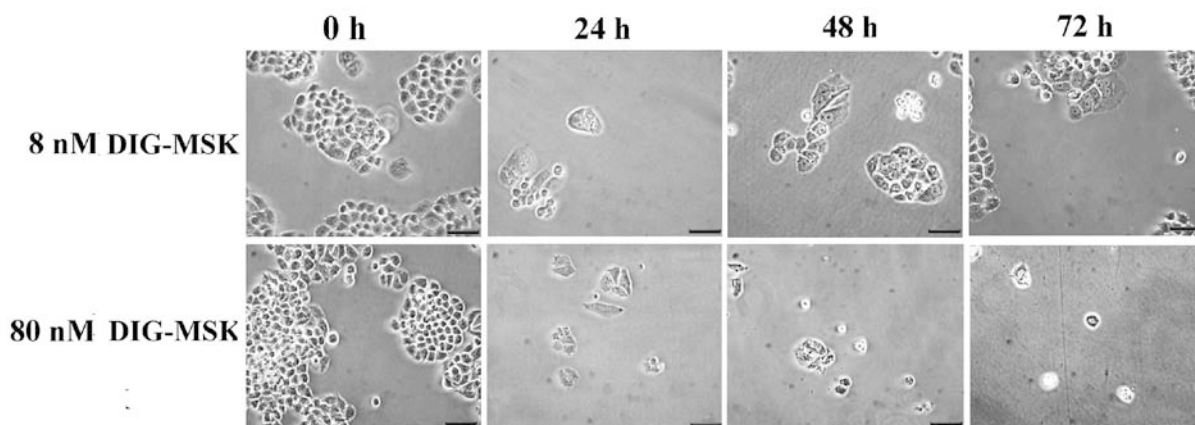


Figura 19. Morfología de las células A2780 tratadas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK, observadas por microscopía de contraste de fases a diferentes tiempos. Barra, 50 μ m.

4.2.4 Análisis del efecto de DIG-MSK sobre células A2780 mediante *microarrays*

4.2.4.1 Evaluación de la calidad del RNA obtenido en células tratadas y control

Los resultados del MTT mostraron que en concentraciones en el rango nanomolar, DIG-MSK tiene un efecto antiproliferativo en células A2780. Sin embargo, el análisis de viabilidad celular (mediante la exclusión del colorante azul de Tripano en células vivas), indicó que el porcentaje de mortalidad si bien aumentó al tratar las células con la IC_{75} DIG-MSK (8 nM) pasadas 24 horas, resultó superior al utilizar una dosis 10 veces mayor que la IC_{75} calculada. Por lo cual, decidimos analizar los efectos de ambas concentraciones subletales (8 nM y 80 nM DIG-MSK) en la expresión génica en dichas células, luego de 24 horas de tratamiento continuo.

El RNA obtenido tanto de células control como de células tratadas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK presentó pureza e integridad adecuadas. La Tabla 15 recopila los valores de calidad y concentración del RNA obtenidos en un espectrofotómetro NanoDrop y en un equipo Agilent 2100 Bioanalyzer. La relación A_{260}/A_{280} determinada mediante el NanoDrop para cada condición se encontraba entre 1.8 y 2, indicando buen grado de pureza de las preparaciones; así como la relación A_{260}/A_{230} , por encima de 2, demostró la ausencia de contaminantes. El cálculo de la concentración de RNA necesaria para la hibridación en los *microarrays*, se realizó en base a los resultados obtenidos en el Bioanalyzer.

La Figura 20 muestra los electroferogramas del análisis realizado en un equipo Bioanalyzer, que documentan los datos de calidad del RNA, junto con la concentración y relación (*ratio*) [rRNA 28S/rRNA 18S] determinados para cada una de réplicas por condición experimental. El valor RIN que determina la calidad del RNA presentó valores superiores a 7, y las *ratios* se encontraban cercanas a 2.

Tabla 15. Análisis de la concentración y calidad del RNA de células A2780 control y células tratadas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK^a.

	NanoDrop			Bioanalyzer		
	Concentración (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Concentración (ng/μL)	rRNA <i>ratio</i>	RIN
Control	94.81	2	2.33	1.438	1.3	7.3
Control	129.75	1.84	2.39	400	1.8	7.4
Control	338.15	1.83	2.36	662	1.5	7.9
8 nM	735.38	1.94	2.25	1.049	1.4	8
8 nM	115.48	1.92	2.24	288	1.3	7.8
8 nM	138.77	1.98	2.31	437	1.3	7.8
80 nM	5140.1	1.99	2.29	233	1.7	9.4
80 nM	1186.5	1.81	2.36	114	1.3	9.6
80 nM	1477	1.79	2.35	1.304	1.7	9.2

^a La medición de la concentración y el análisis de calidad se llevó a cabo en un espectrofotómetro NanoDrop y en un equipo Bioanalyzer, para cada una de las tres réplicas biológicas realizadas para cada condición experimental.

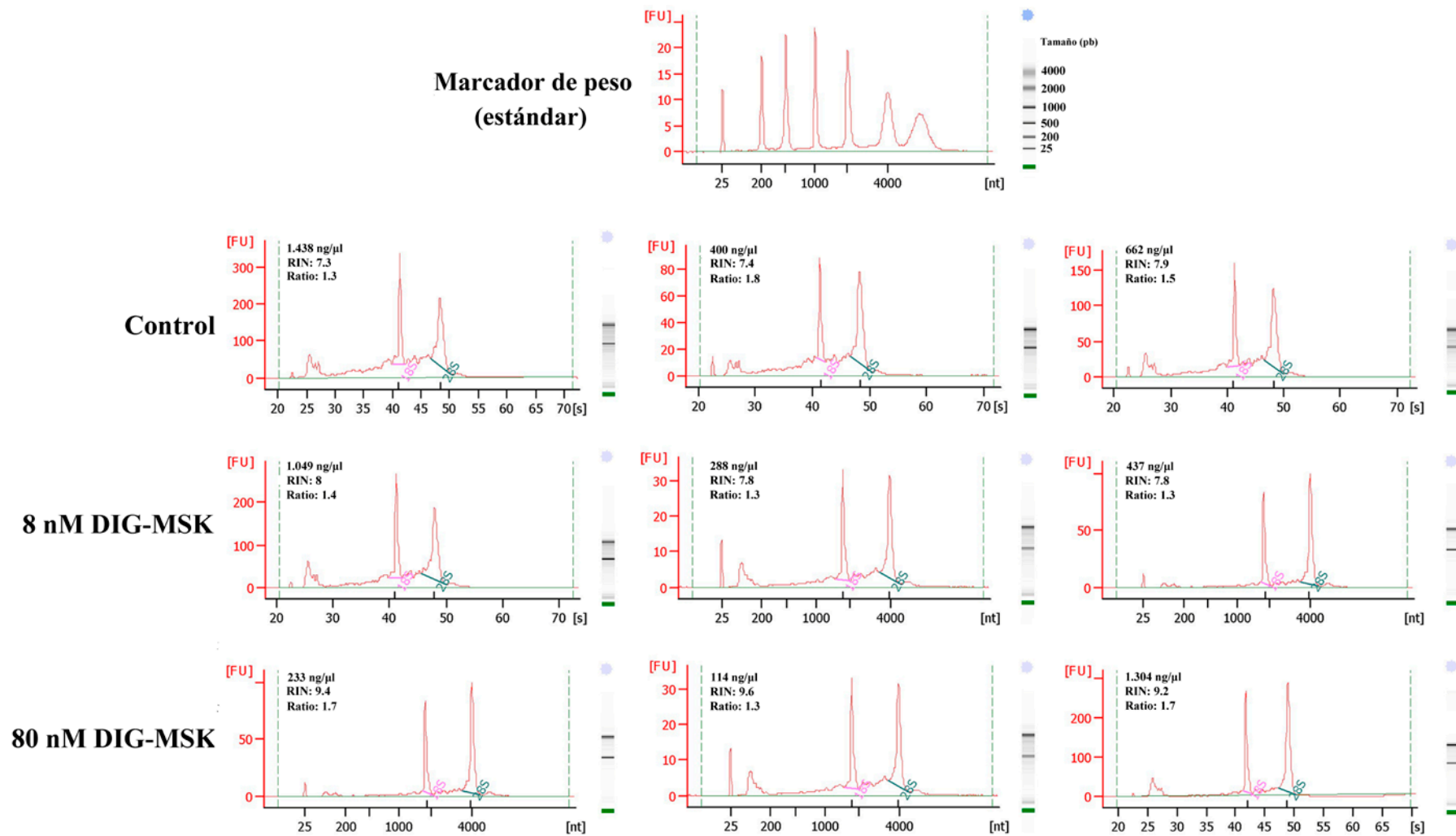


Figura 20. Análisis de la calidad y concentración del RNA, usando un Bioanalyzer (Agilent), de células A2780 control y células tratadas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK. Los electroferogramas representan la intensidad de fluorescencia *versus* el tamaño en nucleótidos (nt). Cada pico de fluorescencia en el estándar, representa el tamaño de cada fragmento de RNA conocido, indicados en cada una de las electroforesis al lado derecho. Para cada electroferograma se indican los picos correspondientes a las subunidades 18S y 28S del RNA ribosomal, la concentración del RNA en ng/mL, el valor RIN que indica integridad y calidad y, la *ratio* [rRNA 28S/rRNA 18S]. El análisis se realizó para tres réplicas biológicas de RNA por condición experimental.

4.2.4.2 Evaluación de la calidad de los microarrays y las hibridaciones

Para cada una de las réplicas de cada condición experimental, se consiguió un adecuado nivel de marcaje con Cy3 y una hibridación homogénea en los *microarrays*. El análisis mediante el método estadístico PCA de los datos normalizados respecto a las señales obtenidas en las muestras control, se señala en el panel izquierdo en las Figuras 21(A) y 21(B). Este análisis permitió establecer cómo se agrupaban las muestras entre sí, observando una clara separación entre ellas y descartando cualquier *outlier*.

En el análisis estadístico mediante el método *normexp* para la sustracción de las señales de ruido de fondo no se observó variabilidad inter-*array*, demostrando que el proceso de hibridación y lavado se realizó correctamente, resultando aceptable en todos los casos. Por otro lado, el análisis de calidad de los *microarrays* representado mediante los gráficos de densidades (panel derecho en las Figuras 21(A) y 21(B)), indicó una distribución homogénea de las señales en cada uno de los *spots*.

Para poder hacer todos los datos comparables, se realizó una normalización inter-*array* a través del método de cuantiles para un solo canal (Cy3) respecto a las señales obtenidas en las réplicas del control normalizado y, posteriormente realizando un ajuste a un modelo lineal y a un modelo bayesiano. De esta manera, se procedió a extraer los genes con expresión diferencial significativa con un *p*-valor ajustado inferior a 0.05 (95% de confianza estadística).

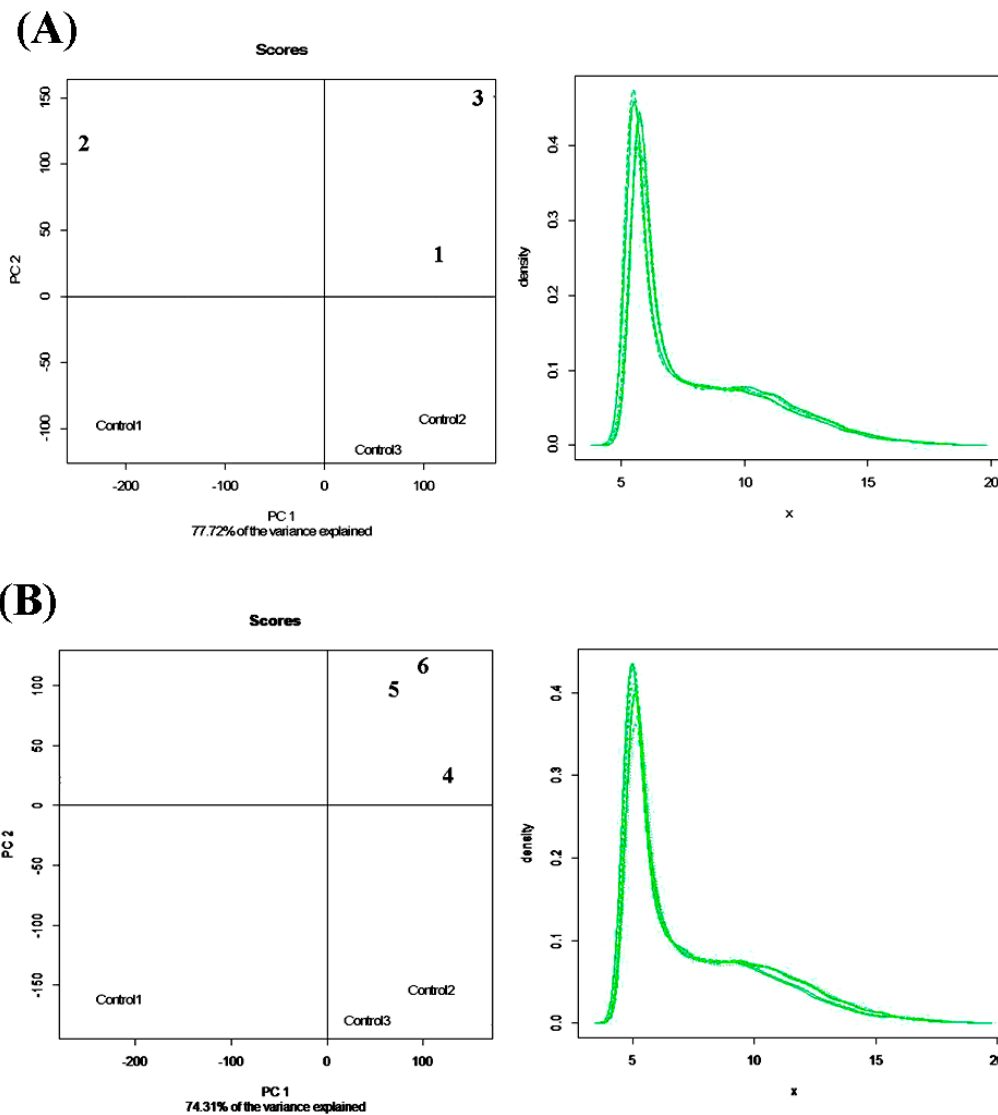


Figura 21. Análisis de la calidad global de los *microarrays*. **(A)** Análisis de la calidad del *microarray* hibridado con cRNA de células A2780 tratadas con 8 nM DIG-MSK, comparado con el cRNA de células control. **(B)** Análisis de la calidad del *microarray* hibridado con el cRNA de células A2780 tratadas con 80 nM DIG-MSK, comparado con el cRNA de células control. En el panel izquierdo de **(A)** y **(B)** se muestra el análisis de agrupamiento de las muestras mediante el método PCA. En el panel derecho de **(A)** y **(B)** se muestra el diagrama de densidades. **1, 2 y 3:** representan cada una de las réplicas de RNA obtenidas post-tratamiento de las células con 8 nM DIG-MSK. **4, 5 y 6** representan cada una de las réplicas de RNA obtenidas post-tratamiento de las células con 80 nM DIG-MSK. El eje X representa el nivel de densidad de la sonda y el eje Y indica la intensidad de la sonda.

4.2.4.3 DIG-MSK modula la expresión génica en células A2780

Del total de 21851 genes analizados en cada *microarray* (Agilent), resultantes de la eliminación de sondas duplicadas y sondas control usadas para el control de calidad y, basándonos en un punto de corte de ≥ 1.5 -fold (genes sobreexpresados) y ≤ 0.67 -fold (genes reprimidos) con una $p < 0.05$, la concentración 8 nM DIG-MSK afectó la expresión de 667 genes. De estos genes, 160 disminuyeron el nivel de expresión y 507 genes lo aumentaron, al

ser comparados con los niveles de expresión de los genes de células sin tratar (control) (Fig. 22). Usando el mismo punto de corte, la concentración 80 nM DIG-MSK afectó 4889 transcritos, de ellos, redujeron la expresión 2503 genes y la aumentaron tras la exposición al tratamiento 2386 genes. Adicionalmente, 105 genes bajaron su expresión con ambas concentraciones y 173 genes la aumentaron (intersección en los diagramas de Venn; Fig. 22).

Los datos experimentales obtenidos del análisis de los *microarrays* para cada una de las réplicas con cada concentración de DIG-MSK, se han depositado en el repositorio de la base de datos **GEO** (*Gene Expression Omnibus*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE46926>). Se encuentran disponibles con el número de identificación: **GSE46926**.

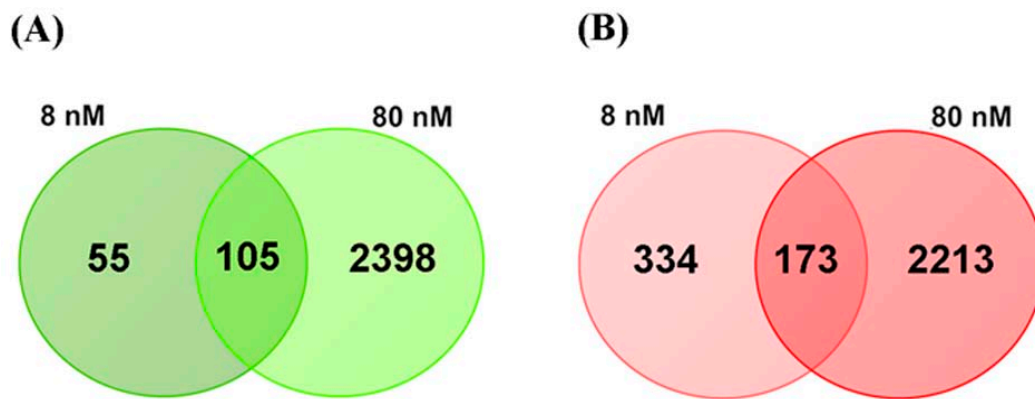


Figura 22. Diagramas de Venn representando el número de genes afectados tras el tratamiento con DIG-MSK (1.5-fold change, $p < 0.05$). **(A)** Número de genes con nivel de expresión disminuido. **(B)** Número de genes con nivel de expresión aumentado. Los números dentro de las intersecciones corresponden a genes influenciados por ambas concentraciones de la Mitramicina DIG-MSK.

Los resultados generados por el análisis de los *microarrays*, se validaron mediante qRT-PCR. Para ello, seleccionamos 11 transcritos: *TDFDP1*, *CCNA2*, *MAPK1*, *CCNB1*, *GTSE1*, *E2F1*, *BRCC3*, *Sp1*, *Sp3*, *TP53* y *CDKN1A* (Tabla 3), usando los siguientes criterios de selección:

- 1) Nuestro conocimiento previo de la variación en sus niveles de expresión tras el tratamiento con DIG-MSK en células HCT116 de carcinoma de colon, tal como se ha descrito anteriormente (apartado 4.1.5).
- 2) Su relación con el desarrollo de cáncer de ovario (The Cancer Genome Atlas Research, 2011), y/o

3) La presencia de sitios de unión potencial a Sp1 en sus promotores.

Se realizó una evaluación de la eficiencia de cada una de las parejas de oligonucleótidos cebadores, con diferentes concentraciones de cDNA (apartado 3.5.5.2), lo que nos aseguró trabajar con la concentración adecuada de cDNA. La eficiencia de cada pareja de oligonucleótidos fue de ~ 2 , con curvas de fusión de pico único. Usando una concentración de 50 ng se observó la mejor pendiente con valores < 0.1 , indicando que esta era la concentración óptima de cDNA para realizar las cuantificaciones por RT-PCR.

Para la validación usamos el mismo punto de corte que en los *microarrays* (≥ 1.5 -fold change (genes sobreexpresados) y ≤ 0.67 -fold change (genes reprimidos) con una $p < 0.05$. La normalización de los datos se realizó en base a la transcripción basal del gen *housekeeping GAPDH*. Aunque los ensayos de qRT-PCR proporcionan una cuantificación relativa de los niveles de transcripción de los genes y a que existen diferencias metodológicas entre esta técnica y los *microarrays*, entre ellas los métodos de normalización, observamos la disminución de la tasa transcripcional de cuatro de genes tras el tratamiento de las células A2780 con 8 nM u 80 nM DIG-MSK (*TFDP1*, *GTSE1*, *E2F1*, *BRCC3*), coincidiendo con los *microarrays*. Adicionalmente, observamos la represión de la expresión de los genes *Sp1* y *Sp3*, que si bien no están incluidos en los *microarrays* decidimos evaluar su importancia en la regulación transcripcional de genes involucrados en el desarrollo del cáncer, teniendo en cuenta que su unión al DNA es diana para las Mitramicinas.

Por otra parte, en tres genes (*CCNA1*, *MAPK1*, *CCNB1*) cuya expresión resultó claramente reducida de acuerdo a los *microarrays*, se observaron resultados discordantes entre una u otra concentración. Por ejemplo, *CCNA1* reprimió su transcripción tras el tratamiento de las células con 8 nM pero la aumentó con 80 nM DIG-MSK, comportamiento también observado para *MAPK1*. Por el contrario, *CCNB1* incrementó su expresión con 8 nM DIG-MSK pero la reprimió con 80 nM DIG-MSK. Además, al comparar los niveles de expresión génica obtenidos tras el tratamiento de las células A2780 con una u otra concentración de DIG-MSK, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los efectos de ambas concentraciones (Fig. 23) para varios genes (*TFDP1*, *CCNA1*, *MAPK1*, *CCNB1* y *E2F1*).

A más a más, incluimos y validamos dos genes que aumentaron significativamente su nivel de expresión durante los tratamientos, *TP53* y *CDKN1A* (*p21^{WAF1}*). En general, a través de los resultados de expresión diferencial significativa obtenida a través de los análisis de qRT-PCR, se validaron los resultados de expresión obtenidos mediante los *microarrays* para la mayoría de los genes evaluados (Fig. 23).

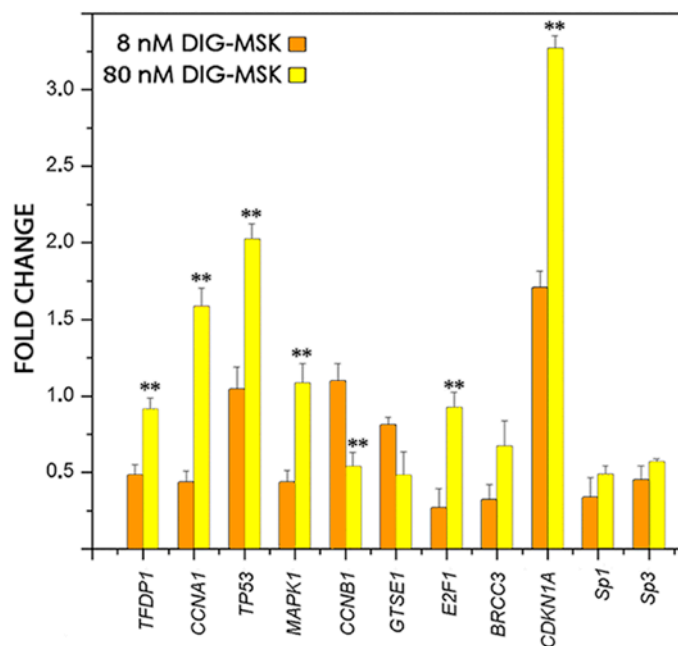


Figura 23. Validación mediante qRT-PCR de los datos generados por los *microarrays*, para un grupo de genes diferencialmente expresados en células A2780 tratadas con DIG-MSK. Los datos de los histogramas representan la media \pm SD de tres experimentos independientes (** $p < 0.01$, *t-Student*, comparación entre tratamientos).

4.2.5 Ontología de genes diferencialmente expresados tras el tratamiento de células A2780 con DIG-MSK

La clasificación en las categorías de *Gene Ontology* (GO), de los genes que bajaron o aumentaron sus niveles de expresión mediante los programas PANTHER v. 7.0 y GATHER, nos proporcionó una idea general de las rutas celulares afectadas por la exposición de las células A2780 a las dos concentraciones subletales de DIG-MSK. Las Tablas 16 a 19 presentan la ontología génica, acompañada de una evaluación estadística de la sobrerrepresentación para cada clase funcional. DIG-MSK afectó genes implicados en una variedad de rutas biológicas, incluyendo varios genes relacionados con regulación de la transcripción y procesos de metabolismo celular.

El análisis de las categorías: “función molecular y procesos biológicos”, evidenció entre los genes reprimidos por 80 nM DIG-MSK la presencia de genes involucrados en la regulación de la transcripción y metabolismo de los ácidos nucleicos, lo cual sugiere que

DIG-MSK alteró la expresión o por lo menos la actividad de unión de una variedad de factores de transcripción (Tabla 16). Un análisis similar de los resultados correspondientes al tratamiento con 8 nM DIG-MSK (Tabla 17), mostró un número menor de genes reprimidos así como de categorías GO representadas ($p < 0.05$), indicando que la respuesta celular depende de la dosis del fármaco.

Las Tablas 18 y 19 presentan la clasificación funcional de los genes sobreexpresados tras el tratamiento con 80 nM u 8 nM DIG-MSK. Con 80 nM DIG-MSK se activaron genes involucrados en procesos metabólicos y de transcripción al igual que resultaron alteradas las funciones de unión al DNA. El tratamiento con la menor concentración del fármaco afectó, en general, rutas de comunicación y desarrollo celular, así como la activación de rutas en respuesta al estrés y, causó sobrerregulación de enzimas de proteólisis (quinasas). El incremento significativo de la expresión de genes involucrados en estas rutas metabólicas, apunta a la aceleración de una amplia respuesta celular de protección frente a la exposición al nuevo análogo de la Mitramicina. El aumento de la función celular de degradación proteica sumado al aumento de la activación de las señales de transducción celular como consecuencia del estrés generado por el tratamiento con el fármaco, sugieren el desarrollo de procesos autofágicos como mecanismo de supervivencia.

Tabla 16. Clasificación en categorías GO de los genes reprimidos por el tratamiento de células A2780 con 80 nM DIG-MSK ^a.

Categorías GO ^a	Microarray (Listado de referencia)	Número de genes reprimidos	Número de genes esperados	p-valor ^b
<i>Procesos biológicos</i>				
Procesos metabólicos de nucleobases, nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos	3101	571	385.44	4.69E-21
Transcripción	1879	381	233.55	3.02E-19
Transcripción del promotor de la RNA polimerasa II	1874	380	232.93	3.44E-19
Regulación de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa II	1493	306	185.57	1.54E-15
Procesos metabólicos primarios	6704	978	833.27	2.18E-08
Procesos metabólicos	7060	1010	877.51	7.65E-07
Desarrollo del sistema	1167	212	145.05	6.27E-06
Establecimiento o mantenimiento de la arquitectura de la cromatina	228	58	28.34	9.58E-05
Organización de los organelos	253	60	31.45	5.42E-04
Procesos del desarrollo	2022	317	251.32	1.96E-03
Procesos celulares	5081	713	631.54	1.29E-02
<i>Función molecular</i>				
Unión	5511	915	684.98	2.71E-23
Unión al DNA	2041	417	253.68	4.42E-22
Unión a ácido nucleico	3196	581	397.24	2.60E-20
Actividad de factor de transcripción	1817	364	225.84	1.77E-17
Actividad reguladora de la transcripción	1817	364	225.84	1.77E-17
Actividad de cofactor de transcripción	162	44	20.14	3.74E-04
Constituyente estructural del ribosoma	176	5	21.88	2.34E-03

^a Análisis GO realizado con los programas PANTHER v. 7.0 y GATHER.

^b *Test Binomial*.

Tabla 17. Clasificación en categorías GO de los genes reprimidos por el tratamiento de células A2780 con 8 nM DIG-MSK ^a.

Categorías GO ^a	Microarray (Listado de referencia)	Número de genes reprimidos	Número de genes esperados	<i>p</i>-valor ^b
<i>Procesos biológicos</i>				
Procesos metabólicos de nucleobases, nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos	3101	48	25.03	4.33E-4
Ciclo celular	10.85	22	8.76	1.06E-02
Procesos metabólicos primarios	6704	74	54.11	7.69E-02
<i>Función molecular</i>				
Unión	5511	75	44.48	1.17E-05
Unión al DNA	3196	50	25.79	1.49E-04

^a Análisis GO realizado con los programas PANTHER v. 7.0 y GATHER.

^b *Test Binomial*.

Tabla 18. Clasificación en categorías GO de los genes sobreexpresados por el tratamiento de células A2780 con 80 nM DIG-MSK ^a.

Categorías GO ^a	Microarray (Listado de referencia)	Número de genes sobreexpresados	Número de genes esperados	p-valor ^b
<i>Procesos biológicos</i>				
Procesos metabólicos de nucleobases, nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos	3101	279	363.45	4.49E-05
Regulación de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa II	1493	126	174.98	5.30E-03
Procesos metabólicos del RNA	442	26	51.80	8.23E-03
Transcripción del promotor de la RNA polimerasa II	1874	167	219.64	9.69E-03
Transcripción	1879	168	220.22	1.13E-02
Transporte de proteínas	1197	182	140.29	4.42E-02
Transporte de proteínas intracelulares	1197	182	140.29	4.42E-02
<i>Función molecular</i>				
Unión a ácido nucleico	3196	264	374.58	3.78E-09
Unión al DNA	2041	174	239.21	2.56E-04
Actividad de factor de transcripción	1817	156	212.96	1.52E-03
Actividad reguladora de la transcripción	1817	156	212.96	1.52E-03
Constituyente estructural del citoesqueleto	773	130	90.60	5.74E-03
Unión a actina	196	43	22.97	1.64E-02
Constituyente estructural del ribosoma	176	6	20.63	2.29E-02
Actividad hidrolasa	49	16	5.74	4.65E-02

^a Análisis GO realizado con los programas PANTHER v. 7.0 y GATHER.

^b *Test Binomial*.

Tabla 19. Clasificación en categorías GO de los genes sobreexpresados por el tratamiento de células A2780 con 8 nM DIG-MSK ^a.

Categorías GO ^a	Microarray (Listado de referencia)	Número de genes sobreexpresados	Número de genes esperados	p-valor ^b
<i>Procesos biológicos</i>				
Procesos celulares	5081	176	127.42	7.37E-05
Procesos del desarrollo	2022	79	50.71	8.17E-03
Transducción de señales	3317	114	83.18	3.16E-02
Morfogénesis de la estructura anatómica	698	34	17.50	3.77E-02
Respuesta a estrés	247	34	17.50	3.77E-02
Procesamiento antigénico y presentación del péptido o antígeno polisacárido vía MHC de clase II	24	17	6.19	3.77E-02
Comunicación celular	3495	5	0.60	6.72E-02
Respuesta a estímulos	1006	43	25.23	9.14E-02
<i>Función molecular</i>				
Unión a ácido nucleico	3196	53	80.15	4.18E-02
Actividad ubiquitina-ligasa	210	15	5.27	5.19E-02

^a Análisis GO realizado con los programas PANTHER v. 7.0 y GATHER.

^b *Test Binomial*.

4.2.6 Identificación de factores de transcripción asociados con la regulación de genes reprimidos por DIG-MSK

Dado que los análogos de las Mitramicinas pueden actuar como inhibidores de la transcripción *in vivo* e *in vitro* a través de la competición directa con proteínas que se unen al DNA (Albertini et al., 2006; Jones et al., 1995; Malek et al., 2012; Portugal et al., 2011; Vizcaíno et al., 2012), se analizó si entre los factores de transcripción que se unen a regiones ricas en C/G, hubo un “enriquecimiento” en sus sitios de unión potencial a los promotores de genes que disminuyeron su nivel de expresión, lo cual podría explicar que DIG-MSK reprima significativamente la expresión génica de las células A2780.

De acuerdo a los resultados obtenidos tras el análisis con la herramienta TELiS (Cole et al., 2005), los genes inhibidos por el fármaco contienen en sus promotores una mayor proporción de sitios de unión para varios factores de transcripción de la que se esperaría ocurriera por simple casualidad. Sp1 presentó la representación más alta entre los factores de transcripción (Tabla 20), en concordancia con los efectos de DIG-MSK sobre la expresión de genes activados por Sp1 en células humanas de carcinoma de colon (Vizcaíno et al., 2012). Este resultado fue consistente con el hecho de que este factor de transcripción y los análogos de la MTA se unen preferencialmente a regiones en el DNA ricas en C/G. No obstante, en este análisis encontramos otros factores de transcripción entre los mayoritariamente representados, los cuales se unen también a regiones ricas en C/G y participan en el control de la expresión génica durante el desarrollo del cáncer. Estos factores eran CREB, EGR2, N-Myc y E2F, (Tabla 20). La secuencia consenso de unión determinada por TELiS para cada uno de los factores de transcripción se muestra en la Tabla 20, junto con el análisis estadístico de incidencia que determina si un sitio de unión potencial para un factor de transcripción en particular, está presente en la mayoría de los promotores de los genes diferencialmente expresados.

Tabla 20. Factores de transcripción cuyas secuencias consenso de unión están sobrerrepresentadas en la región promotora de los genes inhibidos por el tratamiento con 8 nM u 80 nM DIG-MSK en células humanas A2780 de carcinoma de ovario.

Factor de transcripción	Secuencia consenso ^a	8 nM		80 nM	
		Genes observados GA: 81 ^b	Incidencia <i>p</i> -valor ^c	Genes observados GA: 1262 ^b	Incidencia <i>p</i> -valor ^c
CREB	GGTGACGTAAGG	19	1.0E-03	190	1.0E-10
EGR1	ATGCGTGGGCGT	//	//	20	2.2E-03
EGR2	A/TTGCGTGGGCGT	//	//	31	1.0E-10
EGR3	ATGCGTGGGCGT	3	4.5E-02	21	1.3E-02
E2F	TTTC/GGCGC	8	2.3E-02	66	2.0E-04
MAX	AAAA/CCACGTGGTTT	13	4.9E-02	149	1.2E-02
N-Myc	TCCCACGTGTCA/C/G	20	1.8E-03	198	4.0E-04
NFkB	GGGGACTTTCCA	18	1.4E-01	218	6.9E-03
Sp1	A/GGGGGGCGGGGCC	68	2.8E-07	816	1.0E-10
USF	GTCACGTGGC	51	1.3E-02	//	//

^a Según la base de datos TELiS.

^b GA: Número de genes analizados.

^c Clasificación acorde al *p*-valor ($p < 0.05$) obtenido en el análisis de incidencia.

// No se observó enriquecimiento significativo para estos factores de transcripción en los promotores de los genes analizados.

4.2.7 Análisis mediante *clustering* de la interacción de los genes diferencialmente expresados tras el tratamiento con DIG-MSK en células A2780 de carcinoma de ovario

Para examinar más detalladamente los efectos de DIG-MSK sobre la expresión génica, realizamos un análisis de *clustering* o agrupamiento jerárquico sobre un conjunto de genes seleccionados, con el objetivo de identificar similitudes o diferencias en los perfiles de expresión entre los tratamientos con DIG-MSK.

Se realizó un *clustering*, basado en los coeficientes de correlación de Pearson, de los niveles de expresión de un conjunto de 32 genes obtenido siguiendo los criterios:

1. Como conjunto de partida, se utilizó el total de genes (278) cuya expresión aumentó o disminuyó por la influencia de ambas concentraciones de DIG-MSK (intersección en los Diagramas de Venn en la Fig. 13).
2. Los 278 genes se analizaron mediante la herramienta *online: Genomatix Pathway System* (GePs). Se identificaron 72 de éstos genes dentro de la sub-categoría “*Ovarian Neoplasm*” incluida en la categoría “*Diseases/MeSH*”. Cabe resaltar que 10 genes se eliminaron del posterior análisis porque su interacción con otros genes no era evidente, obteniendo por lo tanto un conjunto de 62 genes para continuar con el análisis.
3. Los 62 genes restantes se estudiaron en la base de datos TELiS para verificar si presentaban o no sitios de unión potencial a Sp1 en sus promotores. Entre ellos, 32 genes contenían inequívocamente al menos un sitio de unión para Sp1.

La representación de *heat-map* mostrada en la Figura 24, resume la relación entre la actividad de cada concentración de fármaco y los cambios en la expresión de genes regulados por Sp1 relevantes en la progresión del cáncer de ovario. Para comparar los efectos de una u otra concentración de DIG-MSK, se ideó una forma conveniente de visualizar los patrones de similitudes o diferencias, identificando cada *cluster* con letras minúsculas. Los dendogramas muestran la vinculación en el *cluster* de varios genes involucrados en vías celulares comunes.

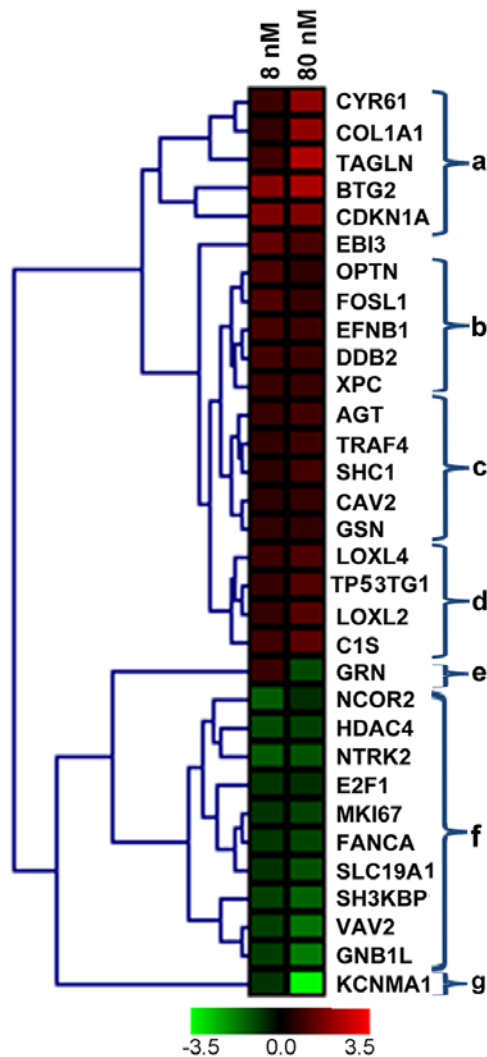


Figura 24. Efectos del tratamiento de células A2780 con 8 nM u 80 nM DIG-MSK sobre un grupo de genes relacionado con el desarrollo de “neoplasma de ovario”, que contienen al menos un sitio de unión potencial para Sp1 en la región promotora proximal. El *heat-map* contiene un *clustering* jerárquico de los cambios en la expresión génica para cada tratamiento. Los dendogramas indican la vinculación intergénica basada en los coeficientes de correlación de Pearson. A efectos de comparación, las letras en minúscula al lado derecho indican los “*clusters*” con características compartidas.

El *cluster* identificado con la letra “a” contiene genes con expresión aumentada tras cualquiera de los tratamientos, aunque 80 nM DIG-MSK tuvo un efecto superior. Este *cluster* abarca genes relacionados en varias funciones celulares como adhesión celular, migración y proliferación; incluyendo genes involucrados en el control de la progresión del ciclo celular como es el caso de *CDKN1A* (*p21^{WAF}*), cuyo aumento transcripcional coincide con la parada transitoria de las células en la fase G1 del ciclo celular (Fig. 18).

El *cluster* “b” contiene genes que se han descrito como sobreexpresados en cáncer de ovario, y genes como *DDB2* cuyo aumento de expresión se ha correlacionado con un incremento de la sensibilidad de las células de cáncer de ovario a algunos agentes terapéuticos (Barakat et al., 2010). Por su parte, el *cluster* “c” incluye genes que usualmente se encuentran altamente expresados en el carcinoma de ovario, aunque DIG-MSK no inhibió la expresión de este grupo de genes en particular.

En el *cluster* “d” pueden observarse genes cuya expresión puede ser inducida en condiciones de estrés celular, efecto que podemos esperar después de un tratamiento con un fármaco antitumoral. Hemos identificado con la letra “e” a un gen (*GRN*) que es un marcador pronóstico en el carcinoma epitelial de ovario (Davidson et al., 2004). Aunque se ubica cerca de otros genes, es peculiar porque aumenta su expresión tras el tratamiento con 8 nM DIG-MSK, mientras que disminuye sustancialmente su expresión cuando la concentración del fármaco es diez veces mayor. El más extenso de todos los *clusters*, el “f”, consta de genes con nivel de expresión disminuida y regulación dependiente de la concentración de fármaco. Dentro de estos genes se encuentra *E2F1*, así como genes que pueden contribuir en la tumorigénesis, entre otros, del carcinoma invasivo de ovario (Reimer et al., 2010). Finalmente, el *cluster* “g” contiene el gen *KCNMA1*, asociado con proliferación celular e indicador de mal pronóstico (Oeggerli et al., 2012), su expresión disminuyó notablemente tras el tratamiento con 80 nM DIG-MSK.

En paralelo, realizamos un análisis de interacción intergénica mediante la construcción de “redes biológicas (*networks*) de transcripción” a través de la herramienta GePS. Para ello, empleamos el listado de los genes con expresión diferencial significativa tras el tratamiento de las células A2780 con 80 nM DIG-MSK, concentración con la cual hemos observado una mayor inhibición. Las redes fueron construidas utilizando las anotaciones: “factores de transcripción co-citados en la literatura” y “vías de transducción de señales”. La Figura 25(A) presenta una red de interacción génica para la ruta de “reparación del DNA”, significativamente sobrerrepresentada ($p = 7.96E-03$) al introducir como conjunto de análisis el listado de genes con expresión aumentada por el tratamiento de las células con 80 nM DIG-MSK. La alteración de esta ruta, es consistente con la clasificación funcional GO (apartado 4.2.5), donde se encontró sobrerrepresentada la sub-categoría “procesos metabólicos de nucleobases, nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos” incluida en “Procesos biológicos” (Tabla 18). Como puede observarse existe una clara dominancia por parte de los genes *CDKN1A* ($p21^{WAF1}$) y *TP53*, quienes se encuentran como nodos centrales de la red. El papel de estos genes en la reparación del DNA es consistente con lo observado en el análisis de la distribución de las fases del ciclo celular, donde la progresión se detuvo en la fase G1 (Fig. 18).

Cuando se utilizó como conjunto de partida el listado de genes con expresión inhibida por el tratamiento de las células con 80 nM DIG-MSK, encontramos cuatro factores de transcripción significativamente enriquecidos ($p < 0.05$; *Test* exacto de Fisher): BRCA1 ($p = 2.37E-04$), BIRC5 ($p = 1.39E-04$), Sp1 ($p = 1.43E-03$) y YY1 ($p = 1.32E-04$). Los genes afectados que están regulados por estos factores de transcripción se presentan en la Tabla 21, que contiene además cada uno de los conjuntos de genes analizados, incluyendo el conjunto de genes utilizado para la construcción de la red de genes involucrados en el “Neoplasma de ovario”, usados para la creación del *heat-map* presentado en la Figura 24. Estos resultados revelan que DIG-MSK impide o por lo menos aminora su actividad transcripcional. Este resultado es de particular interés, debido a que todas estas proteínas se unen a regiones promotoras ricas en C/G, indicando que el nuevo análogo de la Mitramicina, como evaluamos en resultados previos (Fig. 14 y Tabla 20), parece reprimir genes regulados no solo por Sp1 sino también por otros factores transcripción que son importantes en el desarrollo del cáncer, lo que potenciaría su efecto antitumoral.

La Figura 25(B) muestra la red de genes regulados por Sp1 y la respectiva secuencia consenso de unión para este factor de transcripción, determinada por la base de datos Jaspar (<http://jaspardev.genereg.net/>). Los genes *Myc* y *EGR1* predominaron como nodos centrales en la red, interactuando con un amplio número de genes, dentro de los cuales se destacan *E2F1*, *BIRC5* y otros miembros de la familia de factores de transcripción Sp.

En general, al realizar diferentes combinaciones con los conjuntos de datos para observar el efecto de DIG-MSK sobre determinadas rutas metabólicas, de transducción de señales o de transcripción, observamos resultados similares a los obtenidos con el análisis realizado únicamente con los genes sobreexpresados o reprimidos por el tratamiento con 80 nM DIG-MSK. Estas observaciones sugireren que el efecto del fármaco sobre determinadas rutas biológicas celulares es independiente de la concentración usada y tiene que ver básicamente con el mecanismo de acción de la molécula.

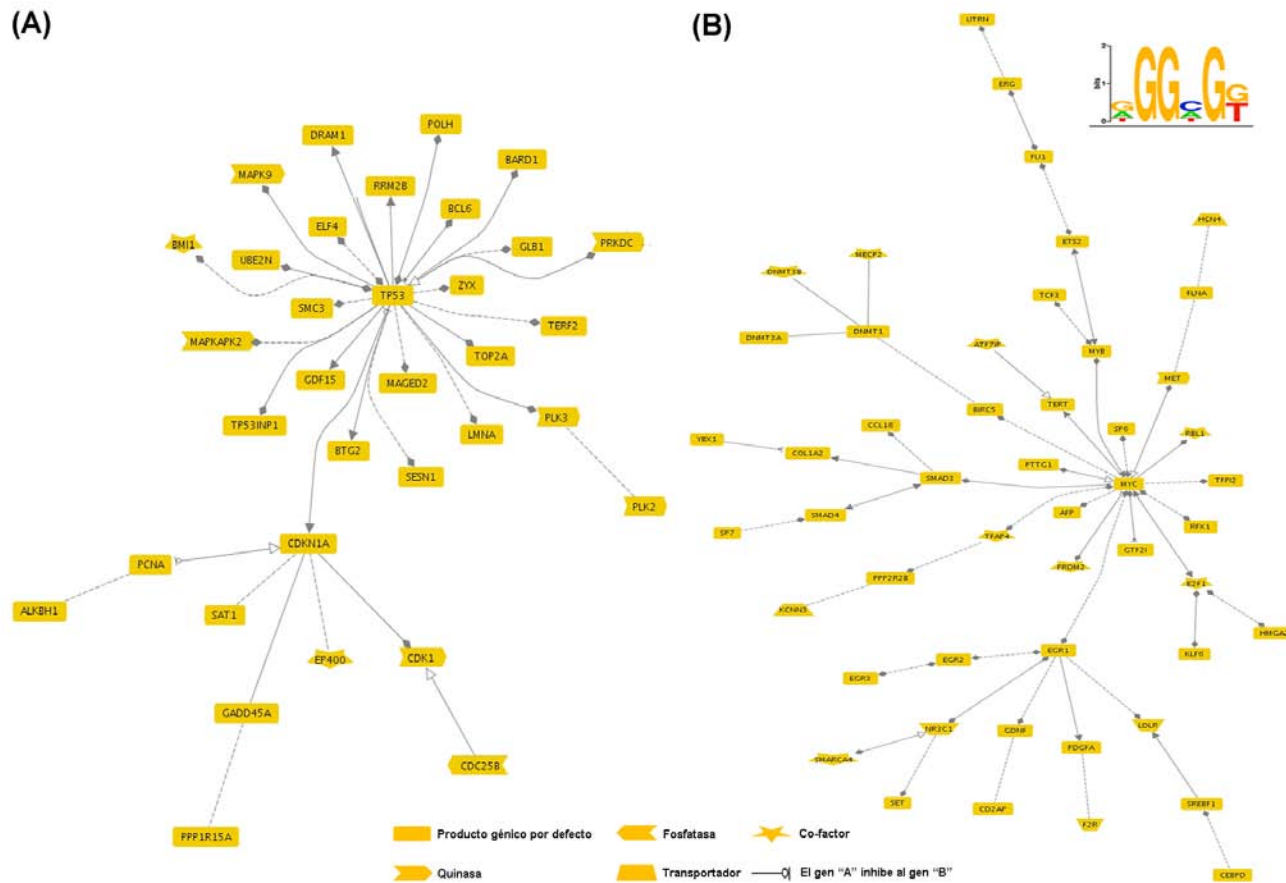


Figura 25. Redes de interacción de genes modulados por 80 nM DIG-MSK. **(A).** Red generada por la herramienta GePS con los genes sobreexpresados. La red representa la conexión de genes involucrados en la activación de señales de transducción para la reparación del DNA. **(B).** Red construida con los genes reprimidos por la Mitramicina DIG-MSK, señalando las relaciones a nivel bibliográfico para genes regulados por Sp1. Las líneas punteadas indican genes asociados por co-citaciones bibliográficas, mientras que las líneas continuas indican genes asociados por curación de datos realizada por expertos. Los diamantes y triángulos negros indican que el promotor del gen "B" (el gen con el diamante/triángulo) tiene un sitio de unión, validado experimentalmente, para el factor de transcripción codificado por el gen "A". Los triángulos vacíos indican que la unión de un factor de transcripción en particular al promotor de un gen no se ha descrito hasta la fecha. Las diferentes formas en la parte inferior de la figura, representan la función de cada gen. En la esquina superior derecha del panel (B) se presenta la secuencia logo del sitio de unión consenso para Sp1, recuperada de la base de datos JASPAR.

Tabla 21. Redes biológicas afectadas por el tratamiento de células A2780 con 8 nM u 80 nM DIG-MSK. El análisis se realizó mediante la herramienta GePS.

Conjunto de genes evaluado	Red ^a	p-valor ^b	Genes asociados
Genes sobreexpresados por el tratamiento con ambas concentraciones	TP53	1.81E-07	<i>GADD45A; TP53INP1; CDKN1A; FAS; PCBP4; SPATA18; ZMAT3; DDB2; SESN1; GDF15; PLK3; S100A1; PLK2; TRAF4; TRIAP1; RRM2B; DRAM1; PCNA; BTG2; PRODH; DFNA5EDA2R; XPC; PTP4A1; DFNA5</i>
	Reparación del DNA	4.14E-06	<i>GADD45A; TP53INP1; CDKN1A; DRAM1; DDB2; SESN1; GDF15; PLK3; PLK2; RRM2B; PCNA; BTG2; XPC; SAT1</i>
Genes reprimidos por el tratamiento con ambas concentraciones	Sp1	4.99E-03	<i>NFIX; TCF3; E2F6; E2F1; LRRFIP1; SP7; SLC19A1; HDAC4</i>
Genes sobreexpresados y reprimidos por el tratamiento con ambas concentraciones	Neoplasma de ovario	1.47E-06	<i>GADD45A; CDKN1A; RHOC; S100A1; LIF; DDR1; TFIIA; FOSL1; SAA1; PLK2; TRAF4; NCOR2; OPTN; MTMR11; BTG2; GADD45B; EFNBI; INA; SAT1; CALD1; CYR61; EBI3; HLA-B; HDAC4; CORO2A; SLC19A1; GDF15; RPTOR; AHNAK; ANXA4; AGT; GNB1L; LOXL2; MAD1L1; SEMA3B; MKI67; KCNMA1; LRP1; NTRK2; CBX1; SHC1; LOXL4; CIS; E2F1; GRN; XPC; SH3KBP1; SYNE1; RCC1; CYP2E1; CAV2; TACC3; ACTA2; FAS; TAGLN; HBG1; AQP3; DDB2; HNRNPA2B1; PLK3; RXRA; SLC2A1; VAV2; CUX1; GSN; PCNA; HSP90AA1; TP53TG1; ADAMTSL4; COL1A1; FBXW7; FANCA</i>
Genes reprimidos únicamente por el tratamiento con 80 nM	BRCA1	2.37E-04	<i>IRF1; EGR1; SMARCA4; TRERF1; SREBF1; OAS2; E2F6; E2F1; PRKCZ; ADAMTSL1; TAF4; POU2F1; HAS2; CENPW; FOXA1; REST; ZBTB7B; RFX1; TESC; TERT; UTRN; CREBBP; MECP2; TFAP4; MEF2D; SLC39A8; TFF1; LRRFIP1; NR2F1; DNMT3A; GDNF; COL1A2; PRDM2; POLD1; ATF7IP; CYP17A1; DDIT4; TFP12; CD2AP; NFIX; NKX2-1; RNF4; GPC4; TIMP3; ETS2; GATA6; BACE1; NFYA; POU1F1; Sp5; ARHGEF10; SLC19A1; v-myc; Sp7; DNMT3B; PREX1; met; PCYT1A; ZBTB7A; PPP2R2; MIER1; HIF1A; ZBTB2; ZNF143; ZNF292; SALL2; HMGA2; CEBPD; HOXC4; v-ets; HDAC4; EPHX2; TCF3; DLC1; HCN4; TCF20; EGR2; EGR3; NFE2; HDAC7; NF1; AFP; Myc; Sp6</i>
	BIRC5	1.39E-04	<i>VEGFC; MYC; NOTCH1; CDKN2A; VEGFA; CASP7; ABCC5; CASP9; XIAP; DFFA; KDM5B; MCM5; RCC1; MKI67; BIN1; UPK2; USP10; BCL2A1; CCNG2; ERBB2; YY1AP1; HIF1A; MAGT1; E2F1; GPC3; FSCN1; JUP; TYMP; INCENP; XAF1; HMGB1; CENPF; MDK; CENPA; CFLAR; PDLIM7; TERT; COMP; FHIT; BCL2L11; CAV1; WTAP; PMAIP1; HSP90AA1; DIABLO; PML; DNMT3A; CDK6; BAGE</i>

Conjunto de genes evaluado	Red ^a	p-valor ^b	Genes asociados
	Sp1	1.43E-03	<i>MYC; SP7; DNMT3B; PREX1; MET; PCYT1A; ZBTB7A1; PARP1; PPP2R2B; MIER1; HIF1A; ZBTB2; ZNF143; ZNF292; SALL2; HMGA2; CEBPD; HOXC4; ERG; HDAC4; EPHX2; TCF3; DLC1; HCN4; TCF20; EGR2; EGR3; NFE2; HDAC7; NF1; SLC19A1; AFP; ARHGEF10; POLD1; ATF7IP; CYP17A1; DDIT4; TFPI2; CD2AP; NFIX; NKX2-1; RNF4; GPC4; TIMP3; ETS2; GATA6; BACE1; NFYA; POU1F1; SP5; IRF1; EGR1; SMARCA4; TRERF1; SREBF1; OAS2; E2F6; E2F1; PRKCZ; ADAMTS1; TAF4; POU2F1; HAS2; CENPW; FOXA1; REST; ZBTB7B; RFX1; TESC; TERT; UTRN; CREBBP; MECP2; TFAP4; MEF2D; SLC39A8; TFF1; LRRFIP1; NR2F1; DNMT3A; GDNF; COL1A2; PRDM2</i>
	YY1	1.32E-04	<i>SREBF1; MYC; PEG3; PIAS4; BACE1; COX7C; CXCR4; GON4L; POU2F1; CP; HOXA9; PARP1; CASP7; YY1AP1; BIN1; DLK1; E2F1; OCLN; ERBB2; SAP30; YAF2; NF1; CEBPD; HDAC4; MBTPS2; REST; DMD; CUX1; EGR1; HIST1H4A; FKBP1A; HOXB4; NFE2; CREBBP; MECP2; NFIL3; SLC1A3; GDNF; PRDM2; EGR2; GABPB1; PRRX1; MEIS1; RBPJ; CBX5; HIST1H1D</i>
Genes sobreexpresados únicamente por el tratamiento con 80 nM	TP53	3.03E-03	<i>PRODH; TPM3; CHMP4C; MPV17; CDKN2C; GLYAT; CDKN1A; IRF2BP2; KRAS; DPYD; C12orf5; PLK2; ERCC2; RPL27A; ZNF346; ERBB3; SLK; ATR; ING3; GAMT; RCHY1; LITAF; GDF15; RRM2B; ANXA6; ANXA5; POLH; EI24; TP53INP1; MCL1; NBN; MAP1LC3A; PSMD9; XPC; STMN1; DRAM1; LASP1; IDH1; PSMD10; APLP1; PPP1R13L; DCK; BCL6; BCL2; TERF2; NUPR1; OGG1; DDB2; SESN1; GADD45A; PTEN; ITGB4; FAS; PTP4A1; S100A1; GSTM1; S100A4; CCNG1; S100A6; ZMAT3; GSTT1; THBS1; TRAF4; CRYZ; PTPN13; BTG2; RNASEL; GLB1; NUA1; ARL6IP1; UBE2N; BLCAP; DHCR24; UGCG; NT5C2; CYCS; FGF1; CD68; PLAGL1; ELF4; GML; PRKDC; ATM; GPNMB; FGFR3; MTBP; CDK1; PCBP4; PLK3; TOP2A; PRNP; PCNA; EDA2R; RAD17; HSP90AB1</i>
	Reparación del DNA	7.96E-03	<i>RANBP9; TERF2; CDKN1A; BARD1SHMT1; TP53INP1; BMI1; CBX4; PLK3; NBN; RAD17; ALKBH1; ELF4; PLK2; PCNA; MAPKAPK2; ERCC2; PRKDC; ERCC4; POLH; BCL6; PPP1R15A; SAT1; LMNA; ATR; EP400; MAGED2; XPC; SMC3; OGG1; BTG2; CDC25B; DDB2; SESN1; RCBTB1; UBE2N; GADD45A; GLB1; MAPK9; ATM; RRM2B; TP53; GDF15; ZYX; TOP2A; RPAP3; SCARA3; CDK1; MPG; DRAM1</i>
	Punto de control G1/S	2.17E-03	<i>TGFB1; ATR; CDKN1A; TP53; ACTG1; ATM; HDAC1; CDK2; CDK4; CDK1</i>

^a Basado en: “factores de transcripción co-citados en la literatura”, “genes co-citados en la literatura”, “vías de transducción de señales” y “Neoplasma de Ovario”(Diseases/Ovarian Neoplasm (MeSH)).

^b Test exacto de Fisher.

4.2.8 DIG-MSK reprime genes sobreexpresados en células A2780

En paralelo al análisis de enriquecimiento en los términos de *Gene Ontology* (GO) mostrado anteriormente (Tablas 16 a 19), se efectuó una comparación teórica, no sesgada, de una lista de genes inhibidos tras el tratamiento con DIG-MSK, con el listado de términos disponible en la *Cancer Cell Line Encyclopedia* (Barretina et al., 2012) para diferentes células tumorales, a través de la herramienta *online* Enrichr. Derivado de este análisis, observamos un fuerte efecto específico de DIG-MSK ($p = 2.45E-17$; *Test* exacto de Fisher) sobre genes que se ha descrito aumentan su nivel de expresión en células A2780; condición necesaria para vincular su actividad antitumoral a los cambios en la expresión génica.

La Tabla 22 lista 25 líneas tumorales que mostraron un enriquecimiento significativo con los términos incluidos en la *Cancer Cell Line Encyclopedia*. Como puede observarse, dentro de las diferentes líneas celulares se encuentran otras dos líneas de carcinoma de ovario: OVK18 (posición número 7) y TOV112D (posición número 24), sugiriendo que estas dos líneas y A2780 expresan ciertos genes que podrían estar siendo modulados de manera específica por DIG-MSK.

Adicionalmente, se incluyó el mismo listado de genes usado para realizar la comparación con los términos incluidos en la *Cancer Cell Line Encyclopedia*, en el parámetro *Disease/Drugs* de la herramienta Enrichr. Se encontró a la La Plicamicina (nombre alternativo con el que se conoce a la MTA) como fármaco principal ($p = 1.86E-174$) del listado, en clara concordancia con la sensibilidad de la línea celular A2780 al tratamiento con un análogo de la MTA (DIG-MSK).

Tabla 22. Líneas celulares tumorales que sobreexpresan genes inhibidos por DIG-MSK. Comparación realizada con los términos incluidos en la *Cancer Cell Line Encyclopedia*^a.

Índice	Nombre	<i>p</i> -valor ^b	<i>z</i> -score ^c	Puntaje combinado ^d
1	<i>A2780_OVARY</i>	2.45E-14	-1.70	53.31
2	<i>NCIH1581_LUNG</i>	3.03E-6	-1.82	12.47
3	<i>MESSA_SOFT_TISSUE</i>	3.31E-6	-1.68	11.48
4	<i>KPNRTBM1_AUTONOMIC_GANGLIA</i>	1.00E-5	-1.81	10.91
5	<i>AZ521_STOMACH</i>	6.67E-5	-1.80	8.48
6	<i>HGC27_STOMACH</i>	4.69E-5	-1.84	8.52
7	<i>OVK18_OVARY</i>	7.14E-5	-1.77	8.16
8	<i>HUTU80_SMALL_INTESTINE</i>	9.11E-5	-1.78	8.01
9	<i>CHP212_AUTONOMIC_GANGLIA</i>	2.38E-4	-1.80	6.60
10	<i>G401_SOFT_TISSUE</i>	2.93E-4	-1.82	6.48
11	<i>NCIH661_LUNG</i>	3.41E-4	-1.67	5.84
12	<i>CORL279_LUNG</i>	5.26E-4	-1.75	5.52
13	<i>CHP126_AUTONOMIC_GANGLIA</i>	7.34E-4	-1.83	5.32
14	<i>TE617T_SOFT_TISSUE</i>	9.85E-4	-1.73	4.65
15	<i>NCIH2141_LUNG</i>	1.59E-3	-1.72	3.93
16	<i>SW579_THYROID</i>	3.69E-3	-1.72	3.52
17	<i>SIMA_AUTONOMIC_GANGLIA</i>	2.57E-3	-1.73	3.55
18	<i>JHUEM2_ENDOMETRIUM</i>	2.68E-3	-1.79	3.63
19	<i>NCIH69_LUNG</i>	2.23E-3	-1.77	3.58
20	<i>MHHNB11_AUTONOMIC_GANGLIA</i>	2.19E-3	-1.65	3.35
21	<i>GB1_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM</i>	4.28E-3	-1.74	3.37
22	<i>GRM_SKIN</i>	3.27E-3	-1.76	3.41
23	<i>SKNBE2_AUTONOMIC_GANGLIA</i>	3.18E-3	-1.73	3.34
24	<i>TOV112D_OVARY</i>	2.73E-3	-1.94	3.75
25	<i>CORL51_LUNG</i>	3.59E-3	-1.68	3.26

^a Términos organizados en base a su *p*-valor.

^b *Test* exacto de Fisher.

^c *z*-score computado mediante la evaluación de la desviación del rango esperado.

^d El *Score* combinado multiplica el *log* del *p*-valor computado mediante el *test* exacto de Fisher por el *z*-score.

4.2.9 DIG-MSK compete con Sp1 por la unión a los promotores de los genes en células A2780 en cultivo

Para evaluar la capacidad de la Mitramicina DIG-MSK de inhibir y/o competir con el factor de transcripción Sp1 por la unión a sus secuencias consenso de unión en los promotores en células en cultivo, inmunoprecipitamos cromatina con un anticuerpo específico contra Sp1 tanto en células control como en células tratadas con 80 nM DIG-MSK, que es la concentración con la cual hemos observado un mayor efecto antitranscripcional y citotóxico.

Para realizar los ensayos de ChIP, sonicamos cromatina de células A2780 hasta obtener fragmentos entre 200 y 500 pb aproximadamente. La Figura 26 muestra una electroforesis en gel de agarosa, realizada para comprobar el tamaño de la cromatina de células control y de células expuestas al fármaco después de ser sometida a diferentes ciclos de sonicación.

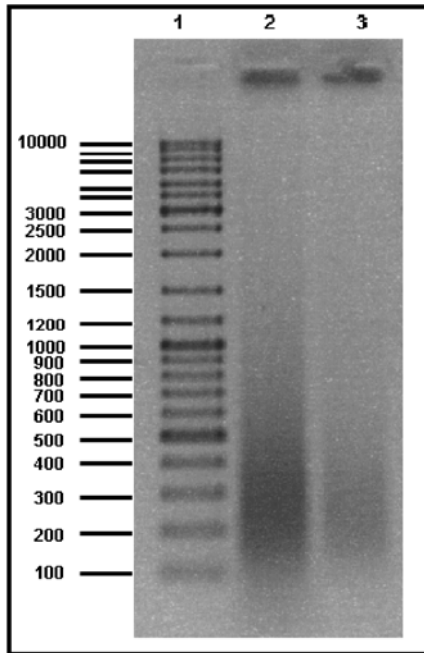


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa de cromatina sonicada, aislada de células A2780. **1.** Marcador de peso molecular (10 kb). **2.** Cromatina sonicada de células control. **3.** Cromatina sonicada de células tratadas con 80 nM DIG-MSK.

Una vez obtenidos los tamaños requeridos de cromatina, se realizaron inmunoprecipitaciones independientes con los anticuerpos anti-Sp1 y anti-IgG (Control negativo de inmunoprecipitación: *Mock*), para cada una de las dos condiciones experimentales. Se cuantificó mediante qRT-PCR la ocupación de Sp1 en los promotores de los genes *XIAP*, *CRABP1*, *MDK* y *KCNMA1*, que mostraron un nivel de expresión significativamente reprimido tras el tratamiento con 80 nM DIG-MSK. Todos ellos contienen sitios consenso de unión para Sp1 en sus promotores y/o están asociados con la progresión del carcinoma de ovario (Oeggerli et al., 2012; Rice et al., 2010; Shaw et al., 2008; Skubitz et al., 2006). Como control negativo adicional de la qRT-PCR incluimos el gen *GAPDH*, amplificando una región corriente-abajo del gen que carece de sitios de unión a Sp1. Esto permitió verificar, de manera indirecta, la especificidad del anticuerpo anti-Sp1. Este control negativo nos permite hacernos una idea del *background* tanto del *Mock* como de cada ChIP. DIG-MSK disminuyó la unión de Sp1 a los promotores de todos los genes evaluados, con un efecto superior en los genes *XIAP* y *KCNMA1* (Fig. 27). Los niveles del *Mock* fueron bajos en

todos los casos, incluyendo en la cuantificación realizada para *GAPDH*, indicando buena calidad y reproducibilidad de los experimentos.

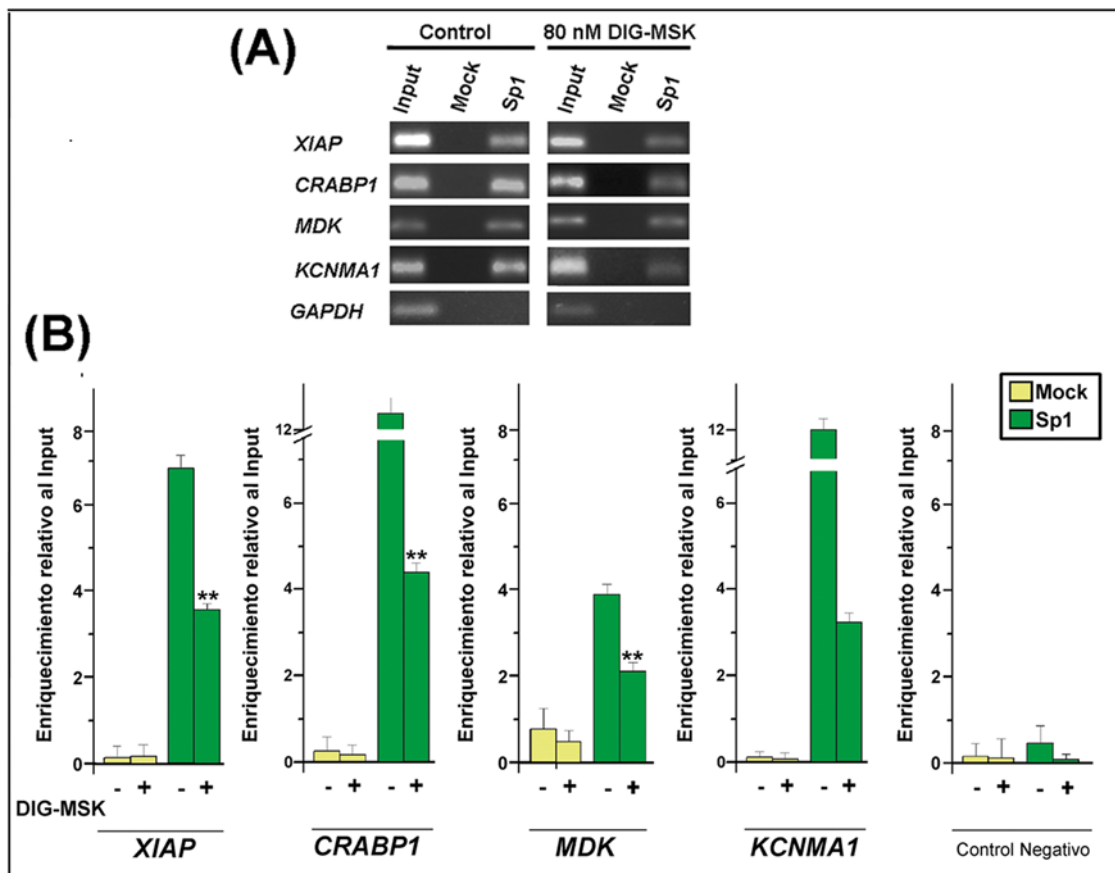


Figura 27. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de los sitios de unión a Sp1 en los promotores de los genes *XIAP*, *CRABP1*, *MDK* y *KCNMA1* en células A2780, en presencia o ausencia de 80 nM DIG-MSK. El ensayo se realizó usando un anticuerpo anti-Sp1 específico. Como control negativo de inmunoprecipitación (*Mock*) se empleó un anticuerpo inespecífico no relacionado (IgG). Para el control negativo de la qRT-PCR se inmunoprecipitó y amplificó un fragmento de DNA que carece de sitios de unión para Sp1. **(A)** Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por qRT-PCR, para cada uno de los genes evaluados en las fracciones de DNA del *input* de células control y células tratadas con DIG-MSK, así como el *mock* correspondiente y cada una de las fracciones inmunoprecipitadas con anti-Sp1 **(B)** Cuantificación por qRT-PCR del DNA en las fracciones inmunoprecipitadas y del DNA en el *input*. Los valores (media \pm SD de 3 experimentos independientes) mostrados representan el enriquecimiento del DNA del *input* en las fracciones inmunoprecipitadas (** $p < 0.01$; *t*-Student).

4.2.10 DIG-MSK induce cambios en los niveles de proteínas, consistentes con los cambios en la expresión génica

La Figura 28(A) presenta algunos ejemplos de los cambios en los niveles de proteínas después del tratamiento de las células A2780 con DIG-MSK. La Figura 28(B) presenta la cuantificación de los niveles proteicos. Los niveles de las proteínas Sp1 y Sp3 son

consistentes con la disminución en la regulación de la expresión génica como consecuencia del tratamiento con el fármaco. Por su parte, los niveles de p53 incrementaron después de 24 horas de tratamiento, disminuyendo posteriormente. En el caso de p21^{WAF1} (CDKN1A), su nivel permaneció elevado en el rango de tiempo evaluado. En conjunto, los cambios en los niveles de proteínas fueron plenamente consistentes con los resultados obtenidos en los ensayos de qRT-PCR y con los cambios en la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular después de los tratamientos (Fig. 18).

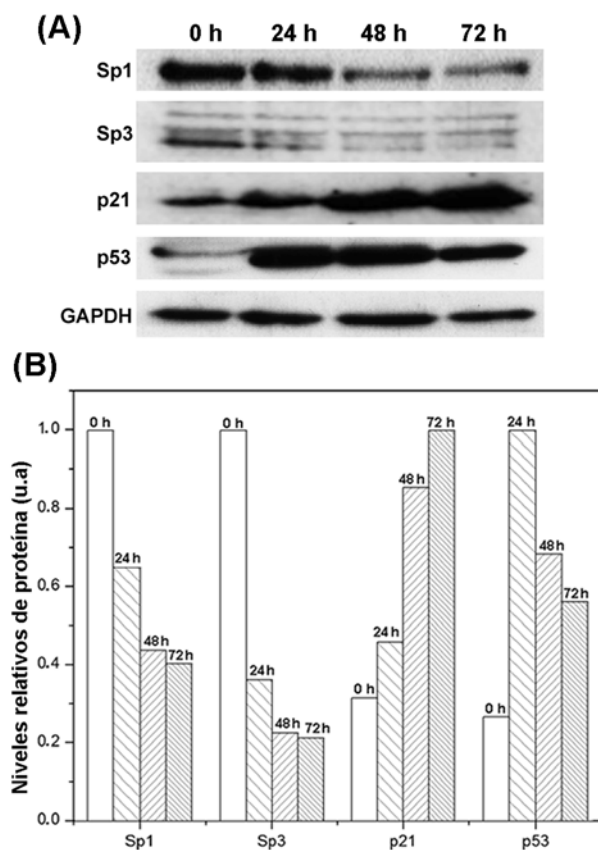


Figura 28. Análisis de los niveles de proteína por inmunotransferencia, en células A2780. **(A)** *Western blots* que muestran los cambios en los niveles de proteínas en células A2780 tratadas con 80 nM DIG-MSK para diferentes tiempos, indicados en la parte superior del panel. Los experimentos se realizaron por duplicado con resultados similares. **(B)** Cuantificación de los *Western blots* mostrados en el panel (A). Este panel presenta la disminución dependiente del tiempo de los niveles de las proteínas Sp1 y Sp3, y el aumento de los niveles proteicos de p53 y p21^{WAF1} (CDKN1A).

5. DISCUSIÓN

La comprensión de los mecanismos de acción de algunos fármacos antitumorales como las Mitramicinas aquí estudiadas, puede facilitar la individualización de la quimioterapia “hecha a la medida”, a través del diseño racional de nuevas moléculas que sean capaces de unirse al DNA con mayor especificidad y afinidad, bloqueando la interacción con ciertos factores de transcripción y, como consecuencia, modulando la expresión de genes que puedan constituir dianas terapéuticas potenciales. Las variaciones estructurales en las Mitramicinas, inducen diferencias tanto en la unión al DNA, como en los perfiles de bioactividad (Barceló et al., 2010; Fernández-Guizán et al., 2014; Remsing et al., 2003). Por lo tanto, disponer de un nuevo análogo, con un perfil farmacológico y toxicológico mejorado, abre nuevas posibilidades para explorar las propiedades únicas de esta clase de moléculas en la terapia contra el cáncer. Actualmente, el NCI (*National Cancer Institute*) ha incluido en su Programa de Desarrollo Terapéutico varios análogos de la MTA que muestran propiedades farmacológicas mejoradas (Núñez et al., 2012).

En esta tesis se han relacionado los cambios en los perfiles de expresión génica con las respuestas celulares de dos líneas tumorales, tras el tratamiento con MSK y DIG-MSK; dos nuevos análogos de la MTA. Se ha obtenido información acerca del mecanismo de acción de la nueva molécula DIG-MSK y se ha comparado su efecto en células HCT116 de carcinoma de colon humano con MSK, un análogo estructuralmente relacionado. Estudios previos habían descrito que MSK es más eficaz que su molécula parental (la MTA), inhibiendo el crecimiento de 60 tipos de líneas tumorales humanas entre ellas, la línea HCT116 evaluada en este trabajo (Remsing et al., 2003). En general, DIG-MSK se comportó como un agente antiproliferativo más eficiente, en cuanto resultó aproximadamente 2 veces más potente (de acuerdo a su IC_{75}) en inhibir el crecimiento de las células (Tabla 4). La capacidad de inhibir el crecimiento celular fue similar en células A2780 de carcinoma de ovario humano (Tabla 13), lo que en ambos casos puede deberse a una mejora en la absorción celular de la DIG-MSK (Fernández-Guizán et al., 2014). Se ha demostrado que de un modo parecido a lo que ocurre con la MTA, MSK y DIG-MSK se acumulan rápidamente en células A2780 (Fernández-Guizán et al., 2014), sugiriendo que la diferencia entre estas moléculas radica en el patrón de unión al DNA y en la inhibición de las interacciones DNA-proteína, mas no en la captación celular.

Tras evaluar la distribución de ambas líneas celulares a lo largo del ciclo celular, encontramos que la inhibición en la proliferación (ensayo del MTT) coincidió con la acumulación de las células en la fase G1 (Figuras 10 y 18). Concretamente, en las células A2780 tratadas con 80 nM DIG-MSK se produjo un incremento progresivo de la población sub G0, asociado con muerte celular (Fig. 18). Por otro lado, un pequeño porcentaje de las células HCT116 tratadas con DIG-MSK durante 72 horas, presentó más de un núcleo (Fig. 10), coincidiendo con lo observado mediante microscopía de contraste de fases (Figura 11). En cambio, las células A2780 no alteraron su morfología al ser tratadas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK (Fig. 19) para ninguno de los tiempos evaluados. Estos resultados pueden sugerir que el punto de control G1 dependiente de p53 y, el punto de control G2/M fueron suficientes para prevenir la poliploidización en células A2780 pero no en HCT116.

En un estudio anterior realizado en nuestro laboratorio, se había determinado si el tratamiento con MSK que producía la parada celular en G1, estaba relacionado con la inducción de senescencia celular (Bataller et al., 2008). Se vio que, en los análisis por citometría de flujo había un aumento tanto en la dispersión lateral (SS), como en la frontal (FS), resultando en una mayor granularidad y un mayor tamaño celular. Adicionalmente, la determinación de la actividad de la SA- β -galactosidasa lisosomal, reveló que en presencia del fármaco, un elevado porcentaje de células detenidas en G1 eran senescentes (Bataller et al., 2008). En el presente trabajo, no observamos desplazamiento del SS ni del FS mediante citometría de flujo en ninguna de las líneas celulares evaluadas (Figuras 10 y 18), lo que indica que no hubo un aumento de la granularidad citoplasmática ni del tamaño celular tras el tratamiento con DIG-MSK. Estos resultados sugieren que las células acumuladas en la fase G1 permanecen en estado de quiescencia en ausencia de senescencia.

Si bien es evidente el notable efecto antiproliferativo de ambas Mitramicinas, éste no coincidió completamente con la mortalidad celular (Figuras 8, 9, 17 y Tabla 14). Sin embargo, el tratamiento con concentraciones superiores a la IC₇₅ para la DIG-MSK, dentro del rango nanomolar, potenció el efecto de esta molécula, incrementando notablemente la mortalidad celular con un fenotipo apoptótico/apoptótico secundario (Figuras 9 y 17). Este resultado es equivalente a lo observado previamente en células HCT116 tratadas con MSK, donde a las 72 horas de tratamiento continuo se detectó muerte celular apoptótica (Bataller et al., 2008).

Nuestro análisis cuantitativo de la expresión de genes que regulan el control del ciclo celular en células HCT116, muestra que tanto MSK como DIG-MSK alteraron de manera diferencial los perfiles de expresión, siendo DIG-MSK un mejor modulador transcripcional (Figuras 12 y 13). La gran eficacia de este nuevo análogo para inhibir la transcripción génica, se observó también en los datos generados por *microarrays* para las células A2780. El número de genes afectados en células A2780 tras el tratamiento con DIG-MSK, dependió de la concentración de fármaco usada (Fig. 22). Como hemos visto, la transcripción es la principal diana de DIG-MSK, como parece serlo también para otros análogos (Albertini et al., 2006; Malek et al., 2012; Portugal et al., 2011; Vizcaíno et al., 2012) y el compuesto parental MTA (Jones et al., 1995). El conjunto de genes inhibido por DIG-MSK, incluye una variedad de genes cuyos niveles de expresión se encuentran aumentados en células A2780. Aunque el significado de esta observación debe evaluarse con cautela, los genes sobreexpresados podrían ser una firma molecular del estado transformado de estas células (Barretina et al., 2012), convirtiéndose en potenciales dianas de acción farmacológica en el tratamiento del carcinoma de ovario (The Cancer Genome Atlas Research, 2011).

En células HCT116, cabe destacar que en la determinación del efecto antitranscripcional de las Mitramicinas, encontramos genes afectados tanto por el tratamiento con MSK como por el tratamiento con DIG-MSK (Fig. 13, intersección en los Diagramas de Venn); así como genes afectados en células A2780 tras el tratamiento con 8 nM u 80 nM DIG-MSK (Fig. 22, intersección en los diagramas de Venn). La expresión génica alterada bajo determinadas condiciones experimentales no es sorprendente, porque todos los análogos de la MTA comparten el mismo cromóforo y se unen zonas ricas en C/G en el DNA (Barceló et al., 2010; Mansilla et al., 2010; Remsing et al., 2003). Aunque para las Mitramicinas la afinidad de unión al DNA y la selectividad de las secuencias son en gran medida una propiedad del cromóforo y de sus modificaciones en la cadena lateral (Barceló et al., 2010; Barceló et al., 2007; Mansilla et al., 2010), la modificación en el azúcar E en DIG-MSK (Fig. 4), pudiera estar relacionada con la represión de un gran número de genes por la interferencia de las interacciones entre los factores de transcripción con sus secuencias consenso de unión en el DNA. Además, este cambio estructural podría relacionarse con la mayor actividad farmacológica *in vivo*, determinada mediante ensayos de *hollow fiber* y *xenografts* de tumores humanos en ratones atímicos, como consecuencia de una mejora en la biodisponibilidad del fármaco (Núñez et al., 2012). Existen algunos ejemplos previos de agentes antitumorales en los cuales pequeños cambios en la arquitectura molecular repercuten en diferencias sutiles en

los mecanismos de acción, en los niveles de daño en el DNA o en sus respectivos perfiles farmacológicos, como es el caso de algunas Antraciclinas y Enedinas (Albertini et al., 2006; Minotti et al., 2004; Wang et al., 2008b).

Un total de cinco transcritos resultaron inhibidos significativamente por ambos análogos en las células HCT116 (Fig. 13(A) y 13(B), Tabla 6). Dos de estos genes (*CKS2* y *TFDPI*) carecen de secuencias de unión para Sp1 en su regiones promotoras, por lo cual, el efecto de los análogos de la MTA no puede atribuirse a la interferencia directa de la unión con Sp1. Sin embargo, *CKS2* contiene sitios de unión potencial para NF-Y, NF1 y CREB, factores de transcripción que también reconocen secuencias ricas en C/G (Tabla 10), siendo de este modo, sitios de unión potencial para las Mitramicinas. La sobreexpresión de *CKS2* se ha asociado con una progresión tumoral agresiva y metástasis (Li et al., 2004b; Yu et al., 2013), por lo que representa una diana potencial *in vivo* tanto para MSK como para DIG-MSK. Por otra parte, *TFDPI* contiene, entre otros, tres sitios consenso de unión para N-Myc y un sitio de unión para NF1 y YY1 (Tabla 11). La baja expresión de *TFDPI* tras el tratamiento tanto con DIG-MSK como con MSK, constituye un argumento adicional que explicaría la respuesta celular. El factor de transcripción codificado por *TFDPI* forma parte de la maquinaria transcripcional de genes que participan en la progresión del ciclo celular de fase G1 a fase S (Wu et al., 1996).

El número e identidad de los genes inhibidos por el tratamiento con 8 nM u 80 nM DIG-MSK en células A2780, fue claramente diferente (Fig. 13), obteniéndose un efecto mayor con 80 nM. Un total de 105 genes presentaron nivel de expresión reprimido, independientemente de la concentración de DIG-MSK usada (Fig. 22(A)). A primera vista, esto indicaría que concentraciones nanomolares de DIG-MSK son suficientes para producir efectos específicos sobre la expresión de un número de genes relativamente pequeño, mientras que altas concentraciones (manteniéndose en el rango nanomolar) afectan a un mayor número de genes. En cualquier caso, para obtener el nivel de inhibición transcripcional que hemos observado, podría requerirse la interrupción de la actividad proteínas que se unen DNA, ya sea de manera directa o indirecta. Se ha demostrado mediante el uso de varias técnicas complementarias que tanto MTA como MSK se unen a secuencias muy similares con alta afinidad (Barceló et al., 2010; Barceló et al., 2007; Mansilla et al., 2010; Remsing et al., 2003). Sin embargo, se han descrito diferencias en su efecto sobre la transcripción génica, con un mejor perfil para MSK (Albertini et al., 2006). En general, el tratamiento celular con las

Mitramicinas, de acuerdo al análisis funcional de ontología de los genes, inhibió la expresión de transcritos que participan en apoptosis, mitosis, angiogénesis, regulación de la transcripción y de procesos metabólicos de nucleótidos, así como genes que codifican para proteínas que se unen al DNA (Tablas 9, 16 y 17).

Hemos dedicado nuestra atención fundamentalmente a los genes inhibidos por cada tratamiento, consistente con la idea de que los fármacos que actúan uniéndose al DNA son inhibidores potenciales de la expresión génica. Sin embargo, también observamos la sobreexpresión de diversos genes (Figuras 13(B) y 22(B), Tabla 8). Entre éstos, $p21^{WAF1}/CDKN1A$, que se sobreexpresa con MSK o DIG-MSK en células HCT116, así como en células A2780 tratadas con 8 nM u 80 nM DIG-MSK. El producto del gen $p21^{WAF1}$ es un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, implicada en la parada transitoria de las células en los puntos de control G1 y G2/M del ciclo celular (Sanchez and Dynlacht, 2005). La sobreexpresión de $p21^{WAF1}$ sugiere que el tratamiento con MSK o DIG-MSK no inhibe la unión de Sp1 a su promotor, de acuerdo con otros resultados publicados (Sleiman et al., 2011), que demuestran que el reclutamiento de Sp1 en el promotor proximal de $p21^{WAF1}$ no se ve afectado por el tratamiento con MSK. No obstante, esto está en desacuerdo con previos reportes que demuestran los efectos inhibitorios de MTA sobre la expresión de $p21^{WAF1}$, observando el aumento en el reclutamiento de p53 en el promotor distal de $p21^{WAF1}$ pero bloqueando completamente el reclutamiento de Sp1 en el promotor proximal de $p21^{WAF1}$ (Koutsodontis and Kardassis, 2004).

El gen $p53$ se activa como respuesta al daño en el DNA y es esencial tanto en el control de la muerte celular apoptótica, como en la interrupción reversible de la progresión del ciclo celular en los puntos de control G1/S y G2/M (Giono and Manfredi, 2006; Vogelstein et al., 2000). Su expresión incrementó en ambas líneas celulares tras los tratamientos. La sobrerregulación de $p53$ favorecería la activación transcripcional de $p21^{WAF1}$, consistente con la parada de las células en la fase G1 del ciclo celular, las cuales intentarían reparar el daño ocasionado por las Mitramicinas. Sin embargo, en las células HCT116, disminuyó la expresión de los genes $RAD1$, ATM y $MRE11A$, involucrados en la reparación del DNA (Abraham, 2001; Sarangi et al., 2014; Wang et al., 2014). La acumulación de células HCT116 en la fase G1, también es consistente con la disminución de la expresión de los genes $CDK6$, $CCNE1$ (ciclina E1) y $CCND2$ (ciclina D2) que codifican para proteínas específicas

involucradas en la transición de las células de G1 a S (Ahmad et al., 2001; Sherr and Roberts, 1999).

El aumento observado en la expresión génica puede también ser una consecuencia de efectos indirectos como la respuesta celular al estrés, que variaría en determinados genes que detectan daño celular. En este contexto, solamente después de que los niveles de p53 disminuyeron de una manera dependiente del tiempo (Fig. 16), las células HCT116 que escapaban a la parada en la fase G1 entraron en una mitosis aberrante, dando lugar a células multinucleadas de mayor tamaño (Fig. 11) y culminando en muerte celular apoptótica. La aparición de células multinucleadas podría estar favorecida por la expresión reducida de los genes *DDX1* y *MAD2L1* (Tabla 7), encargados de mantener una adecuada segregación cromosómica durante la mitosis (Michel et al., 2001). Estos genes cuyo perfil de expresión génica resultó alterado tras el tratamiento con ambas moléculas, podrían constituir dianas de acción preferencial. Los niveles proteicos de p53 y p21^{WAF1} analizados tras el tratamiento con DIG-MSK son equivalentes a los inducidos con el tratamiento con MSK (Bataller et al., 2008). Se observó que pasadas 48 horas después de sustituir el medio de cultivo por medio fresco libre de fármaco, las células HCT116 entraban en mitosis (endoreplicación), indicando la presencia de una mitosis aberrante sin citocinesis (Bataller et al., 2008).

La evaluación de la presencia de sitios de unión, para algunos factores de transcripción en los promotores de los genes reprimidos por el tratamiento con las Mitramicinas, reveló que otros factores reconocen también regiones del DNA ricas en C/G (EGR1, E2F, NF-Y, N-Myc y YY1, entre otros) (Tablas 10 y 20). En consecuencia, estos factores pueden competir por dichos sitios de unión con los análogos de MTA, lo que se manifiesta en los cambios observados en el transcriptoma (Figuras 13 y 22). Este hallazgo está de acuerdo con ensayos *in vitro* que demuestran que algunos fármacos bloquean no solamente los complejos Sp1-DNA sino también los complejos E2F1-DNA, inhibiendo de este modo la transcripción génica (Chiang et al., 1998; Portugal et al., 2011).

Sp1 es un miembro de la familia de factores de transcripción Sp, que se unen a regiones ricas en C/G y juega un importante papel en el crecimiento y metástasis de muchos tipos de tumores (Kaur et al., 2011; Safe and Abdelrahim, 2005), así como de un gran número de genes en tejidos normales y tumorales (Safe and Abdelrahim, 2005; Wierstra, 2008). A través de los ensayos de movilidad electroforética (EMSA), se observó que MSK y DIG-MSK

alteraron la unión de Sp1 a un oligonucleótido de doble cadena que contiene la secuencia consenso de unión para dicho factor de transcripción (Fig. 15), con un efecto superior *in vitro* por parte de MSK, que está relacionado con su fuerte unión al DNA (Fernández-Guizán et al., 2014). Sin embargo, los efectos sobre la unión de Sp1 podrían diferir *in vivo* (células en cultivo) si la cantidad de DIG-MSK que entró a las células fue mayor que la de MSK, lo que compensaría en parte la relativa menor afinidad de DIG-MSK por el DNA. Esta hipótesis está de acuerdo con el mayor efecto modulador de la transcripción por DIG-MSK (Figuras 12 y 13). La interferencia de las Mitramicinas con la unión de Sp1 determinada mediante EMSA, es consistente con los experimentos de ChIP realizados en células A2780. Los ensayos de ChIP muestran que Sp1 ocupa sus sitios de unión en los promotores de los genes *XIAP*, *CRABP1*, *MDK* y *KCNMA1* (Fig. 27). Indirectamente esto es una medición de la unión de Sp1 a los promotores. DIG-MSK disminuyó la unión de Sp1 a todos estos genes, con un efecto superior sobre *CRABP1*, que es un gen que se ha relacionado con el desarrollo del carcinoma de ovario (Skubitz et al., 2006) y *KCNMA1*, que se ha asociado con un aumento en la proliferación de células cancerosas (Oeggerli et al., 2012). DIG-MSK también tuvo un efecto evidente en la ocupación por Sp1 del promotor de *MDK*, conocido marcador en cáncer de ovario (Rice et al., 2010) así como de *XIAP*, para quien se ha demostrado que su regulación a la baja induce muerte por apoptosis *in vitro* y prolonga el tiempo de supervivencia de ratones portadores de cáncer de ovario. Este gen pudiera ser una valiosa diana terapéutica a estudiar en detalle (Shaw et al., 2008). Por otra parte, la mayoría de los genes que muestran cambios en la expresión tras los tratamientos participan en algunas de las actividades biológicas consideradas como “*Hallmarks*” del cáncer (Hanahan and Weinberg, 2011).

Aunque la interrupción de las interacciones Sp1-DNA se reconoce como una diana terapéutica (Mansilla and Portugal, 2008; Safe and Abdelrahim, 2005; Wierstra, 2008), los efectos exactos *in vivo* no se pueden determinar con facilidad porque otros miembros de la familia Sp reconocen secuencias similares, pudiendo activar o reprimir la actividad de Sp1 dependiendo del contexto fisiológico (Mansilla et al., 2011; Wierstra, 2008). En cualquier caso, la interferencia y/o competición por la unión de Sp1 a las regiones promotoras podría producir un efecto más específico que el que se obtendría al realizar un *knockdown* de Sp1 en las células (Mansilla et al., 2011).

La MTA se ha caracterizado como un potente agente en la inhibición de la transcripción dirigida por factores de transcripción oncogénicos como es el caso de EWS-

FLI1, un marcador de los tumores de la familia del sarcoma de Ewing (Grohar et al., 2011). Actualmente, esta molécula está siendo reevaluada como tratamiento de varios tipos de tumores, incluyendo el sarcoma (<http://www.ClinicalTrials.gov>; Identificador: NCT01610570). Estos estudios están de acuerdo con la idea de que factores de transcripción diferentes de Sp1 también pueden ser dianas de MTA y de sus análogos. Así, en el cáncer de ovario la elección de genes sobreexpresados como dianas de acción, incluyendo aquellos regulados por Sp1 (Crijns et al., 2009; Kaur et al., 2011), parece ser una estrategia atractiva para inhibir genes asociados con resistencia a otros fármacos (Solar and Sytkowski, 2011).

La construcción de redes de interacción con los genes cuyo nivel de expresión se reprimió por el tratamiento con DIG-MSK en células A2780, mostró que gran parte de ellos son regulados por Sp1. En la red transcripcional obtenida para este factor, los genes *Myc* y *EGR1* que se conoce participan en el desarrollo del cáncer (Albihn et al., 2010), predominan como nodos centrales y exhiben una fuerte interacción con otros genes, incluyendo a *BIRC5*, *E2F1* y algunos miembros de la familia *Sp* (Fig. 25(B), Tabla 21). Estos genes codifican para factores de transcripción considerados como potenciales biomarcadores de diagnóstico en el cáncer de ovario (Crijns et al., 2009; Kaur et al., 2011). Su actividad transcripcional es modulada por DIG-MSK (Tabla 20) como también ocurre en células HCT116 (Vizcaíno et al., 2012). La ruta de activación de señales de transducción para la reparación del DNA, resultó significativamente influenciada por los transcritos cuya sobreexpresión es independiente de la concentración de DIG-MSK usada. La red construida es coherente con los resultados que hemos obtenido a nivel transcripcional y a nivel proteico para ambas líneas celulares evaluadas. En ella se distinguen dos *clusters* bien definidos, destacando como nodos centrales los genes *p53* y *p21^{WAF1}/CDKN1A*, quienes se relacionan estrechamente con genes que forman parte del control del ciclo celular como es el caso de PCNA (Kaufmann and Paules, 1996).

Al margen de la especificidad existente en la interacción entre MSK o DIG-MSK con los promotores de los genes, la capacidad de estos componentes para reconocer distintas secuencias de nucleótidos (entre 4-5 pb) y de desplazar los factores de transcripción de sus sitios de unión potencial, depende del equilibrio dinámico entre el fármaco y sus secuencias consenso de unión; así como del estado de la cromatina (accesibilidad al DNA) de un gen en particular durante el tratamiento farmacológico. Referente a esto, una dificultad importante en la interpretación de los datos de expresión génica resultantes de la intervención

quimioterapéutica, es la evaluación y diferenciación de los cambios transcripcionales que surgen por la competición directa de cada fármaco con los factores de transcripción en un promotor en particular. Por ejemplo, como hemos visto, la sobreexpresión de $p21^{WAF1}$ por el tratamiento de células HCT116 y A2780 es independiente de la presencia de elementos de unión a Sp1 en su promotor, pese a que se conoce que las interacciones funcionales entre Sp1 con el promotor proximal y la unión de elementos *enhancer* al promotor distal, gobiernan la actividad del promotor de $p21^{WAF1}$ en condiciones basales o inducibles (Koutsodontis et al., 2002).

El análisis mediante el *clustering* de un conjunto de genes que mostró expresión alterada tras el tratamiento con DIG-MSK en células A2780 (Fig. 24), indicó que los sitios de unión potencial para Sp1, que a su vez son también sitios de unión potencial para los análogos de la MTA (Fernández-Guizán et al., 2014; Portugal et al., 2011), juegan un papel central tanto en la sobreexpresión como en la represión de genes. Llama la atención el comportamiento transcripcional de dos genes, *GRN* (*granulin epithelium precursor*) y *KCNMA1*. El gen *GRN* aumenta su expresión tras el tratamiento con 8 nM pero disminuye con 80 nM, este resultado es de un marcado interés teniendo en cuenta que este gen ha sido caracterizado como un marcador pronóstico en cáncer de ovario (Davidson et al., 2004). Por su parte, *KCNMA1* pese a que fue fuertemente inhibido por 80 nM DIG-MSK y a que se agrupó dentro del *cluster* de genes reprimidos por cualquiera de las dos concentraciones de DIG-MSK evaluadas (8 nM y 80 nM), se encuentra en el extremo del *cluster* “F” (véase la Fig. 24), lo que remarca peculiaridades de la expresión génica en presencia de DIG-MSK. La represión transcripcional de *KCNMA1* es interesante, ya que su expresión está asociada con proliferación celular y mal pronóstico en cáncer (Oeggerli et al., 2012).

Usando modelos con *xenograft* de cáncer pancreático de origen humano en ratones, se ha estudiado el efecto antiangiogénico del anticuerpo Bevacizumab, que neutraliza al factor VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), y de la MTA (Jia et al., 2007). La administración de Bevacizumab o de MTA por separado generó una actividad antitumoral reducida, mientras que la administración de la combinación de ambos componentes, produjo un efecto antitumoral sinérgico sin aumentar la citotoxicidad observada para cada molécula por separado (Jia et al., 2007). En este contexto, las mejoras en la utilidad terapéutica que ha demostrado tener la Mitramicina DIG-MSK, especialmente por su papel antiangiogénico sumado a su baja toxicidad (Fernández-Guizán et al., 2014; Núñez et al., 2012), son claves

para considerar el uso de este nuevo análogo en la optimización del sinergismo con otras moléculas de acción antitumoral.

A lo largo de esta tesis, se ha demostrado, tanto directa como indirectamente, que Sp1 está involucrado en la regulación de genes cuya expresión es alterada por MSK y DIG-MSK en células HCT116 y/o A2780. Las diferencias en el efecto inhibitorio de 8 nM y 80 nM DIG-MSK en células A2780, indicaría diferencias en la capacidad de desplazar a Sp1 de determinadas secuencias consenso ricas en C/G en las regiones promotoras. *KCNMA1* nos provee de un ejemplo ilustrativo pues modificó su tasa transcripcional de manera dependiente de la concentración de DIG-MSK, tendiendo a una manifiesta reducción de su expresión en presencia de la concentración más alta de este fármaco (Fig. 24). Dado que Sp1 está sobreexpresado en células cancerígenas (Safe and Abdelrahim, 2005), la disminución de sus niveles proteicos tras el tratamiento con DIG-MSK (Fig. 28) podría resultar en la remisión tumoral.

El tratamiento de células de carcinoma de colon y ovario con dosis nanomolares de DIG-MSK, tiene un amplio efecto sobre la expresión de genes regulados principalmente por el factor de transcripción Sp1, convirtiendo su interacción con el DNA en una diana principal para esta molécula. Adicionalmente, hemos encontrado varios genes cuya expresión es más susceptible al tratamiento antitumoral. Podría ser de interés considerarlos para futuros experimentos encaminados a investigar nuevas dianas para el tratamiento de los cánceres de colon y ovario. Por otra parte, los análisis masivos de expresión génica, como los aquí estudiados, podrían ser indispensables para promover el desarrollo de nuevos análogos de la MTA como fármacos clínicamente útiles. En consecuencia, la nueva Mitramicina DIG-MSK es un buen candidato para el desarrollo de ensayos pre-clínicos, en cuanto ha mostrado, de acuerdo a todos nuestros análisis, un elevado efecto antitumoral, el cual estaría acompañado por una baja toxicidad (Núñez et al., 2012).

6. CONCLUSIONES

1. Las nuevas Mitramicinas MSK y DIG-MSK, inhiben eficazmente el crecimiento y la proliferación de células humanas HCT116 de carcinoma de colon y A2780 de carcinoma de ovario.
2. Los experimentos de cuantificación de la expresión génica demuestran que MSK y DIG-MSK actúan como moduladores transcripcionales en células en cultivo.
3. Los genes afectados por el tratamiento con MSK y DIG-MSK participan en procesos biológicos y funciones moleculares relacionadas con la transcripción y su regulación celular, incluyendo la actividad de factores de transcripción. Los cambios en la expresión génica se correlacionan plenamente con la alteración observada en los niveles proteicos.
4. Los efectos de MSK y DIG-MSK sobre la transcripción génica se deben, principalmente, a la competición con el factor de transcripción Sp1 por sus sitios de unión potencial en los promotores génicos. Sp1 regula la mayoría de los genes reprimidos por ambos fármacos así como de los genes sobreexpresados; estos últimos están fundamentalmente relacionados con la respuesta a condiciones de estrés.
5. MSK y DIG-MSK modulan la expresión génica activada por otros factores de transcripción tales como CREB, E2F y EGR1, que se unen también a regiones del DNA ricas en C/G.
6. El tratamiento con los nuevos análogos de la MTA induce una parada en la fase G1 del ciclo celular que es dependiente de p53, seguida por muerte celular apoptótica. Las células HCT116 que escapan a este punto de control, aumentan su tamaño y número de núcleos tras entrar en una mitosis aberrante.
7. MSK y DIG-MSK alteran la unión de Sp1 al DNA *in vitro* en células HCT116, con un mayor efecto de la MSK. Los experimentos de ChIP demuestran que DIG-MSK desplaza a Sp1 de sus sitios de unión *in vivo* (células A2780 en cultivo), en las

regiones promotoras de *XIAP*, *CRABP1*, *MDK* y *KCNMA1*; genes que están relacionados con la progresión tumoral.

8. La interferencia de los nuevos fármacos sobre la unión de factores de transcripción, especialmente Sp1, a promotores génicos, nos provee de una “*proof-of-concept*” sobre el mecanismo de acción de estas moléculas, que junto a su perfil farmacológico mejorado, especialmente para DIG-MSK, nos permite “aventurar” su próxima entrada en pruebas pre-clínicas.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15, 2177-2196.

Ahmad, N., Adhami, V.M., Afaq, F., Feyes, D.K., and Mukhtar, H. (2001). Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin Cancer Res* 7, 1466-1473.

Albertini, V., Jain, A., Vignati, S., Napoli, S., Rinaldi, A., Kwee, I., Nur-e-Alam, M., Bergant, J., Bertoni, F., Carbone, G.M., et al. (2006). Novel GC-rich DNA-binding compound produced by a genetically engineered mutant of the mithramycin producer *Streptomyces argillaceus* exhibits improved transcriptional repressor activity: implications for cancer therapy. *Nucleic Acids Res* 34, 1721-1734.

Albihn, A., Johnsen, J.I., and Henriksson, M.A. (2010). MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Adv Cancer Res* 107, 163-224.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.

Banchio, C., Schang, L.M., and Vance, D.E. (2004). Phosphorylation of Sp1 by cyclin-dependent kinase 2 modulates the role of Sp1 in CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha regulation during the S phase of the cell cycle. *J Biol Chem* 279, 40220-40226.

Barakat, B.M., Wang, Q.E., Han, C., Milum, K., Yin, D.T., Zhao, Q., Wani, G., Arafa el, S.A., El-Mahdy, M.A., and Wani, A.A. (2010). Overexpression of DDB2 enhances the sensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin by augmenting cellular apoptosis. *Int J Cancer* 127, 977-988.

Barceló, F., Ortiz-Lombardia, M., Martorell, M., Oliver, M., Mendez, C., Salas, J.A., and Portugal, J. (2010). DNA binding characteristics of mithramycin and chromomycin analogues obtained by combinatorial biosynthesis. *Biochemistry* 49, 10543-10552.

Barceló, F., Scotta, C., Ortiz-Lombardía, M., Méndez, C., Salas, J.A., and Portugal, J. (2007). Entropically-driven binding of mithramycin in the minor groove of C/G-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 35, 2215-2226.

Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., Wilson, C.J., Lehar, J., Kryukov, G.V., Sonkin, D., et al. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603-607.

Bataller, M., Méndez, C., Salas, J.A., and Portugal, J. (2008). Mithramycin SK modulates polyploidy and cell death in colon carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 7, 2988-2997.

Behrens, B.C., Hamilton, T.C., Masuda, H., Grotzinger, K.R., Whang-Peng, J., Louie, K.G., Knutsen, T., McKoy, W.M., Young, R.C., and Ozols, R.F. (1987). Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res* 47, 414-418.

- Bellorini, M., Moncollin, V., D'Incalci, M., Mongelli, N., and Mantovani, R. (1995). Distamycin A and tallimustine inhibit TBP binding and basal in vitro transcription. *Nucleic Acids Res* 23, 1657-1663.
- Borukhov, S., and Nudler, E. (2008). RNA polymerase: the vehicle of transcription. *Trends Microbiol* 16, 126-134.
- Bosco, G. (2010). Cell cycle: Retinoblastoma, a trip organizer. *Nature* 466, 1051-1052.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brattain, M.G., Marks, M.E., McCombs, J., Finely, W., and Brattain, D.E. (1983). Characterization of human colon carcinoma cell lines isolated from a single primary tumour. *Brit J Cancer* 47, 373-381.
- Briggs, M.R., Kadonaga, J.T., Bell, S.P., and Tjian, R. (1986). Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* 234, 47-52.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1501.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., and Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21, 2933-2942.
- Cole, S.W., Yan, W., Galic, Z., Arevalo, J., and Zack, J.A. (2005). Expression-based monitoring of transcription factor activity: the TELiS database. *Bioinformatics* 21, 803-810.
- Crijns, A.P., Fehrmann, R.S., de Jong, S., Gerbens, F., Meersma, G.J., Klip, H.G., Hollema, H., Hofstra, R.M., te Meerman, G.J., de Vries, E.G., et al. (2009). Survival-related profile, pathways, and transcription factors in ovarian cancer. *PLoS Med* 6, e24.
- Chen, E.Y., Tan, C.M., Kou, Y., Duan, Q., Wang, Z., Meirelles, G.V., Clark, N.R., and Ma'ayan, A. (2013). Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14, 128.
- Chiang, S.Y., Azizkhan, J.C., and Beerman, T.A. (1998). A comparison of DNA-binding drugs as inhibitors of E2F1- and Sp1-DNA complexes and associated gene expression. *Biochemistry* 37, 3109-3115.
- Chiang, S.Y., Welch, J.J., Rauscher, F.J., 3rd, and Beerman, T.A. (1996). Effect of DNA-binding drugs on early growth response factor-1 and TATA box-binding protein complex formation with the herpes simplex virus latency promoter. *J Biol Chem* 271, 23999-24004.
- Davidson, B., Alejandro, E., Florenes, V.A., Goderstad, J.M., Risberg, B., Kristensen, G.B., Trope, C.G., and Kohn, E.C. (2004). Granulin-epithelin precursor is a novel prognostic marker in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 100, 2139-2147.

- Degterev, A., and Yuan, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 378-390.
- DeVita, V.T.Jr., Hellman, S., and Rosenberg, S.A. (2005). *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, (Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins).
- Doyle, A., and Griffiths, J.B. (1998). *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology* (John Wiley & Sons, Ltd, USA).
- Duverger, V., Murphy, A.M., Sheehan, D., England, K., Cotter, T.G., Hayes, I., and Murphy, F.J. (2004). The anticancer drug mithramycin A sensitises tumour cells to apoptosis induced by tumour necrosis factor (TNF). *Brit J Cancer* 90, 2025-2031.
- Eick, D., Wedel, A., and Heumann, H. (1994). From initiation to elongation: comparison of transcription by prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases. *Trends Genet* 10, 292-296.
- Ewen, M.E. (2000). Where the cell cycle and histones meet. *Genes Dev* 14, 2265-2270.
- Fernández-Guizán, A., Mansilla, S., Barceló, F., Vizcaíno, C., Núñez, L.E., Morís, F., González, S., and Portugal, J. (2014). The activity of a novel mithramycin analog is related to its binding to DNA, cellular accumulation, and inhibition of Sp1-driven gene transcription. *Chem Biol Interact* 219, 123-132.
- Fuda, N.J., Ardehali, M.B., and Lis, J.T. (2009). Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature* 461, 186-192.
- Ganier, O., and Mechali, M. (2008). New cell or new cycle? *Genes Dev* 22, 2908-2913.
- Ghosh, S., Majumder, P., Pradhan, S.K., and Dasgupta, D. (2010). Mechanism of interaction of small transcription inhibitors with DNA in the context of chromatin and telomere. *Biochim Biophys Acta* 1799, 795-809.
- Gilmore, T.D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680-6684.
- Giono, L.E., and Manfredi, J.J. (2006). The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J Cell Physiol* 209, 13-20.
- Gniazdowski, M., Denny, W.A., Nelson, S.M., and Czyz, M. (2005). Effects of anticancer drugs on transcription factor-DNA interactions. *Expert Opin Ther Targets* 9, 471-489.
- Gottesfeld, J.M., Turner, J.M., and Dervan, P.B. (2000). Chemical approaches to control gene expression. *Gene Expr* 9, 77-91.
- Grivas, P.D., Kiaris, H., and Papavassiliou, A.G. (2011). Tackling transcription factors: challenges in antitumor therapy. *Trends Mol Med* 17, 537-538.

- Grohar, P.J., Woldemichael, G.M., Griffin, L.B., Mendoza, A., Chen, Q.R., Yeung, C., Currier, D.G., Davis, S., Khanna, C., Khan, J., et al. (2011). Identification of an inhibitor of the EWS-FLI1 oncogenic transcription factor by high-throughput screening. *J Natl Cancer Inst* 103, 962-978.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88.
- Haggar, F.A., and Boushey, R.P. (2009). Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg* 22, 191-197.
- Hall, M., Gourley, C., McNeish, I., Ledermann, J., Gore, M., Jayson, G., Perren, T., Rustin, G., and Kaye, S. (2013). Targeted anti-vascular therapies for ovarian cancer: current evidence. *Brit J Cancer* 108, 250-258.
- Hamilton, T.C., Young, R.C., and Ozols, R.F. (1984). Experimental model systems of ovarian cancer: applications to the design and evaluation of new treatment approaches. *Semin Oncol* 11, 285-298.
- Harper, J.W., Burton, J.L., and Solomon, M.J. (2002). The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* 16, 2179-2206.
- Hennessy, B.T., Coleman, R.L., and Markman, M. (2009). Ovarian cancer. *Lancet* 374, 1371-1382.
- Herbert, K.M., Greenleaf, W.J., and Block, S.M. (2008). Single-molecule studies of RNA polymerase: motoring along. *Annu Rev Biochem* 77, 149-176.
- Hurley, L.H. (2002). DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2, 188-200.
- Israels, E.D., and Israels, L.G. (2001). The cell cycle. *Stem Cells* 19, 88-91.
- Jia, Z., Zhang, J., Wei, D., Wang, L., Yuan, P., Le, X., Li, Q., Yao, J., and Xie, K. (2007). Molecular basis of the synergistic antiangiogenic activity of bevacizumab and mithramycin A. *Cancer Res* 67, 4878-4885.
- Jones, D.E., Jr., Cui, D.M., and Miller, D.M. (1995). Expression of beta-galactosidase under the control of the human c-myc promoter in transgenic mice is inhibited by mithramycin. *Oncogene* 10, 2323-2330.
- Jones, K.T. (2004). Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol Hum Reprod* 10, 1-5.
- Juven-Gershon, T., and Kadonaga, J.T. (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol* 339, 225-229.
- Kabe, Y., Yamada, J., Uga, H., Yamaguchi, Y., Wada, T., and Handa, H. (2005). NF-Y is essential for the recruitment of RNA polymerase II and inducible transcription of several CCAAT box-containing genes. *Mol Cell Biol* 25, 512-522.

- Kaufmann, W.K., and Paules, R.S. (1996). DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J* 10, 238-247.
- Kaur, M., MacPherson, C.R., Schmeier, S., Narasimhan, K., Choolani, M., and Bajic, V.B. (2011). In Silico discovery of transcription factors as potential diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *BMC Syst Biol* 5, 144.
- Kigawa, J. (2013). New strategy for overcoming resistance to chemotherapy of ovarian cancer. *Yonago Acta Med* 56, 43-50.
- Kong, D., Park, E.J., Stephen, A.G., Calvani, M., Cardellina, J.H., Monks, A., Fisher, R.J., Shoemaker, R.H., and Melillo, G. (2005). Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity. *Cancer Res* 65, 9047-9055.
- Koutsodontis, G., and Kardassis, D. (2004). Inhibition of p53-mediated transcriptional responses by mithramycin A. *Oncogene* 23, 9190-9200.
- Koutsodontis, G., Moustakas, A., and Kardassis, D. (2002). The role of Sp1 family members, the proximal GC-rich motifs, and the upstream enhancer region in the regulation of the human cell cycle inhibitor p21WAF-1/Cip1 gene promoter. *Biochemistry* 41, 12771-12784.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, K., Qian, D.Z., Rey, S., Wei, H., Liu, J.O., and Semenza, G.L. (2009). Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 2353-2358.
- Li, L., He, S., Sun, J.M., and Davie, J.R. (2004a). Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochem Cell Biol* 82, 460-471.
- Li, M., Lin, Y.M., Hasegawa, S., Shimokawa, T., Murata, K., Kameyama, M., Ishikawa, O., Katagiri, T., Tsunoda, T., Nakamura, Y., et al. (2004b). Genes associated with liver metastasis of colon cancer, identified by genome-wide cDNA microarray. *Int J Oncol* 24, 305-312.
- Lim, C.Y., Santoso, B., Boulay, T., Dong, E., Ohler, U., and Kadonaga, J.T. (2004). The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II. *Genes Dev* 18, 1606-1617.
- Lombó, F., Menéndez, N., Salas, J.A., and Méndez, C. (2006). The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol* 73, 1-14.
- Lowe, S.W., Bodis, S., McClatchey, A., Remington, L., Ruley, H.E., Fisher, D.E., Housman, D.E., and Jacks, T. (1994). p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 266, 807-810.
- Machida, Y.J., and Dutta, A. (2005). Cellular checkpoint mechanisms monitoring proper initiation of DNA replication. *J Biol Chem* 280, 6253-6256.

Malek, A., Núñez, L.E., Magistri, M., Brambilla, L., Jovic, S., Carbone, G.M., Morís, F., and Catapano, C.V. (2012). Modulation of the activity of Sp transcription factors by mithramycin analogues as a new strategy for treatment of metastatic prostate cancer. *PLoS One* 7, e35130.

Mann, M.J. (2005). Transcription factor decoys: a new model for disease intervention. *Ann NY Acad Sci* 1058, 128-139.

Mansilla, S., Garcia-Ferrer, I., Mendez, C., Salas, J.A., and Portugal, J. (2010). Differential inhibition of restriction enzyme cleavage by chromophore-modified analogues of the antitumour antibiotics mithramycin and chromomycin reveals structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 79, 1418-1427.

Mansilla, S., Llovera, L., and Portugal, J. (2012). Chemotherapeutic targeting of cell death pathways. *Anticancer Agents Med Chem* 12, 226-238.

Mansilla, S., and Portugal, J. (2008). Sp1 transcription factor as a target for anthracyclines: effects on gene transcription. *Biochimie* 90, 976-987.

Mansilla, S., Priebe, W., and Portugal, J. (2011). Changes in gene expression induced by Sp1 knockdown differ from those caused by challenging Sp1 binding to gene promoters. *Biochim Biophys Acta* 1809, 327-336.

Mellor, J., Dudek, P., and Clynes, D. (2008). A glimpse into the epigenetic landscape of gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* 18, 116-122.

Michel, L.S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P.K., Murty, V.V., and Benezra, R. (2001). MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* 409, 355-359.

Miller, M.E., and Cross, F.R. (2001). Cyclin specificity: how many wheels do you need on a unicycle? *J Cell Sci* 114, 1811-1820.

Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., and Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 56, 185-229.

Minuzzo, M., Marchini, S., Broggin, M., Faircloth, G., D'Incalci, M., and Mantovani, R. (2000). Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 6780-6784.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.

Nickols, N.G., Jacobs, C.S., Farkas, M.E., and Dervan, P.B. (2007). Modulating hypoxia-inducible transcription by disrupting the HIF-1-DNA interface. *ACS Chem Biol* 2, 561-571.

Nicolás, M., Noé, V., and Ciudad, C.J. (2003). Transcriptional regulation of the human Sp1 gene promoter by the specificity protein (Sp) family members nuclear factor Y (NF-Y) and E2F. *Biochem J* 371, 265-275.

Noé, V., Alemany, C., Chasin, L.A., and Ciudad, C.J. (1998). Retinoblastoma protein associates with SP1 and activates the hamster dihydrofolate reductase promoter. *Oncogene* 16, 1931-1938.

Novina, C.D., and Roy, A.L. (1996). Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet* 12, 351-355.

Núñez, L.E., Nybo, S.E., Gonzalez-Sabin, J., Perez, M., Menéndez, N., Braña, A.F., Shaaban, K.A., He, M., Moris, F., Salas, J.A., et al. (2012). A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis. *J Med Chem* 55, 5813-5825.

Oeggerli, M., Tian, Y., Ruiz, C., Wijker, B., Sauter, G., Obermann, E., Guth, U., Zlobec, I., Sausbier, M., Kunzelmann, K., et al. (2012). Role of KCNMA1 in breast cancer. *PLoS One* 7, e41664.

Ohler, U., Liao, G.C., Niemann, H., and Rubin, G.M. (2002). Computational analysis of core promoters in the *Drosophila* genome. *Genome Biol* 3, research0087-0087.12.

Oleaga, C., Welten, S., Belloc, A., Solé, A., Rodriguez, L., Mencia, N., Selga, E., Tapias, A., Noe, V., and Ciudad, C.J. (2012). Identification of novel Sp1 targets involved in proliferation and cancer by functional genomics. *Biochem Pharmacol* 84, 1581-1591.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.

Phillips, A., Darley, M., and Blaydes, J.P. (2006). GC-selective DNA-binding antibiotic, mithramycin A, reveals multiple points of control in the regulation of Hdm2 protein synthesis. *Oncogene* 25, 4183-4193.

Poon, I.K., Hulett, M.D., and Parish, C.R. (2010). Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ* 17, 381-397.

Portugal, J. (2009). Evaluation of molecular descriptors for antitumor drugs with respect to noncovalent binding to DNA and antiproliferative activity. *BMC Pharmacol* 9, 11.

Portugal, J., Bataller, M., and Mansilla, S. (2009). Cell death pathways in response to antitumor therapy. *Tumori* 95, 409-421.

Portugal, J., Mansilla, S., and Bataller, M. (2010). Mechanisms of drug-induced mitotic catastrophe in cancer cells. *Curr Pharm Des* 16, 69-78.

Portugal, J., Mansilla, S., Vizcaíno, C., and Barceló, F. (2011). Promoter-specific transcriptional interference by DNA-binding drugs. In: *Recent Research Development in Biochemistry (Kerala: Research Signpost)*, vol. 8, pp. 45-63.

Priebe, W., Fokt, I., Przewloka, T., Chaires, J.B., Portugal, J., and Trent, J.O. (2001). Exploiting anthracycline scaffold for designing DNA-targeting agents. *Methods Enzymol* 340, 529-555.

Proskuryakov, S.Y., and Gabai, V.L. (2010). Mechanisms of tumor cell necrosis. *Curr Pharm Des* 16, 56-68.

Reimer, D., Hubalek, M., Riedle, S., Skvortsov, S., Erdel, M., Concin, N., Fiegl, H., Muller-Holzner, E., Marth, C., Illmensee, K., et al. (2010). E2F3a is critically involved in epidermal growth factor receptor-directed proliferation in ovarian cancer. *Cancer Res* 70, 4613-4623.

Remsing, L.L., González, A.M., Nur-e-Alam, M., Fernandez-Lozano, M.J., Braña, A.F., Rix, U., Oliveira, M.A., Mendez, C., Salas, J.A., and Rohr, J. (2003). Mithramycin SK, a novel antitumor drug with improved therapeutic index, mithramycin SA, and demycarosyl-mithramycin SK: three new products generated in the mithramycin producer *Streptomyces argillaceus* through combinatorial biosynthesis. *J Am Chem Soc* 125, 5745-5753.

Revyakin, A., Liu, C., Ebright, R.H., and Strick, T.R. (2006). Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching. *Science* 314, 1139-1143.

Ricci, M.S., and Zong, W.X. (2006). Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist* 11, 342-357.

Rice, G.E., Edgell, T.A., and Autelitano, D.J. (2010). Evaluation of midkine and anterior gradient 2 in a multimarker panel for the detection of ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 29:62., 10.

Roninson, I.B. (2003). Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* 63, 2705-2715.

Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., et al. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* 34, 374-378.

Safe, S., and Abdelrahim, M. (2005). Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer* 41, 2438-2448.

Sakata-Sogawa, K., and Shimamoto, N. (2004). RNA polymerase can track a DNA groove during promoter search. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 14731-14735.

Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual* (New York: Cold Spring Harbour Lab).

Sanchez, I., and Dynlacht, B.D. (2005). New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol* 16, 311-321.

Sandelin, A., Carninci, P., Lenhard, B., Ponjavic, J., Hayashizaki, Y., and Hume, D.A. (2007). Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet* 8, 424-436.

Santangelo, T.J., and Roberts, J.W. (2004). Forward translocation is the natural pathway of RNA release at an intrinsic terminator. *Mol Cell* 14, 117-126.

Sarangi, P., Bartosova, Z., Altmannova, V., Holland, C., Chavdarova, M., Lee, S.E., Krejci, L., and Zhao, X. (2014). Sumoylation of the Rad1 nuclease promotes DNA repair and regulates its DNA association. *Nucleic Acids Res* 42, 6393-6404.

Schaefer, C.F., Anthony, K., Krupa, S., Buchoff, J., Day, M., Hannay, T., and Buetow, K.H. (2009). PID: the Pathway Interaction Database. *Nucleic Acids Res* 37, D674-679.

Schroy, P.C., 3rd, Brown-Shimer, S., Kim, K., Johnson, K.A., Murnane, M.J., Yang, S., O'Brien, M.J., Carney, W.P., and Kupchik, H.Z. (1995). Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer* 76, 201-209.

Shaw, T.J., Lacasse, E.C., Durkin, J.P., and Vanderhyden, B.C. (2008). Downregulation of XIAP expression in ovarian cancer cells induces cell death in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 122, 1430-1434.

Shen, H.M., and Codogno, P. (2011). Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* 7, 457-465.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.

Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., and Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64, 9-29.

Skubitz, A.P., Pambuccian, S.E., Argenta, P.A., and Skubitz, K.M. (2006). Differential gene expression identifies subgroups of ovarian carcinoma. *J Lab Clin Med* 148, 223-248.

Sleiman, S.F., Langley, B.C., Basso, M., Berlin, J., Xia, L., Payappilly, J.B., Kharel, M.K., Guo, H., Marsh, J.L., Thompson, L.M., et al. (2011). Mithramycin is a gene-selective Sp1 inhibitor that identifies a biological intersection between cancer and neurodegeneration. *J Neurosci* 31, 6858-6870.

Smale, S.T., and Kadonaga, J.T. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem* 72, 449-479.

Solar, P., and Sytkowski, A.J. (2011). Differentially expressed genes associated with cisplatin resistance in human ovarian adenocarcinoma cell line A2780. *Cancer Lett* 309, 11-18.

Spengler, M.L., and Brattain, M.G. (2006). Sumoylation inhibits cleavage of Sp1 N-terminal negative regulatory domain and inhibits Sp1-dependent transcription. *J Biol Chem* 281, 5567-5574.

Sridhar, J., Akula, N., and Pattabiraman, N. (2006). Selectivity and potency of cyclin-dependent kinase inhibitors. *AAPS J* 8, E204-221.

Stemmann, O., Gorr, I.H., and Boos, D. (2006). Anaphase topsy-turvy: Cdk1 a securin, separase a CKI. *Cell Cycle* 5, 11-13.

Tapias, A., Ciudad, C.J., Roninson, I.B., and Noé, V. (2008). Regulation of Sp1 by cell cycle related proteins. *Cell Cycle* 7, 2856-2867.

The Cancer Genome Atlas Research Network. (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474, 609-615.

Thomas, M.C., and Chiang, C.M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol* 41, 105-178.

- Thomas, P.D., Campbell, M.J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., and Narechania, A. (2003). PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res* 13, 2129-2141.
- Toulokhonov, I., Artsimovitch, I., and Landick, R. (2001). Allosteric control of RNA polymerase by a site that contacts nascent RNA hairpins. *Science*. 292, 730-733.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39-51.
- Vizcaíno, C., Mansilla, S., Núñez, L.E., Méndez, C., Salas, J.A., Morís, F., and Portugal, J. (2012). Novel mithramycins abrogate the involvement of protein factors in the transcription of cell cycle control genes. *Biochem Pharmacol* 84, 1133-1142.
- Vlaminck, B., Toffoli, S., Ghislain, B., Demazy, C., Raes, M., and Michiels, C. (2007). Dual effect of echinomycin on hypoxia-inducible factor-1 activity under normoxic and hypoxic conditions. *FEBS J* 274, 5533-5542.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- Wang, L., Guan, X., Zhang, J., Jia, Z., Wei, D., Li, Q., Yao, J., and Xie, K. (2008a). Targeted inhibition of Sp1-mediated transcription for antiangiogenic therapy of metastatic human gastric cancer in orthotopic nude mouse models. *Int J Oncol* 33, 161-167.
- Wang, Q., Goldstein, M., Alexander, P., Wakeman, T.P., Sun, T., Feng, J., Lou, Z., Kastan, M.B., and Wang, X.F. (2014). Rad17 recruits the MRE11-RAD50-NBS1 complex to regulate the cellular response to DNA double-strand breaks. *EMBO J* 33, 862-877.
- Wang, X., Cheung, H.W., Chun, A.C., Jin, D.Y., and Wong, Y.C. (2008b). Mitotic checkpoint defects in human cancers and their implications to chemotherapy. *Front Biosci* 13, 2103-2114.
- Waring, M.J. (1981). DNA modification and cancer. *Annu Rev Biochem* 50, 159-192.
- Weinzierl, R. (1999). *Mechanisms of gene expression* (London: Imperial College Press).
- Welch, J.J., Rauscher, F.J., 3rd, and Beerman, T.A. (1994). Targeting DNA-binding drugs to sequence-specific transcription factor-DNA complexes. Differential effects of intercalating and minor groove binding drugs. *J Biol Chem* 269, 31051-31058.
- Wierstra, I. (2008). Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun* 372, 1-13.
- Wilkinson, M.G., and Millar, J.B. (2000). Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J* 14, 2147-2157.
- Wilson, K.S., Conant, C.R., and von Hippel, P.H. (1999). Determinants of the stability of transcription elongation complexes: interactions of the nascent RNA with the DNA template and the RNA polymerase. *J Mol Biol* 289, 1179-1194.

Wu, C.L., Classon, M., Dyson, N., and Harlow, E. (1996). Expression of dominant-negative mutant DP-1 blocks cell cycle progression in G1. *Mol Cell Biol* 16, 3698-3706.

Yan, C., and Higgins, P.J. (2013). Drugging the undruggable: transcription therapy for cancer. *Biochim Biophys Acta* 1835, 76-85.

Yu, M., Zhong, M., and Qiao, Z. (2013). Expression and clinical significance of cyclin kinase subunit 2 in colorectal cancer. *Oncol Lett* 6, 777-780.

Zhang, Q., Stovall, D.B., Inoue, K., and Sui, G. (2011). The oncogenic role of Yin Yang 1. *Crit Rev Oncog* 16, 163-197.

ANEXOS.



Review Article

Recent Res.Devel.Biochem., 8(2011): 45-63 ISBN: 978-81-308-0215-2

3

Promoter-specific transcriptional interference by DNA-binding drugs

José Portugal¹, Sylvia Mansilla¹, Carolina Vizcaino¹
and Francisca Barceló²

¹Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de Barcelona E-08028 Barcelona, Spain; ²Departament de Biologia Fundamental i Ciències de Salut, Universitat de les Illes Balears, E-07122 Palma de Mallorca, Spain

Abstract

The regulation of transcription plays a critical role in the control of cell growth of normal and cancer cells. Small DNA-binding drugs that interfere with DNA-protein interactions can inhibit gene expression. The selective inhibition of the complexes formed between transcription factors and DNA can be a way to abolish the expression of target genes, especially those that are over-expressed in some cancers or under other pathologic states. This can be attained by drugs that might compete with certain transcription factors for their putative binding sites in promoters, or by impairing transcription factor activity through modification of the protein factors or their complexes. Here, we summarize general and recent

advances in the understanding of the mechanisms involved in the specific interference of the interaction between transcription factors and gene promoters by small molecules. Deeper emphasis is given to natural antibiotic molecules, though some relevant results about molecules obtained through synthetic approaches are also highlighted. The information available about the molecular structure and mechanisms of action of both transcription factors and DNA-binding agents, together with the new opportunities provided by functional genomics, should hopefully help us in the development of new more-selective antitumor drugs.

Introduction

Regulation of gene expression plays a central role in the complex network of activities that dictate the proper function of living cells. Gene regulation is primarily attained at the transcriptional level by the interaction between proteins known as transcription factors and promoter regions [1].

Transcriptional regulation can affect the course of several pathological states including cancer. Therefore, the understanding of changes in gene expression that occur during oncogenesis is of crucial importance for the designing of new antitumor agents [2]. Many anticancer drugs in clinical use are considered to exert their activity by binding to DNA [3-5]. DNA-binding drugs displaying sequence selectivity can exhibit differential effects on the interactions between gene promoter regions and a variety of transcription factors [2, 6-8] (Fig. 1). In many basal promoters, RNA polymerase II is recruited, together with other general protein factors, by TFIID through stable binding to the promoter region known as TATA box [1, 9], yet it has to be mentioned that there are many TATA-less genes also involved in gene expression that require a set of factors different from those for the TATA box [10]. Regulated transcription initiation is largely governed by specific transcription factors that help to assemble the transcription complex, while the binding of transcription factors to their DNA target sites is essential for proper regulation of transcription (Fig. 1). Selectively inhibiting the formation of DNA-transcription factor complexes may therefore abolish expression of a target gene.

In this review, we will mainly examine natural DNA-binding antibiotics that compete with the binding of transcription factors to their putative sequences in gene promoters. Besides, we also provide some insights into some natural and semi-synthetic analogues of those antibiotics. Needless to say, natural DNA-binding drugs are just a few of the plethora of molecules that have been characterized in recent years aimed at targeting transcription events and transcription factors, see Refs. [2, 4, 7, 8, 11, 12] and references therein. Moreover, we do not review here anticancer agents which indirectly influence the interaction of transcription factors through chemical modifications of the protein factors, or the chromatin organization of potential target genes, such as histone deacetylases or protein kinase inhibitors.

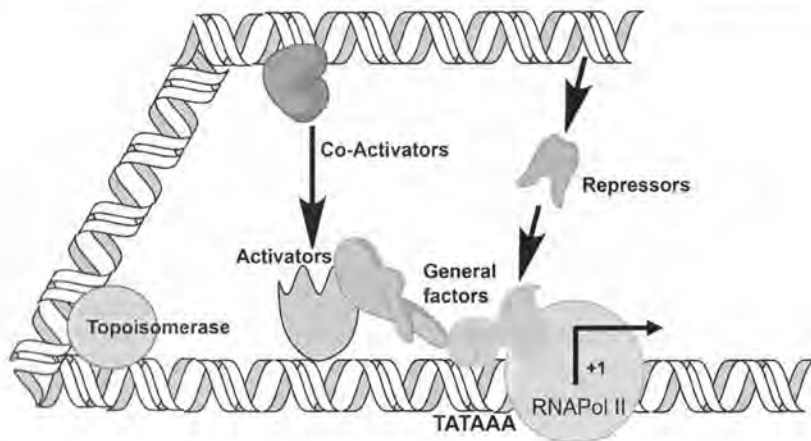


Figure 1. Schematic view of the assembly of transcription initiation complexes and of some potential sites for targeting transcription factors. General transcription factors binding to a particular eukaryotic promoter containing a TATA-box are shown together with the possibility that the binding of some other factors can either enhance (activators) or reduce (repressors) the binding of those factors and DNA, or to alter protein-protein interactions; thereby effects on gene expression may be both direct and indirect. Topoisomerases I and II are fundamental to avoid topological problems (for example, DNA supercoiling) that can occur during transcription initiation and elongation, representing also potential targets. Drugs that inhibit transcription might act by competing with the transcription factors for the binding to consensus sequences on gene promoters, or by altering protein-protein interactions.

The majority of approaches to antagonize transcription have been toward targeting DNA binding sites. Among the synthetic compounds explored as anticancer agents, the anti-DNA and anti-RNA strategies use oligonucleotides that can interact specifically with DNA sequences, including putative transcription factor's binding sites, or act as decoys of transcription factors [13]. However, their main handicap as therapeutic agents is their susceptibility to nucleases. Extensive modifications have been examined to reduce this limitation [2], which includes the synthesis of peptide-nucleic acids [14]. Of particular note is the growing interest in using the modular architecture of some gene-specific transcription factors to interfere selectively with the interplay of tissue-specific transcription factors with the basal transcriptional machinery while leaving intact the DNA-binding capabilities [15]. In this way, certain molecules may prevent the dimerization/ oligomerization process, thereby impairing transcription factor activity. Unlike most of the DNA-binding antibiotics used to challenge transcription, a major problem with

several of the molecules raised from the “synthetic approaches” has been to reach physiologically relevant amounts entering the target cells [2].

The observation that some of the antitumor drugs used from earliest chemotherapy were DNA-binding drugs, together with the fact that they are still in clinical use should be considered as a positive rather than negative connotation, which should stimulate a better understanding of their mechanism of action [4]. Hence, the experience accumulated on their DNA-binding properties and on their effects on transcription can be used to improve rational drug design [4, 5, 11, 16]. Given the complexity of cancer, which genetic variability exist not only between cancer types but also among patients, the individualization of therapy with tailor-made chemotherapy in which the interference of certain key genes through promoter-specific interference by small antibiotics has to be seen as a sensible approach.

DNA-binding antibiotics

Small natural antibiotics that target DNA in cancer cells, although not nearly as successful as antibiotics in the treatment of bacterial infections, have made an important contribution in the treatment of cancer since the 1960s [3, 17]. Antibiotics that can affect the properties of DNA and protein-DNA interactions act through either reversible, non-covalent, binding interactions or by covalent-bond formation. Two modes of reversibly binding of small molecules to DNA can be distinguished: intercalation and minor-groove binding. Intercalators bind to DNA by insertion of a planar, aromatic moiety between base pairs, simultaneously lengthening and unwinding the helix. In minor-groove binding, the crescent-shaped ligand fits into the minor groove with little perturbation of the DNA structure. Formulae of representative intercalators and minor-groove binders are shown in Fig. 2.

Intercalators

The anthracycline antibiotics daunorubicin (daunomycin) and doxorubicin (adriamycin) (Fig. 2) are among the most potent chemotherapeutic agents in clinical use [18]. They are the best-known representatives of this group of molecules, which also includes nogalamycin among others [3]. Although it is generally accepted that the mechanism of action of the anthracyclines is pleiotropic, DNA and topoisomerase II are considered primary cellular targets [19]. Anthracyclines bind tightly to DNA, and they have been shown preferential binding to (A/T)CG or to (A/T)GC sequences [20]. These molecules intercalate at the CpG steps with the daunosamine moiety pointing toward one another, lining the minor groove [20].

Actinomycin D (Dactinomycin) is a polypeptide antibiotic (Fig. 2) used to treat Wilms' tumor and various sarcomas and adenocarcinomas [17]. There is

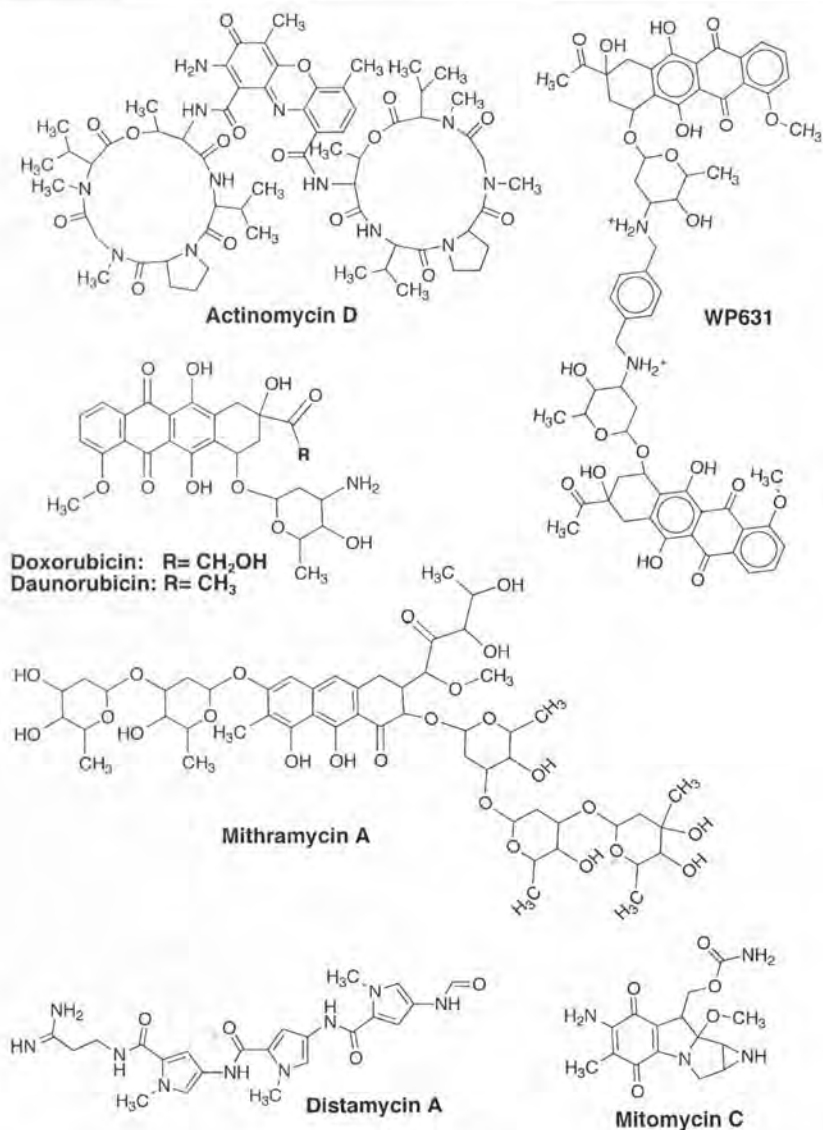


Figure 2. Chemical formulae of some DNA-binding agents reviewed here. The intercalators actinomycin D, doxorubicin, daunorubicin and the bis-intercalating anthracycline WP631 are shown together with two minor-groove binding antibiotics: distamycin A and mithramycin A and the alkylating antibiotic mitomycin C.

general agreement that its antitumor activity is attributable to its binding by intercalation into G/C-rich regions in DNA [3]. The nearly absolute requirement for binding to these regions is due to the binding of threonine carbonyl groups in the side chain to the 2-amino group of guanines [3].

Experimentally, the DNA binding sites for intercalators can be extended by the presence of two, or more linked intercalating chromophores. The better characterized natural bis-intercalator is echinomycin, a quinoxaline antibiotic [3]. Moreover, an experimental approach named 'modular design approach' has been used to design and obtain high-affinity sequence-selective bis-anthracyclines [16]. The first designed, synthesized and fully characterized of these bis-anthracyclines was WP631 (Fig. 2), which is composed of two daunorubicin molecules linked through a *p*-xylylenyl linker, recognizing 6-pb long, G/C-rich, DNA regions [16, 21].

Minor-groove binders

According to their preference for either CG or AT rich DNA regions, two main categories of antibiotics can be considered here. One comprises the aureolic acid antibiotics mithramycin A (plycamycin) (Fig. 2), chromomycin A3 and olivomycin. The most characteristic feature of the binding of these antibiotics to DNA is that it depends on the presence of dications, such as Mg^{2+} , and that they bind as dimers at G/C-rich tracts via the minor groove of DNA [22, 23]. These antibiotics have found clinical applications, but their use is rather restricted owing to their high toxicity [17]. Recently, several natural analogues have obtained by combinatorial biosynthetic procedures in the producing organisms [24, 25], and references therein. All these molecules bear a variety of changes in the side chain attached to the C-3 of the chromophore, which may result in differential effects on DNA-binding properties, cell uptake and gene expression [25-27]. The other comprises the two closely related oligopeptide antibiotics netropsin and distamycin A (Fig. 2), which display A/T-specificity in binding to DNA, with 4-5 bp long binding sites [3]. Based on the binding of these molecules to DNA there have been experimental efforts towards obtaining more specific sequence recognition through the design and synthesis of molecules such as the lexitropsins [11] that consist of the replacement of some of the H-bond accepting pyrrole moieties with imidazole or hydroxypyrrole units possessing H-bond donors. This allows recognition of GC base pairs at specific sites within an AT-rich tract [11, 28].

Natural DNA alkylating agents

Alkylating agents are molecules that can react with electron-rich atoms in DNA and other biologic molecules to form covalent bonds. A large number of alkylating molecules display antitumor activity [3, 4, 29]. These compounds

can inhibit *in vitro* transcription strongly than non-covalent binding drugs [29]. In cancer chemotherapy the most frequently used alkylating agents are synthetic nitrogen mustards [7], while among the antibiotics we will mention mitomycin C, anthramycin, the duocarmycins and ecteinascidin (ET-743, Yondelis). All these molecules react irreversibly with nucleic acids, forming monoadduct or diadduct covalent bonds, and intra- and inter-strand crosslinks. Mitomycin C (Fig. 2) crosslinks G-N7 sites across the major groove of DNA [30], while ecteinascidin, obtained from the ascidian *Ecteinascidia turbinata*, and anthramycin alkylate DNA in the minor groove [2, 4].

Synthetic analogues of some potent minor groove alkylating natural products like the duocarmycins have been obtained. The new set of DNA alkylating agents has similar properties to the natural products, as sequence selective alkylation at A-N3 sites and high cytotoxic potency, but lend themselves to the formation of pro-drugs that might be selectively activated in certain tumor microenvironments [31].

No discussion will be complete at this point without mentioning cisplatin, a platinum coordination complex. Cisplatin, which is used clinically to treat various types of cancers [17] forms intrastrand adducts between adjacent G-N7 sites [32].

Inhibition of DNA-protein interactions and gene transcription by DNA-binding drugs

DNA has to be considered not only a repository of encoded sequence information, but also the scaffold on which DNA-binding proteins assemble [4]. Among these proteins are transcription factors that control gene expression through specific contacts within the promoter region or indirectly enhance or attenuate the initiation of transcription by the RNA polymerases [1]. Table 1 presents a summary of DNA-binding drugs whose capacity for competing with transcription factors for their putative binding sites has been documented. In listing the different drugs, we have omitted those compounds that are not obtained from natural (biological) sources, although some semi-synthetic compounds are mentioned for the sake of comparison. Comprehensive lists of molecules interacting with consensus transcription factor binding sites, which also takes into consideration synthetic molecules known to interfere with transcription factor-DNA interactions, can be consulted elsewhere [7, 33].

E2F

The E2F family of transcription factors (E2F1, E2F4) is involved in the cell cycle regulation and synthesis of DNA in mammalian cells. E2Fs bind to the TTTTCGCGC consensus site in the target promoters. The retinoblastome (Rb) tumor suppressor protein binds to the E2F-1 transcription factor

preventing it from interacting with the transcription machinery [8]. In the absence of Rb, E2F-1 mediates the trans-activation of E2F-1 target genes that results in the overtaking of the G1/S checkpoint. Consistent with that the consensus binding site in promoters contains both A/T and C/G sites, its is observed that E2F-promoter interactions are sensitive to AT-specific antibiotics (netropsin and distamycin A) as well as to the CG-binding anthracyclines doxorubicin and nogalamycin [7, 34, 35] and to some alkylating agents [7].

HIF-1

The hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is a heterodimer of HIF-1 α and HIF-1 β (ARNT) that regulates transcription at hypoxia response elements (HRE), which contain the consensus (A/G)CGTG sequence [36]. HIF-1 regulates transcription at HREs of target gene regulatory sequences, which results in the transcription of genes such as *VEGF*, enhancing local vascularization and systemic oxygen transport. Doxorubicin and daunorubicin inhibit HIF-1-mediated gene transcription, by blocking the binding to DNA, and the tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells [37]. The direct competition of these anthracyclines for the putative HIF-1 binding sites may have implications for refining the clinical use of these antibiotics.

Echinomycin inhibits HIF-1 DNA-binding activity and the expression of corresponding target genes [38, 39]. Nevertheless, it has been observed that, although echinomycin can inhibit HIF-1 activity under hypoxic conditions in human HepG2 hepatoma cells, the effects are not specific to this transcription factor, as activator protein-1 (AP-1) and c-myc are also affected [40]. Besides, echinomycin appears to enhance HIF-1 activity under normoxia [40].

Mitomycin C reduces HIF-1 α protein concentration [41], which may either occur by down-regulation of HIF-1 α mRNA synthesis or of the protein synthesis or, even, through degradation of the protein [41].

NF- κ B

NF- κ B proteins are a family of structurally-related eukaryotic transcription factors that are involved in the control of a large number of cellular processes. NF- κ B plays a key role in regulating the immune response to infection, while incorrect regulation of NF- κ B has been linked to cancer [42]. NF- κ B transcription factors bind as dimers to \approx 10 bp-long DNA regions known as κ B sites (Table 1). Evidences exist that many different natural products are effective inhibitors of NF- κ B [43]. Captivatingly, whereas doxorubicin induces apoptosis of cardiomyocytes through the activation of NF- κ B, in cancer cells NF- κ B usually inhibits apoptosis induced by doxorubicin [18]. How precisely

Table 1. A compilation of natural DNA-binding antibiotics and some semi-synthetic analogues that down-regulate transcription by interfering with transcription factor-DNA interactions.

Transcription Factor	Consensus Sequence	DNA-binding antibiotics ³
E2F1/E2F4	TTTGGCGC ¹	doxorubicin, nogalamycin, mitoxantrone, distamycin, netropsin, ecteinascidin .
EGR1	TGCGTGGGCGT ¹ CGCCCCGC [59]	echinomycin, nogalamycin, chromomycin A3.
NFE1(GATA1)/GATA4	GATAAG [62]	distamycin, doxorubicin, daunorubicin ³
HIF-1	(A/G)CGTG [37]	doxorubicin, daunorubicin, echinomycin, mitomycin C.
NF-κB	GGGGATTCCCC ¹ CTCAGCCAATCAGCG ¹	actinomycin D, doxorubicin, daunorubicin.
NF-Y	CTCAGCCAATCAGCG ¹	ecteinascidin.
Sp1	(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T) [8]	chromomycin A3, mithramycin A, mithramycin SK, actinomycin D, elsamicin A, doxorubicin, daunorubicin, mitroxitone, ecteinascidin, WP631.
TBP (TFIID)	GTATAAAAG ¹	distamycin A, netropsin, chromomycin A3, nogalamycin, ecteinascidin.

¹According to the JASPAR CORE database (http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl)

²See main text for references

³The binding of anthracyclines would require the presence of a CpG site; thereby the consensus-binding site for these factors should be, for example, CGATAAG.

doxorubicin, or daunobicin, can activate NF-κB is not completely understood, and it remains unclear how cardiomyocytes elude those responses in opposite directions [18]. In the human HCT116 colon carcinoma cell line, which bears wild-type *p53* gene, daunorubicin is a potent inducer of both p53 and NF-κB transcription factors [44]. Nuclear accumulation of p53 protein occurs because of increased protein stability and enhanced gene expression. In addition, daunorubicin can induce the p53 promoter activity through the binding of p50/p65 NF-κB heterodimers to the κB site. Therefore, it has been suggested that p53-activating signal generated by daunorubicin might be partially regulated by NF-κB [44].

Sp1

Specific protein 1 (Sp1) is the prototype member of a family of related transcription factors (Sp1, Sp2, Sp3 and Sp4) that modulate gene transcription

[45, 46], and recognize the consensus sequence (G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T). Sp1 and Sp3 display very similar, if not identical, binding preferences [46]. Among Sp1 target genes are several oncogenes and tumor suppressors, thus Sp1 target genes would belong to each of the six hallmarks of cancer [46]. The interaction of Sp1 with DNA is inhibited by several drugs exhibiting a binding preference for G/C-rich tracts in DNA, but not by those binding to A/T-rich tracts [7, 8]. Both Sp1 and Sp3 are ubiquitously expressed in human cells, competing for common target sequences. Therefore, any interpretation of the *in vivo* effects of drugs competing with Sp1 putative binding sites requires considering the effects of Sp3 [46, Mansilla, *et al.* –unpublished observations–]. In general, Sp1 is a transcriptional activator, while Sp3 can act as either a transcriptional activator or repressor [46]. The *Sp3* gene encodes three distinct transcription factors: a full-length Sp3 protein that can activate gene transcription, and two internally initiated Sp3 isoforms described as inhibitors of gene transcription [47]. However, this observation is not universal and seems to depend on the cellular context [46, 47].

WP631 (Fig. 2), bis-intercalates into DNA [21] and inhibits Sp1-activated transcription *in vitro* [48]. In human Jurkat T lymphocytes, WP631 inhibits the expression driven by the endogenous transcription machinery of cells transfected with the GLUT1 (glucose transporter) promoter [49]. WP631 and endogenous Sp1 and Sp3 protein factors compete for DNA-binding, whereas the presence of WP631 attenuates the transcription of GLUT1 [49]. The capacity of WP631 to inhibit DNA-Sp1 interactions *in vivo* has been further characterized by experiments using a mutated (mut2) GLUT1 promoter because Sp3 binding is cancelled in this promoter [50]. In all the cases examined, the presence of WP631 significantly inhibits gene transcription, except when the wild-type GLUT1 promoter is co-transfected with both Sp1 and Sp3 expression plasmids [49]. Altogether, these results indicate that WP631 specifically inhibits Sp1-activated transcription and it can compete with Sp3 binding to finally inhibit transcription in cells [8, 49]. WP631 has been used to identify the presence of a critical Sp1 site within the *endoglin* promoter and its involvement in the transforming growth factor- β stimulation [51]. The intercalating antibiotics actinomycin D [33, 52] and elsamicin A [52] also inhibit Sp1-DNA interaction, and c-myc transcription [52].

The minor-groove binding antibiotics chromomycin A3 and mithramycin A can compete with Sp1 for its putative binding sites. Indeed, mithramycin A has been routinely used to demonstrate the role of Sp1-binding sites in the control of gene expression because of its potent effect on the binding [23, 53, 54], and references therein; a property that might be enhanced in some analogues obtained by combinatorial biosynthesis [26, 55] that show improved DNA-binding properties [22, 27].

Treatment of human gastric cancer with bevacizumab, a neutralizing antibody used to reduce angiogenesis, suppresses tumor growth in nude mice in a dose-dependent manner. Gene expression analyses revealed that treatment with bevacizumab up-regulated the expression of Sp1 in tumor tissues, whereas this effect was not seen in gastric cancer cells in culture [56]. Combined treatment with the antibody and mithramycin A produce synergistic tumor suppression, which is consistent with suppression of Sp1 expression and its downstream target genes [56]. This kind of results emphasizes the ability of Sp1-targeting strategies to modify cancer responses [45, 46]. Sp1 participates in the mechanism by which p53 mediates the upregulation of *p21* gene [57]. Mithramycin A is a strong activator of the tumor suppressor p53 protein in human HepG2 hepatoma cells, while it is a potent inhibitor of p53-mediated *p21* gene activation by blocking the inducible but not the basal transcription of *p21*.

TATA-box binding protein

The TATA-binding protein (TBP) is a transcription factor that binds specifically to the TATA box found upstream of the transcription start site in some eukaryotic gene promoters [9]. TBP, along with a variety of TBP-associated factors, make up the TFIID, a general transcription factor that participates in the RNA polymerase II pre-initiation complex [9]. Antibiotics that bind preferentially to AT sequences, such as distamycin A and netropsin, inhibit the interaction of TBP with its AT-rich target DNA sequence [58, 59]. The interaction of TBP is also inhibited by ecteinascidin (ET-743) [60]. The GC-specific minor groove binder chromomycin A3 can also inhibit TBP binding to DNA [58], but this is likely due to major distortion of the recognition site by the compound bound in the minor groove, either at AT-rich or at adjacent sequences [2, 58].

Other transcription factors

The effects of DNA binding antibiotics on protein-DNA interactions have been analyzed for many other transcription factors (see Table 1 and Refs. [7, 15]). Only a few illustrative examples are presented in the following paragraphs.

The NFE1 (GATA1) transcription factor plays an important role in erythroid development by regulating the switch of fetal hemoglobin to adult hemoglobin. Distamycin A can inhibit the binding of this factor to the putative binding sequence (Table 1) [7]. In the regulation of cardiac muscle cells, GATA4, another member of the family of GATA-binding factors, is a potential target of physiological relevance. In HL-1 cardiac muscle cells, or isolated adult rat ventricular myocytes, daunorubicin and doxorubicin decrease GATA4 binding at the *GATA4* gene promoter, causing a reduction in mRNA

levels [61]. However, the cardiotoxicity of the anthracyclines remains a clinical concern [18].

The early growth response factor 1 (EGR1) is a transcription factor induced in response to growth stimuli. Its sustained induction is considered to play an important role in tumor development [17]. EGR1 binds to a CG-rich DNA consensus sequence [58]. Surprisingly, EGR1 binding to its consensus binding site is not affected by actinomycin D regardless of the presence of GpC binding sites within the sequence [58]. However, chromomycin A3 can inhibit the DNA-EGR1 interaction [35].

Ecteinascidin forms covalent adducts and selectively inhibits *in vitro* binding of the CCAAT box factor NF-Y, which is required for the recruitment of RNA polymerase II and TATA-box binding proteins to some promoters [62]. In the *HSP70* promoter upon heat induction, this compound blocks transcription at pharmacologically relevant concentrations [62].

Direct versus indirect targeting of transcription factors for cancer therapy

Promoter-specific transcriptional interference can be attained without direct alteration of DNA-protein interactions, as the transcription factor-DNA interactions are not the unique way of drug intervention on gene transcription. Other aspects like dimerization of the protein factors, alteration of cytoplasm versus nuclei localization of the protein factor, and interactions with other species (Fig. 1) are also to be considered in the search for new antitumor agents targeted against transcription factors [6, 15].

As mentioned in Introduction, it is worth exploring the modular architecture of some gene-specific transcription factors to interfere selectively with the interplay of tissue-specific transcription factors with the basal transcriptional machinery while leaving intact the DNA-binding capabilities [15]. There are several examples of natural molecules used in antitumor chemotherapy that might operate as “anti-transcription factor therapy” by preventing the dimerization/oligomerization process. In this review, we shall only highlight a few examples from which we can foresee such molecules as a strong front in the development of new compounds [15, 63]. The large-scale characterization of natural small molecules as potential modulators of gene expression is a realistic and attractive approach to discover therapeutically effective molecules [15, 43].

Tamoxifen, an anti-estrogen agent derived from soy beans, interferes with transcriptional activity of the estrogen receptor by inhibiting the binding of estradiol and inducing conformational changes in the receptor, which prevents the interactions with its co-activators [64]. Paclitaxel, obtained from *Taxus brevifolia*, whose main mechanism of action is related to microtubule

assembly, can degrade I-KB, which brings to NF- κ B activation [65]. In fact, some of the ways by which molecules such the anthracyclines affect NF- κ B may fall within this category, because the interference with the formation of the NF- κ B complex with its inhibitor I-KB might be disrupted by these antibiotics [18].

An *in silico* search of the possibility of targeting the loss of gene function by known drugs has identified chromomycin A3 as an agent that could selectively target von Hippel-Lindau-deficient renal carcinoma cells [66]. The loss of function of the von Hippel-Lindau gene is a frequent event in the development of the malignant phenotype in some cell renal carcinomas [66]. Furthermore, a similar approach has identified mithramycin A as a potential agent against the loss of the Birt-Hogg-Dubé suppressor gene, which is associated to increased risk of renal cancer [67]. These 'gain of function' upon treatment can depend on transcriptional changes, but the mechanism has not been fully characterized. Other antibiotics that recognize G/C-rich regions in DNA, such as echinomycin and actinomycin D, also display genotype-selective toxicity against the von Hippel-Lindau deficient cells [66].

Other examples of antitumor agents developed by exploring various aspects of these 'indirect' strategies to challenge gene transcription have been discussed elsewhere [15, 63]. It is anticipated that as more and diversified aspects of protein-protein interactions between transcription factors will be characterized, this will facilitate the finding of new molecules to interfere with transcription factors.

Genome-wide analysis. a new step towards the understanding of transcriptional interference by DNA-binding drugs

The analysis of the ability of DNA binding ligands to alter transcription factor-DNA interactions has shown that there are some clear differences cell-free *in vitro* assays and activity measured in cells in culture [2, 8]. The introduction of macroarray and microarray technologies and their capability for simultaneous probing of the transcriptome has enabled, together with the advent of quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and chromatin immunoprecipitation (ChIPs), the genome-wide analysis of gene expression, which in some cases has been associated with drug intervention. In general, these studies have demonstrated the feasibility of obtaining transcriptome profiles, which might provide us with insights into the *in vivo* mechanisms of drug activity, especially those related with inhibition of gene transcription and resistance to some drugs. Another important aspect, which relevance is underlined by genome-wide studies, is that together with the down-regulation of the expression of some genes by DNA-binding drugs, there are also several

genes that are up-regulated by direct effects on their transcription or as the consequence of the response of cells to damage.

In a seminal paper, Scherf *et al.* used cDNA microarrays to assess gene expression profiles in a panel of 60 human cell lines used in the Development Therapeutics Program of the National Cancer Institute, and they correlated gene expression and drug activity patterns in these cells [68]. Average-linkage dendrograms based on the activity patterns of 118 drugs over the 60 cell lines produced five clusters. Among them, two related to “DNA-damaging agents” and to “Topoisomerase II inhibitors” [68] cover most of the antibiotics and related compounds we have reviewed in previous paragraphs. Interestingly, TopII inhibitors clustered in two distinct groups, one containing the anthracyclines and teniposide, and the other containing mitomycin C together with molecules known to produce double-strand breaks, which accentuates the fact that drugs with the same primary mechanisms of action (for example, acting on gene transcription directly) may have different secondary mechanisms of action. We should, therefore, consider that the patterns observed in genome-wide expression experiments would indicate the status of cellular processes and drug effects. A correct interpretation of these genome-wide experiments may be hindered by the interrelation between cell cycle pathways, which makes it difficult to differentiate direct from indirect effects [8].

The analysis of gene expression in human Jurkat T lymphocytes treated with different doses of daunorubicin by using a macroarray consisting of a set of oncogenes and tumor suppressors reveals that gene expression profiles, cell cycle distribution, the presence of DNA damage, and the time-dependent cell death are clearly correlated [8, 69]. Moreover, the general behavior of the genes expression upon treatment suggests that cell cycle arrest and cell death follow distinct pathways depending on drug concentration [69].

A model organism commonly used in the analysis of gene expression is the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Daunorubicin might inhibit yeast growth through its interaction with DNA at sequences also recognized by transcription factors [70, 71]. A direct prediction of a model considering the competition between transcription factors and daunorubicin is that the presence of the antibiotic should render a phenocopy of genetic deletion of some, if not all, of transcription factors [70, 71]. A comparison of a large dataset of null deletions of 42 yeast's transcription factors shows a high and significant correlation between daunorubicin effects and deletions of Adr1p, Cst6p and Sok2p protein factors [71]. Among the genes down-regulated by daunorubicin in yeast there is high representation of factors whose DNA binding sequence encompass the preferred binding sites for the anthracycline [70, 71]. In short, the changes observed in yeast transcriptome indicate that *in vivo* effects of daunorubicin are largely due to the competition of the anthracycline antibiotic with transcription factors for binding to consensus sequences.

A comparative analysis of the changes in the transcriptome of human U251 glioma cells has been undertaken using the natural bis-intercalator echinomycin and several synthetic polyamines [38]. In this study, a limited set of 31 transcripts, consisting of previously identified direct HIF-1 targets, was induced by hypoxic experimental conditions. Echinomycin treatment resulted in down-regulation of all these transcripts, and for some genes, including VEGF, expression was reduced to levels far below those non-induced controls [38]. These genes contain the HIF-1 responsive element also recognized by echinomycin, as described above.

Minor-groove binding antibiotics have been also interrogated using microarrays and qRT-PCR. A microarray analysis has shown that mithramycin SDK down-regulates transcription of multiple genes implicated in cell cycle progression, apoptosis, invasion and angiogenesis, consistent with the interference of this mithramycin A analogue with the Sp1 family transcription factors [26]. Genes that are actively transcribed and possess G/C-rich promoter elements appeared to be more susceptible to drug-induced inhibition in human ovarian carcinoma cells [26]. Overall, mithramycin SDK has a profound effect on the transcriptome of cancer cells. Many genes affected by mithramycin SDK, and the structurally related mithramycin SK, are involved in various aspects of cancer development and progression, thus representing potential targets for therapeutic intervention [26, 55]. Treatment of human CCRF-CEM leukemia cell line with chromomycin A3 results in the down-regulation of genes involved in a variety of cellular functions together with the activation of genes involved in the commitment of cells to programmed cell death [72].

A cDNA microarray assay indicates that in soft-tissue sarcoma cell lines genes down-regulated upon treatment with ecteinascidin (ET-743) are predominantly associated with nucleic acid binding, gene transcription, and cell cycle control, while those up-regulated are mainly involved in signal transduction, and induction of apoptosis [73]. This transcriptional signature, which can be also obtained from other cell types and treatments [26, 72, Mansilla, *et al.* – unpublished observations-], may be useful in the identification of ecteinascidin downstream mediators and transcription regulators, as well as the proposal of new therapeutic strategies [73].

The chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay is a powerful method for analyzing genomic DNA sequences bound to specific regulatory proteins. Briefly, in a ChIP assay protein-DNA complexes are crosslinked, immunoprecipitated, purified, and amplified for gene- and promoter-specific analysis of known targets using real time PCR or sequencing. In the presence of DNA-binding agents some of the protein-DNA interactions can be altered, which would result in differences in the loading of transcription factors on promoter regions. This technique is acquiring growing interest as a tool for the molecular interpretation of results arising from both massive microarray assays

and more focused transcription assays in cultured cells that are aimed at exploring the effects of antitumor agents [38, 57, 74]. ChIPs may reveal details that are difficult to observe by traditional approaches like band-shift assays. For example, using transactivation assays in Sp1-deficient cells, it has been shown that mithramycin A inhibits the transcriptional activation of the *p21* and *PUMA* promoters by Sp1 and p53 [57]. Chromatin immunoprecipitation assays indicate that mithramycin A enhances the recruitment of p53 to the distal *p21* promoter, whereas it blocks the recruitment of Sp1 to the proximal *p21* promoter [57]. These findings suggest that inhibition of Sp1 binding to the promoters of several p53 target genes, such as the *p21* gene as well as certain pro-apoptotic genes by mithramycin A, prevents the transcriptional induction of these genes by p53 and propose a mechanism that could account for some of the tumor suppressing and anti-apoptotic effects of mithramycin A.

In another ChIP experiment, it was observed that the *-uPAR* promoter region in human RKO colorectal cancer cells is recognized by Sp1. WP631 competes for transcription factor binding to this region and reduces *uPAR* mRNA levels [75]. ChIP assays have also demonstrated that HIF-1 α occupancy at the *VEGF* promoter decreases in the presence of echinomycin, in keeping with that this antitumor antibiotic could be used as regulator of hypoxia-induced gene expression [39].

Because cancer is a multifaceted disease, knowing the mechanisms of action of antitumor agents, and among them of those that bind to DNA, has wide ramifications in the development of new-targeted therapies for the treatment of cancer and other genetic diseases. Despite challenges involved in developing new drugs to target transcription factors [63], increasing evidence indicates that this approach should be seen as promising strategy in the quest for more effective treatments.

Acknowledgements

We apologize to authors whose primary references could not be cited due to space limitations. Work in the authors' laboratories was supported by grant BFU2010-15518 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, and the FEDER program of the European Community, and it was performed within the framework of the *Xarxa de Referència en Biotecnologia* of the Generalitat de Catalunya. Carolina Vizcaíno is recipient of a JAE-predoc2010 (CSIC) fellowship.

References

1. Fuda, N. J., Ardehali, M. B. and Lis, J. T. 2009, *Nature*. 461, 186-192.
2. Gniazdowski, M., Denny, W. A., Nelson, S. M. and Czyz, M. 2005, *Expert Opin. Ther. Targets*. 9, 471-489.

3. Waring, M. J. 1981, *Annu. Rev. Biochem.* 50, 159-192.
4. Hurley, L. H. 2002, *Nature Rev. Cancer.* 2, 188-200.
5. Portugal, J. 2009, *BMC Pharmacol.* 9, 11.
6. Hurst, H. C. 1996, *Eur. J. Cancer.* 32A, 1857-1863.
7. Gniazdowski, M., Denny, W. A., Nelson, S. M. and Czyz, M. 2003, *Curr. Med. Chem.* 10, 909-924.
8. Mansilla, S. and Portugal, J. 2008, *Biochimie.* 90, 976-987.
9. Baumann, M., Pontiller, J. and Ernst, W. 2010, *Mol. Biotechnol.* 45, 241-247.
10. Anish, R., Hossain, M. B., Jacobson, R. H. and Takada, S. 2009, *PLoS One.* 4, e5103.
11. Gottesfeld, J. M., Turner, J. M. and Dervan, P. B. 2000, *Gene Expr.* 9, 77-91.
12. Peixoto, P., Liu, Y., Depauw, S., Hildebrand, M. P., Boykin, D. W., Bailly, C., Wilson, W. D. and David-Cordonnier, M. H. 2008, *Nucleic Acids Res.* 36, 3341-3353.
13. Duca, M., Vekhoff, P., Oussedik, K., Halby, L. and Arimondo, P. B. 2008, *Nucleic Acids Res.* 36, 5123-5138.
14. Nielsen, P. E. 2010, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12, 184-191.
15. Karamouzis, M. V., Gorgoulis, V. G. and Papavassiliou, A. G. 2002, *Clin. Cancer Res.* 8, 949-961.
16. Priebe, W., Fokt, I., Przewloka, T., Chaires, J. B., Portugal, J. and Trent, J. O. 2001, *Methods Enzymol.* 340, 529-555.
17. DeVita, V. T. J., Hellman, S. and Rosenberg, S. A. 2005 *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
18. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. and Gianni, L. 2004, *Pharmacol. Rev.* 56, 185-229.
19. Gewirtz, D. A. 1999, *Biochem. Pharmacol.* 57, 727-741.
20. Frederick, C. A., Williams, L. D., Ughetto, G., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Rich, A. and Wang, A. H. 1990, *Biochemistry.* 29, 2538-2549.
21. Chaires, J. B., Leng, F. F., Przewloka, T., Fokt, I., Ling, Y. H., Perez-Soler, R. and Priebe, W. 1997, *J. Med. Chem.* 40, 261-266.
22. Barceló, F., Scotta, C., Ortiz-Lombardía, M., Méndez, C., Salas, J. A. and Portugal, J. 2007, *Nucleic Acids Res.* 35, 2215-2226.
23. Ghosh, S., Majumder, P., Pradhan, S. K. and Dasgupta, D. 2010, *Biochim. Biophys. Acta.* 1799, 795-809.
24. Lombó, F., Menéndez, N., Salas, J. A. and Méndez, C. 2006, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 1-14.
25. Mansilla, S., Garcia-Ferrer, I., Méndez, C., Salas, J. A. and Portugal, J. 2010, *Biochem. Pharmacol.* 79, 1418-1427.
26. Albertini, V., Jain, A., Vignati, S., Napoli, S., Rinaldi, A., Kwee, I., Nur-e-Alam, M., Bergant, J., Bertoni, F., Carbone, G. M., Rohr, J. and Catapano, C. V. 2006, *Nucleic Acids Res.* 34, 1721-1734.
27. Barceló, F., Ortiz-Lombardía, M., Martorell, M., Oliver, M., Méndez, C., Salas, J. A. and Portugal, J. 2010, *Biochemistry.* 49, 10543-10552.
28. Kopka, M. L., Goodsell, D. S., Han, G. W., Chiu, T. K., Lown, J. W. and Dickerson, R. E. 1997, *Structure.* 5, 1033-1046.
29. Gniazdowski, M. and Cera, C. 1996, *Chem. Rev.* 96, 619-634.
30. Tomasz, M. and Palom, Y. 1997, *Pharmacol. Ther.* 76, 73-87.

31. Terceel, M., Gieseg, M. A., Denny, W. A. and Wilson, W. R. 1999, *J. Org. Chem.* 64, 5946-5953.
32. Manic, S., Gatti, L., Carenini, N., Fumagalli, G., Zunino, F. and Perego, P. 2003, *Curr. Cancer Drug Targets.* 3, 21-29.
33. Gniazdowski, M. and Czyz, M. 1999, *Acta Biochim. Pol.* 46, 255-262.
34. Chiang, S. Y., Azizkhan, J. C. and Beerman, T. A. 1998, *Biochemistry.* 37, 3109-3115.
35. Chiang, S. Y., Welch, J. J., Rauscher, F. J., 3rd and Beerman, T. A. 1996, *J. Biol. Chem.* 271, 23999-234004.
36. Majmundar, A. J., Wong, W. J. and Simon, M. C. 2010, *Mol. Cell.* 40, 294-309.
37. Lee, K., Qian, D. Z., Rey, S., Wei, H., Liu, J. O. and Semenza, G. L. 2009, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106, 2353-2358.
38. Nickols, N. G., Jacobs, C. S., Farkas, M. E. and Dervan, P. B. 2007, *ACS Chem. Biol.* 2, 561-571.
39. Kong, D., Park, E. J., Stephen, A. G., Calvani, M., Cardellina, J. H., Monks, A., Fisher, R. J., Shoemaker, R. H. and Melillo, G. 2005, *Cancer Res.* 65, 9047-9055.
40. Vlamineck, B., Toffoli, S., Ghislain, B., Demazy, C., Raes, M. and Michiels, C. 2007, *FEBS J.* 274, 5533-5542.
41. Lou, J. J., Chua, Y. L., Chew, E. H., Gao, J., Bushell, M. and Hagen, T. 2010, *PLoS One.* 5, e10522.
42. Gilmore, T. D. 2006, *Oncogene.* 25, 6680-6684.
43. D'Incalci, M., Brunelli, D., Marangon, E., Simone, M., Tavecchio, M., Gescher, A. and Mantovani, R. 2007, *Curr. Pharm. Des.* 13, 2744-2750.
44. Hellin, A. C., Calmant, P., Gielen, J., Bours, V. and Merville, M. P. 1998, *Oncogene.* 16, 1187-1195.
45. Safe, S. and Abdelrahim, M. 2005, *Eur. J. Cancer.* 41, 2438-2448.
46. Wierstra, I. 2008, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 1-13.
47. Kennett, S. B., Udvardi, A. J. and Horowitz, J. M. 1997, *Nucleic Acids Res.* 25, 3110-3117.
48. Martin, B., Vaquero, A., Priebe, W. and Portugal, J. 1999, *Nucleic Acids Res.* 27, 3402-3409.
49. Mansilla, S., Priebe, W. and Portugal, J. 2004, *Biochemistry.* 43, 7584-7592.
50. Fandos, C., Sánchez-Feutrie, M., Santalucía, T., Viñals, F., Cadefau, J., Gumà, A., Cussó, R., Kaliman, P., Canicio, J., Palacín, M. and Zorzano, A. 1999, *J. Mol. Biol.* 294, 103-119.
51. Botella, L. M., Sánchez-Elsner, T., Rius, C., Corbi, A. and Bernabéu, C. 2001, *J. Biol. Chem.* 276, 34486-34494.
52. Vaquero, A. and Portugal, J. 1998, *Eur. J. Biochem.* 251, 435-442.
53. Snyder, R. C. and Miller, D. M. 1992, *Crit. Rev. Oncog.* 3, 283-291.
54. Ikari, A., Atomi, K., Takiguchi, A., Yamazaki, Y., Miwa, M. and Sugatani, J. 2009, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384, 306-310.
55. Bataller, M., Méndez, C., Salas, J. A. and Portugal, J. 2008, *Mol. Cancer Ther.* 7, 2988-2997.
56. Wang, L., Guan, X., Zhang, J., Jia, Z., Wei, D., Li, Q., Yao, J. and Xie, K. 2008, *Int. J. Oncol.* 33, 161-167.
57. Koutsodontis, G. and Kardassis, D. 2004, *Oncogene.* 23, 9190-9200.

58. Welch, J. J., Rauscher, F. J., 3rd and Beerman, T. A. 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 31051-31058.
59. Bellorini, M., Moncollin, V., D'Incalci, M., Mongelli, N. and Mantovani, R. 1995, *Nucleic Acids Res.* 23, 1657-1663.
60. Bonfanti, M., La Valle, E., Fernandez-Sousa-Faro, J. M., Faircloth, G., Caretti, G., Mantovani, R. and D'Incalci, M. 1999, *Anticancer Drug Des.* 14, 179-186.
61. Kim, Y., Ma, A. G., Kitta, K., Fitch, S. N., Ikeda, T., Ihara, Y., Simon, A. R., Evans, T. and Suzuki, Y. J. 2003, *Mol. Pharmacol.* 63, 368-377.
62. Minuzzo, M., Marchini, S., Broggin, M., Faircloth, G., D'Incalci, M. and Mantovani, R. 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 6780-6784.
63. Frank, D. A. 2009, *IDrugs.* 12, 29-33.
64. Peng, J., Sengupta, S. and Jordan, V. C. 2009, *Anticancer Agents Med. Chem.* 9, 481-499.
65. Liu, G. H., Wang, S. R., Wang, B. and Kong, B. H. 2006, *Int. J. Gynecol. Cancer.* 16, 1777-1782.
66. Sutphin, P. D., Chan, D. A., Li, J. M., Turcotte, S., Krieg, A. J. and Giaccia, A. J. 2007, *Cancer Res.* 67, 5896-5905.
67. Lu, X., Wei, W., Fenton, J., Nahorski, M. S., Rabai, E., Reiman, A., Seabra, L., Nagy, Z., Latif, F. and Maher, E. R. 2011, *Mol. Cancer Ther.* 10, 80-89.
68. Scherf, U., Ross, D. T., Waltham, M., Smith, L. H., Lee, J. K., Tanabe, L., Kohn, K. W., Reinhold, W. C., Myers, T. G., Andrews, D. T., Scudiero, D. A., Eisen, M. B., Sausville, E. A., Pommier, Y., Botstein, D., Brown, P. O. and Weinstein, J. N. 2000, *Nature Genet.* 24, 236-244.
69. Mansilla, S., Piña, B. and Portugal, J. 2003, *Biochem. J.* 372, 703-711.
70. Marin, S., Mansilla, S., Garcia-Reyero, N., Rojas, M., Portugal, J. and Piña, B. 2002, *Biochem. J.* 368, 131-136.
71. Rojas, M., Casado, M., Portugal, J. and Piña, B. 2008, *BMC Genomics* 9, 358.
72. Zihlif, M., Catchpoole, D. R., Stewart, B. W. and Wakelin, L. P. 2010, *Cancer Genomics Proteomics.* 7, 323-330.
73. Martínez, N., Sánchez-Beato, M., Carnero, A., Moneo, V., Tercero, J. C., Fernández, I., Navarrete, M., Jimeno, J. and Piris, M. A. 2005, *Mol. Cancer Ther.* 4, 814-823.
74. Kambe, A., Iguchi, G., Moon, Y., Kamitani, H., Watanabe, T. and Eling, T. E. 2008, *Biochim. Biophys. Acta.* 1783, 1211-1219.
75. Nair, R. R., Wang, H., Jamaluddin, M. S., Fokt, I., Priebe, W. and Boyd, D. D. 2005, *Oncol. Res.* 15, 265-279.



Novel mithramycins abrogate the involvement of protein factors in the transcription of cell cycle control genes

Carolina Vizcaíno^a, Sylvia Mansilla^a, Luz-Elena Núñez^b, Carmen Méndez^c, José A. Salas^c, Francisco Morís^b, José Portugal^{a,*}

^a Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain

^b EntreChem SL, Oviedo, Spain

^c Departamento de Biología Funcional-Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 June 2012

Accepted 3 August 2012

Available online 14 August 2012

Keywords:

Transcription factors

Antitumor drugs

Mithramycin SK

EC-8042

Gene expression

HCT116 cells

ABSTRACT

The effects of mithramycin SK (MSK) and demycarosyl-3D-β-D-digitoxosyl-mithramycin SK (DIG-MSK; EC-8042), two novel analogs of the antitumor antibiotic mithramycin A, on gene transcription were examined in human HCT116 colon carcinoma cells by quantitative real-time PCR of 89 genes mainly involved in cell cycle control. Each one of the analogs down-regulated a different set of genes, while only five genes were down-regulated by both compounds. Moreover, other genes were significantly up-regulated, among them *p21^{WAF1}/CDKN1A* which is involved in halting cells at the G1 and G2/M checkpoints. These results are rationalized in terms of MSK or DIG-MSK competition with various transcription factors for binding to consensus C/G-rich tracts encompassed in gene promoters. Changes in cell cycle distribution and protein levels after treatment with every analog were consistent with changes observed in gene expression.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In eukaryotic cells, the synthesis of mRNAs coding for proteins is a highly regulated process that requires the assembly of general transcription factors and RNA polymerase II into a pre-initiation complex in gene promoters [1]. About one-third of the identified cellular oncogenes code for gene-specific transcription factors that are required for a subset of the genes transcribed by RNA polymerase II [2], while tumor suppressors, such as p53, have been described to act as transcription factors on genes involved in cell cycle checkpoints, genomic stability and apoptosis [3]. In drug discovery, transcription factor-based therapeutics represents an efficient approach aimed at controlling the transcription patterns that operate in tumor cells [2,4–7].

Regulated gene expression involves successive interactions between transcription factors and associated factors, some of which are known to transactivate the basal transcription [1,8]. The core promoter, defined as the minimal DNA region that is sufficient to direct basal transcription by RNA polymerase II *in vitro*, typically extends about 40 bp up- and down-stream of the start site of

transcription and can contain several distinct sequence elements. Core promoters are highly diverse in structure, and each core promoter can contain sequence element found only in a subset of genes. So far, only the TATA box and Inr (initiator) elements have been shown to be capable of directing accurate transcription initiation by RNA polymerase II independent of other promoter elements [8]. Nevertheless, the occurrence of the TATA box has been overestimated in the past since the majority of human genes are TATA-less. Given the enormous diversity of cell signals that have to be interpreted by the transcriptional machinery, a particular regulator can partner and function with several co-activators and co-repressors, thus most genes seem to be regulated by mixing and matching different types of trans-activators or repressors [1]. Several small antitumor agents presently in clinical use are DNA-binding drugs that can prevent the binding of transcription factors to DNA by directly competing with the proteins for consensus DNA-binding sequences [4,9–11].

There are grounds for considering that cyclin-dependent kinases, which play a key role in cell cycle regulation, participate in the direct regulation of transcription by promoting or repressing the activity of a subset of genes, and the eukaryotic polymerases are targets of cyclin-dependent kinases regulation [12]. Retinoblastoma (Rb) and some related proteins are transcriptional repressors of a number of transcription factors, including E2F, whose activity is required for completion of the G1/S phase transition [12]. Transcriptional suppression is achieved by direct

* Corresponding author at: Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac, 10, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 403 4959; fax: +34 93 403 4979.

E-mail address: jmbmc@ibmb.csic.es (J. Portugal).

protein–protein interaction between those proteins and E2F bound to the promoter of target genes. Passage through G1 phase is promoted by a group of cyclins, which include the D-type and E-type cyclins. Increased abundance of cyclin/cyclin-dependent kinases complexes can directly affect gene expression by altering the activity of specific transcription factors and the basal transcription of a variety of genes. Various transcription factors binding to cyclin gene promoters have been identified [13,14], thus being examples of potential chemotherapeutic targets.

There are foundations for considering that a rational relationship exists between the capability of some antitumor drugs to impair the cellular transcriptome and some determinants of cell toxicology [15–17]. Assessing changes in the patterns of gene expression may identify the effects of DNA-binding drugs on the interaction between transcription factors and consensus binding sites in gene promoters.

Among the antitumor agents that have been described to interfere with gene expression, mithramycin A (MTA) has been widely used in experimental systems both *in vivo* and *in vitro*, fundamentally as inhibitor of Sp1-transactivated gene expression [18–21], a property shared with other drugs such as certain anthracyclines [6,22]. Although MTA possesses antitumor activity it lacks a suitable therapeutic window and its clinical use has been discontinued because of severe side effects [23].

MTA is a natural polycyclic aromatic polyketide produced by *Streptomyces* species, which binds preferentially to G/C-rich sequences in DNA [24,25]. Combinatorial biosynthesis applied to the mithramycin biosynthetic pathway has been used to obtain new derivatives that display improved biochemical and pharmacological properties [21,26–31]. Mithramycin SK (MSK) and demycarosyl-3D-β-D-digitoxosyl-mithramycin SK (EC-8042; DIG-MSK) have been generated in *Streptomyces argillaceus* using a combinatorial biosynthesis approach [26,32].

The availability of novel mithramycin analogs with improved pharmacological properties, together with a better understanding of their effects on gene expression, might open up new perspectives for the use of this class of compounds, which have gained renewed attention as therapeutic agents in cancer- and non-cancer-related diseases [21,33–36]. Moreover, a synergistic antiangiogenic activity of bevacizumab and MTA has been demonstrated, which seems to depend on the abrogation of Sp1 levels by the effect of MTA on gene transcription [37].

MSK has been tested *in vitro* against several human cancer cell lines, suggesting an improved therapeutic index compared to MTA [26,38], in addition to inhibiting transcription of several genes [17,39], which is likely to occur, at least in part, by direct abrogation of the Sp1-transactivating effects on gene expression. On the other hand, DIG-MSK shows similar antitumor activity both *in vivo* and *in vitro* and still less toxicity than MSK, and one order of magnitude less toxicity than MTA [32].

In the present paper we explore the similarities and differences in the changes in gene transcription induced by MSK and DIG-MSK in human HCT116 colon carcinoma cells that bear wild-type p53. By using qRT-PCR assays of the transcription of 89 genes mainly involved in cell cycle control, we dissect the effects of these mithramycin analogs on gene expression and associate them with cell cycle distribution and the commitment of cell to dying by apoptosis or necrosis from an induced halt in G1 phase and the time-dependent overtaking of G1 and G2/M checkpoints. Moreover, we also address whether putative binding sites for different transcription factors are over- or under-represented within the promoters of genes down-regulated by every drug treatment, and we rationalize the ‘enrichment’ in genes containing putative binding sites that also may encompass drug’s preferred binding sites. Several transcription factors that recognize C/G-rich tracts in promoters are identified as potential targets for MSK and DIG-MSK,

thus providing further evidence on the “transcription factor-based” action of mithramycin analogs.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and drug treatments

Wild-type HCT116 human colon carcinoma cells were maintained in 50% Dulbecco's MEM (Invitrogen, Prat de Llobregat, Spain)/50% Ham's F12 (Lonza, Barcelona, Spain) medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 100 U/ml penicillin (Invitrogen), 100 mg/ml streptomycin (Invitrogen), at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Exponentially growing cells subcultured at a density of 2.5 × 10⁴ cells/ml were incubated at 37 °C with the drug concentrations reported in Section 3.

MSK and demycarosyl-3D-β-D-digitoxosyl Mithramycin SK (DIG-MSK; EC-8042) (Fig. 1) were isolated and purified from the producer organisms as described elsewhere [26,32]. Stocks of MSK or DIG-MSK (EC-8042) were prepared as 1 mM solutions in sterile 150 mM NaCl, maintained at –20 °C, and brought to the final concentration just before use.

2.2. Assessment of cell proliferation

The effect of MSK or DIG-MSK on HCT116 cell proliferation was determined by using the MTT-method as described elsewhere [40]. Cells subcultured at a density of 2.5 × 10⁴ cells/ml were incubated with various drug concentrations at 37 °C for 72 h. After incubation, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (Sigma, St. Louis, MO) was added to each culture (50 µg/well). The dark-colored crystals produced by viable cells were solubilized with 30 mM HCl in 2-propanol. Absorbance was

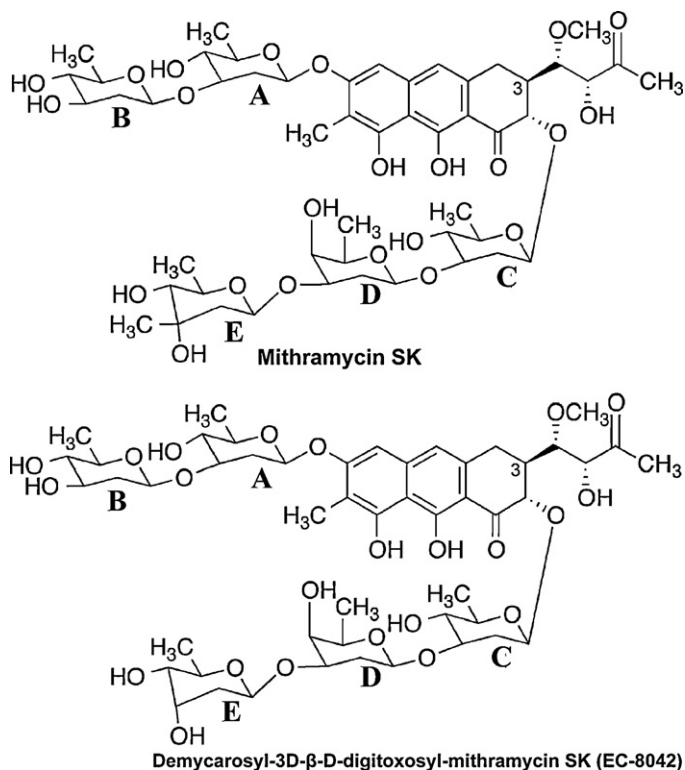


Fig. 1. Chemical formulae of mithramycin SK (MSK) and its analog demycarosyl-3D-β-D-digitoxosyl-mithramycin SK (DIG-MSK; EC-8042). The two compounds differ in their trisaccharide chain, in which sugar E is a D-mycarose in MSK and a D-digitoxose in DIG-MSK.

determined at 570 nm using a BioTek ELx800 microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT).

2.3. RNA extraction

Total RNA was isolated from control cells (those to which no drug was added) and from cells treated with MSK or DIG-MSK for 24 h. The UltraspecRNA isolation reagent (Biotech, Houston, TX) was used following the procedure provided by the vendor. RNA was digested with RNase-free DNase I (Roche Diagnostics, Madrid, Spain) in the presence of RNasin, (Promega Biotech Iberica, Madrid, Spain), phenol extracted and precipitated, and the pellet was dissolved in RNase-free water. The yield and purity of total RNA were assessed spectrophotometrically, and RNA integrity examined in an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Wilmington, DE).

2.4. Quantitative real time RT-PCR assays

The experiments were designed and carried out in accordance with the MIQE guidelines [41], including the RNA integrity assay described in Section 2.2. For quantitative real time PCR (qRT-PCR), first strand cDNAs were synthesized from 4 µg of DNase I-treated total RNA, obtained of two biological replicates, in a 20 µl reaction volume using the *Transcriptor first strand cDNA synthesis kit* (Roche Diagnostics) following manufacturer's instructions. The *Human Cell Cycle RT2 Profiler PCR Array* (SABiosciences, Qiagen Iberica, Madrid, Spain) was used to analyze the expression of 89 genes mainly involved in cell cycle regulation. The qRT-PCR reactions were performed in triplicate in a Roche LightCycler 480, using the SYBR-Green PCR Master Mix (Roche Diagnostics). PCR conditions included an initial denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of a denaturation step at 95 °C for 15 s and an annealing/extension step at 60 °C for 1 min. A final dissociation curve was generated to verify that a single product was amplified. Reactions in the absence of template and in the absence of enzyme were also included as negative controls.

The qRT-PCR raw data were analyzed using the *PCR Array Data analysis template* (SABiosciences) and the software available online at the SABiosciences website: www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php, which provides a statistical analysis of data. Relative expression values of the different genes were calculated from the threshold cycle (C_t) following the $\Delta\Delta C_t$ method [42] using *GAPDH* as internal housekeeping control.

2.5. Ontology and analysis of overrepresented transcription factor binding-sites in promoters

Functional classification of the genes down-regulated upon treatment with MSK or DIG-MSK in *Biological Process* and *Molecular Function* categories was performed by comparison with the list of all the genes studied by using PANTHER v.7 [43] at <http://www.pantherdb.org/tools/>, which uses the binomial test for assessing statistical significance. Furthermore, GATHER (available at: <http://gather.genome.duke.edu/>) was used to classify down-regulated genes in other (extra) GO categories [44].

The Transcription Element Listening System (TELIS) [45] was used to analyze the prevalence of transcription factor-binding motifs, among the promoters of genes down-regulated upon exposure to MSK or DIG-MSK. The *Incidence analyses* provided by the software determines whether a putative transcription factor binding-site is present in a greater fraction of differentially expressed genes than in the sampling frame as a whole. Default parameters were used in the analysis (promoter size “–600” and stringency setting “0.9”). This binary analysis was executed online at <http://www.telis.ucla.edu/index.php?cmd=transfac>, as an exact

binomial test. Consensus sequences corresponding to transcription-factor binding sites were located in the promoter regions of the genes down-regulated by MSK or DIG-MSK through multiple comparative analysis and retrieved using TELIS database [45].

2.6. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

Protein was extracted from HCT116 cells with a lysis buffer consisting of 50 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40 and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, containing 2 µg/ml aprotinin (Sigma) and 0.1 µg/ml leupeptin (Sigma). Total protein was quantified by the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Two complementary oligonucleotides: 5'-ATTCGATCGGGGCGGGCGAGC-3' and 5'-GCTCGCCCCGCCCGATC-GAAT-3' were purchased from Sigma and annealed to obtain a duplex 22-mer oligonucleotide containing a consensus Sp1-binding site. The duplex was 5'-end-labeled with [γ - 32 P]ATP (3000Ci/mmol) (PerkinElmer, Groningen, Nederland) using T4-polynucleotide kinase (Roche Diagnostics). EMSA assays were performed in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 µM ZnCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 1% Nonidet-P40, and 2.5% glycerol. A typical binding reaction contained 1.0–2.0 µg protein extract and 1500–3000 cpm (about 2 nmol in bp) of the end-labeled double strand oligonucleotide, in the presence of 0.5 µg of poly[d(I – C)] (Roche Diagnostics). In reactions containing MSK or DIG-MSK, protein extracts and the mithramycin analog were added at the same time. For competition experiments a 100-fold molar excess of unlabeled double-strand oligonucleotide was used. Following 45 min incubation at 25 °C, the samples were analyzed on 4% non-denaturing polyacrylamide gels containing 45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA (pH 8.3) and 1% Nonidet-P40. After running at 12 V/cm, the gels were dried under vacuum, subjected to autoradiography and quantified.

2.7. Analysis of cell cycle distribution by flow cytometry

After treatment with MSK or DIG-MSK for various periods of time, cells were morphologically analyzed by phase-contrast microscopy using a Nikon Eclipse TS100-F microscope (Nikon Instruments, Amstelveen, Nederland). For flow cytometry analysis, cells were harvested, fixed with 70% ethanol and stained with PI (propidium iodide, Sigma) as described elsewhere [40]. Nuclei were analyzed with a Coulter Epics-XL flow cytometer (Coulter Corporation, Hialeah, FL), using the 488 nm line of an argon laser and standard optical emission filters.

2.8. Western analysis of protein levels

Protein was extracted from drug-treated and control cells as described above in Section 2.6. About 30 µg of denatured proteins was subjected to electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels, blotted onto Optitran BA-S85 membranes (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany), probed with specific antibodies: p21^{WAF1} (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany), p53 (Santa Cruz, Quimigen, Madrid, Spain), cyclin D1 (Santa Cruz) and GAPDH (Sigma), incubated with secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK), and detected by chemiluminescence using Luminol (Sigma).

2.9. Cytometric assessment of apoptotic cell death

Primary apoptosis was determined by flow cytometry as the Annexin-V-fluorescein positive/PI negative cell population by using the Annexin-V-fluos staining kit (Roche Diagnostics) and flow cytometry in a Coulter Epics-XL flow cytometer. Necrotic cells were characterized as two populations: Annexin-V-fluos negative/PI

positive (primary necrotic cells, by loss of membrane ability to exclude PI) and Annexin-V-fluorescence positive/PI positive (necrosis arising from apoptotic cells or primary necrosis).

3. Results

3.1. Antiproliferative effects of MSK and DIG-MSK

To establish the experimental conditions to analyze the effects of the novel mithramycins MSK and DIG-MSK (Fig. 1) on gene expression in human HCT116 colon carcinoma cell lines, the antiproliferative effects of these compounds was determined after continuous treatments for 72 h. The drug concentrations required for inhibiting cell growth by 75% (IC_{75}) were calculated from three independent MTT assays carried out in triplicate. The IC_{75} values (mean \pm SD) were 23.96 ± 4.40 nM for MSK and 11.40 ± 0.34 nM for DIG-MSK. These values were significantly different (Student's *t*-test; $p < 0.05$) indicating that lower concentrations of DIG-MSK were required to obtain equitoxic effects.

3.2. Changes in the transcription levels induced after treatments with MSK or DIG-MSK

In accordance with the antiproliferative assays described in the previous paragraph all the subsequent experiment were performed

using 23 nM MSK and 11 nM DIG-MSK. Expression data determined by qRT-PCR from HCT116 cells treated with those equitoxic (IC_{75}) concentrations of MSK or DIG-MSK were examined after 24-h treatments and compared.

Of 89 genes that were quantified for every treatment, which included the housekeeping gene *GAPDH* used for data normalization, 28 genes (31.5%) showed statistically significant differences in expression (≥ 2 -fold change; $p < 0.05$) between MSK-treated cells and untreated (control) cells, while 54 genes (60.7%) showed statistically significant differences in expression between DIG-MSK-treated cells and untreated ones.

Fig. 2 shows bivariate scatter plots of the corrected levels of expression of the genes analyzed by qRT-PCR. A complete data set of all the genes analyzed is presented as Supplementary Table S1, which includes the experimentally obtained C_t values. DIG-MSK had a higher effect than MSK on gene transcription. In Fig. 2B, Venn diagrams show that the number of genes down-regulated by DIG-MSK (35 genes) was higher than those affected by MSK (26 genes). It is worth noting that 5 genes (*CKS2*, *DDX11*, *MCM5*, *SKP2* and *TFDP1*) were down-regulated by both treatments. In contrast, one significantly up-regulated gene was coincident (*p21^{WAF1}/CDKN1A*). Furthermore, 19 genes were up-regulated by DIG-MSK while only two were up-regulated by MSK (Fig. 2B).

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.003>.

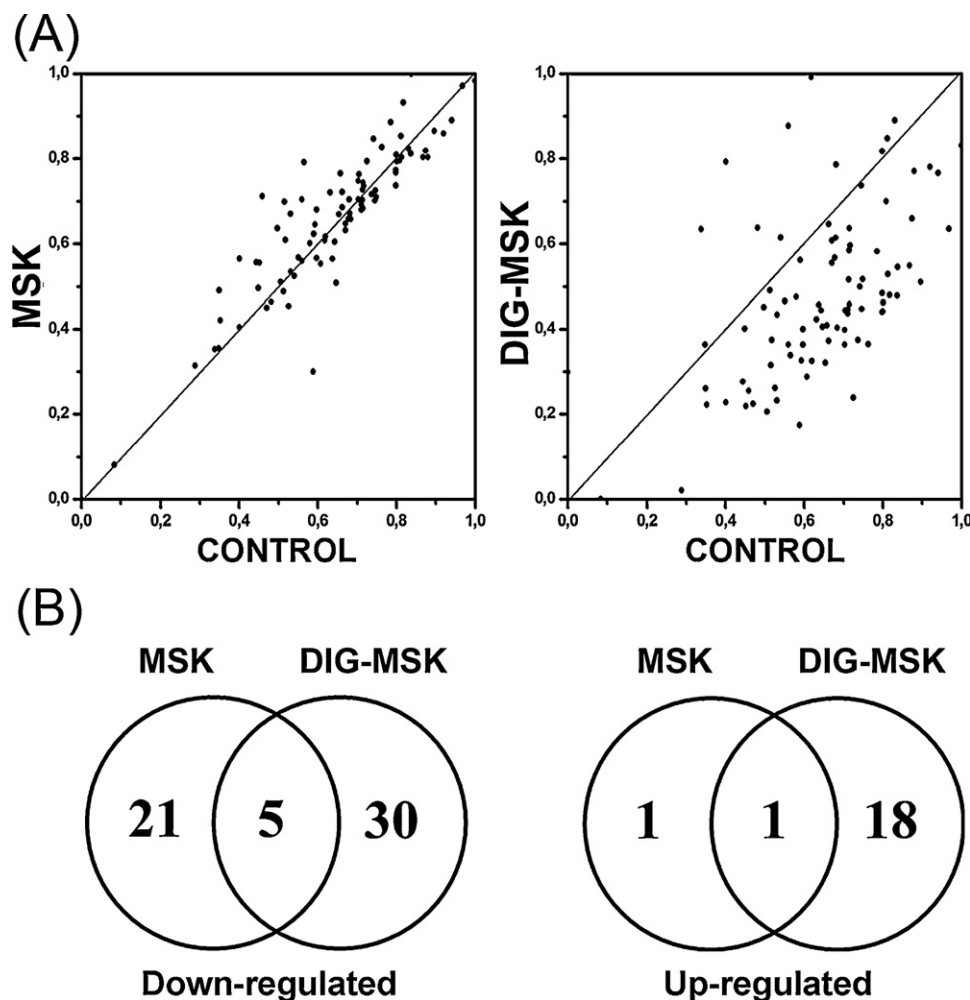


Fig. 2. Quantitative real time PCR (qRT-PCR) analysis of gene expression. (A) Distribution of the treatment-induced expression profiles in HCT116 cells. Bivariate scatter plots display a comparison of the expression profiles of untreated, control cells, versus the transcription profiles induced by treatments for 24 h with 23 nM MSK or 11 nM DIG-MSK. Data are corrected average C_t values obtained from qRT-PCR experiments performed in triplicate, which are plotted in normalized 0–1 scales for the sake of comparison. (B) Venn diagrams representing genes affected, either down-regulated or up-regulated, by treatments with MSK or DIG-MSK (≥ 2.0 -fold change; $p < 0.05$). Numbers inside the intersections correspond to genes influenced by both treatments.

Table 1

Genes differentially down-regulated in human HCT116 colon carcinoma cells after treatment with equitoxic concentrations of MSK or DIG-MSK (EC-8042) grouped by GO categories.^a

Main gene functions	GOID	MSK	DIG-MSK	MSK and DIG-MSK
Apoptosis and induction of apoptosis	0006915 0006917	<i>CUL2</i>	<i>BCL2</i> ; <i>BAX</i> ; <i>CDC34</i>	<i>TFDP1</i>
Mitosis and G2/M transition of mitotic cell cycle ^b	0007067 0000086	<i>CDC2</i> ; <i>CCNB1</i> (<i>cyclin B1</i>); <i>CCNB2</i> (<i>cyclin B2</i>); <i>MAD2L1</i> , <i>CUL2</i> ; <i>CDKN3</i> ; <i>CHEK1</i>	<i>CCNE1</i> (<i>cyclin E1</i>); <i>CCNF</i> (<i>cyclin F</i>); <i>CCND2</i> (<i>cyclin D2</i>); <i>CDC16</i> ; <i>CDC34</i> ; <i>MAD2L2</i> ; <i>CCNG2</i> ; <i>CDK4</i> ; <i>CCNT1</i> ; <i>CCNT2</i> ; <i>CDK5R1</i> ; <i>CDKN1B</i> ; <i>CDKN2B</i> ; <i>DNM2</i>	<i>DDX11</i>
Chromosome segregation	0007059	<i>MAD2L1</i>	<i>CDC34</i> ; <i>MAD2L2</i>	<i>DDX11</i>
Transcription factor	0008134	<i>RBBP8</i> ; <i>BRCA1</i>	<i>RBL1</i> ; <i>CCNT1</i> ; <i>CCNT2</i>	<i>TFDP1</i>
DNA binding	0003677	<i>RBBP8</i> ; <i>BRCA1</i>	<i>RBL1</i> ; <i>CCNT1</i> ; <i>CCNT2</i>	<i>TFDP1</i> ; <i>SKP2</i>
Nucleic acid binding	0003676	<i>CDC2</i> ; <i>MCM3</i> ; <i>MCM4</i> ; <i>RPL13A</i> ; <i>CDC20</i> ; <i>RBBP8</i> ; <i>BRCA1</i> ; <i>HPRT1</i> ; <i>PCNA</i>	<i>RBL1</i> ; <i>CCNT1</i> ; <i>RAD1</i> ; <i>CCNT2</i> ; <i>MRE11A</i>	<i>TFDP1</i> ; <i>MCM5</i> ; <i>DDX11</i> ; <i>SKP2</i>
Kinase activity	0016301	<i>CCNB1</i> (<i>cyclin B1</i>); <i>CCNB2</i> (<i>cyclin B2</i>); <i>CKS1B</i> ; <i>CDC2</i> ; <i>MCM3</i> ; <i>CHEK1</i>	<i>CDK4</i> ; <i>CDKN1B</i> ; <i>CDKN2B</i> ; <i>CCNE1</i> (<i>cyclin E1</i>); <i>CCNF</i> (<i>cyclin F</i>); <i>CCND2</i> (<i>cyclin D2</i>); <i>CCNT1</i> ; <i>CCNT2</i> ; <i>CDK5R1</i> ; <i>RAD9A</i> ; <i>CCNG2</i> ; <i>CDKN2B</i>	<i>CKS2</i>
G1/S transition of mitotic cell cycle ^b	0000082	<i>CCNE1</i> ; <i>CCNT1</i> ; <i>CDC34</i> ; <i>CDKN1B</i> ; <i>CDKN3</i> ; <i>CHEK1</i> ; <i>CUL2</i>	<i>CCNE1</i> (<i>cyclin E1</i>); <i>CCNT1</i> ; <i>CCNT2</i> ; <i>CDC34</i> ; <i>CDK4</i> ; <i>CDK5R</i> ; <i>CDKN1B</i> ; <i>CDKN2B</i>	<i>CKS2</i>
Regulation of DNA repair ^b	0006282	<i>BRCA1</i>	<i>MRE11A</i> ; <i>RAD</i> ; <i>1 RAD9A</i>	<i>DDX11</i>

^a Genes were mapped to PANTHER molecular function and biological process categories and grouped by Gene Ontology (GO) categories. See main text for details.

^b Additional (extra) categories obtained by using GATHER.

3.3. Gene ontology

Gene ontology (GO) analysis of genes repressed by treatments with MSK or DIG-MSK showed some differences in distribution of GO categories according to the main gene functions (Table 1). In general, this analysis confirmed the decrease in the transcription of genes related to eleven GOID terms, which included genes related to transcription factors and DNA-binding, in keeping with the known capacity of mithramycins to alter DNA–protein interaction and gene transcription (see Section 1).

3.4. Identification of transcription factors associated to MSK- and DIG-MSK-repressed genes

Given that mithramycins are well characterized as *in vitro* transcription inhibitors *via* direct competition with protein binding to DNA [10,11], we explored whether among transcription factors, there was an 'enrichment' in putative binding sites in the promoters of down-regulated genes, which might explain the significant repression by MSK and DIG-MSK through the challenging of protein–DNA interactions. From the 192 transcription factors in the TRANSFAC database that are used by TELiS, Fig. 3 displays the results of an *Incidence analysis* (see Section 2) used to determine whether a particular transcription-factor binding sequence had a significant higher occurrence in down-regulated genes than in the whole set of genes we analyzed by qRT-PCR. Results obtained from the *Incidence analysis* were used because they are deemed to be more appropriate than *Frequency analysis* for small sample sizes [45]. This approach allowed us to analyze the putative binding sites to reveal, by using an exact binomial test for statistical analysis ($p < 0.01$), in which cases the drug-repressed genes encompassed in their promoters a significantly higher proportion of such binding sites than those expected by simple chance.

Fig. 3 shows the number of down-regulated genes that contain in their promoter region (–600, +1) consensus binding-sites for a variety of protein factors. In general, among the down-regulated genes the number of promoters that contain Sp1-binding sites is higher than the number of those containing any other putative protein-binding site. We found a higher number of down-regulated genes containing Sp1 sites after treatment with DIG-MSK than after treatment with MSK. It was also evident that there are other transcription factors binding sites overrepresented in

genes down-regulated by every drug (Fig. 3). Consensus binding sites for the transcription factors shown in Fig. 3 are presented in Table 2. The sequences documented in Table 2 were obtained from the promoters of all the down-regulated genes by treatments with MSK or DIG-MSK, rather than the consensus sequence available to the TELiS database. By all means, sequences in Table 2 fall within those expected as putative binding sites for the respective transcription factor in publicly available databases, while they, albeit crude, indicate consensus-binding sites for the mithramycin analogs that may compete with transcription factors for binding.

The number of consensus sequences determined in the promoters of every down-regulated gene is presented as Supplementary data (Tables S2 and S3). Table S2 documents that MSK induced the down-regulation of genes that contain as much as 6

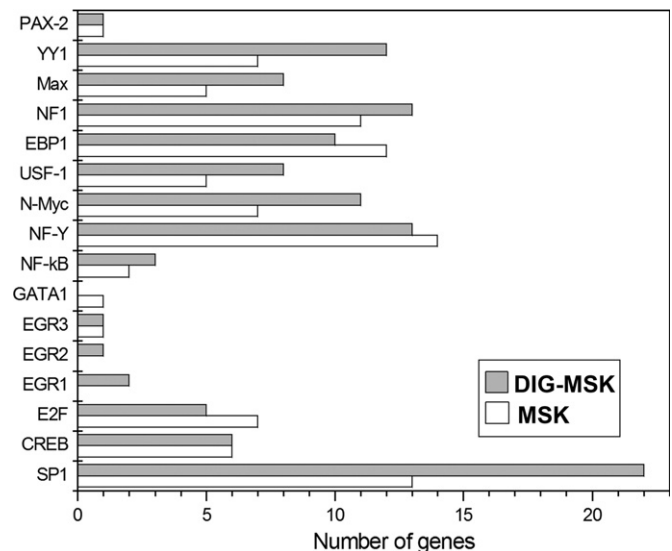


Fig. 3. Changes in gene expression. Number of genes whose expression is down-regulated by treatment with MSK or DIG-MSK, which contain in their (–600, +1) promoter region putative binding sites for the transcription factors indicated in the y-axis. Histograms indicate the presence of transcription-factor putative binding sites located in the promoter regions of the genes down-regulated by mithramycin analogs in the whole set of genes analyzed by qRT-PCR. Data were obtained using TELiS as described in the main text. Consensus sequences for the transcription factors shown in this figure are listed in Table 2.

Table 2

Compilation of transcription factors whose consensus binding sequences are represented in the promoter region of genes down-regulated in HCT116 cells upon treatment with MSK or DIG-MSK.

Transcription factor	Consensus sequence ^a
PAX-2	CCTCGTCACGCATGATGG(A/C)
YY1	CCGCGCCATCTTGGCTGCT
Max	AAA(A/C)CACGTGGTTT
NF1	TCTGGCAAGAAGCCAAA
EBP1	ACATTGC(A/G)TAATTA
USF-1	AGATCACGTGATCT
N-Myc	TCCCACGTGTC(A/C/G)
NF-Y	TAACCAATCAC
NF-kB	(A/G/T)GGGGA(A/C)TTCC(C/T)C
GATA1	AGG(A/C/G)AGATAA(C/G)CG(C/G)
EGR3	ATGCGTGGGCGT
EGR2	(A/T)TGCGTGGGCGT
EGR1	ATGCGTGGGCGT
E2F	TTT(C/G)GCCG
CREB	(C/T)(G/T)GGTGACGTCC
Sp1	GGGCGGGGT

^a Consensus sequences were retrieved from the analysis of the promoters of down-regulated genes using TELiS as described in the main text.

Sp1-binding sites (*MCM4*) or 4 sites (*MKI67* and *HPRT1*). Moreover, MSK might also inhibit the binding of other factors like GATA-1 or NF-Y (Fig. 3). Table S3 presents an equivalent analysis for the DIG-MSK effects on gene expression. Two of the genes regulated by this

compound (*CCNE1* and *CCNF*) bear a large number of putative Sp1 binding sites – 6 and 8 respectively – that can be challenged by this analog. Interestingly, *CCNF* codifies for cyclin F, a protein that regulates the nuclear localization of cyclin B1 through cyclin-cyclin interactions [46]. Its down-regulation by DIG-MSK provides us with an example of the high capacity of this novel mithramycin to down-regulate promoters that may be highly regulated by transcription factors that recognize C/G-rich sequences (Table 2). Down-regulation of cyclin E, together with the other changes in gene expression, was concordant with that most of the treated cells were arrested in the G1 phase of cell cycle up to 72 h of treatment, as described below. *CDK4*, a cyclin-dependent kinase gene [12], was clearly down-regulated regardless of the absence of Sp1-binding sequences. Nevertheless, its promoter contains 4 putative binding sites for each N-Myc, USF-1 and Max that could be challenged by the mithramycins.

According to the results presented in Fig. 3 and Tables S2 and S3, the transcription factors whose putative binding sites were widespread in the promoters of down-regulated genes are Sp1, NF-Y, NF1, and YY1, yet some differences exist in the number of genes and how frequently the putative protein binding sites are found among the genes down-regulated by each drug. DIG-MSK effects were stronger than of MSK in both the number of down-regulated genes and the capacity for challenging promoters that contained multiple transcription-factor binding sites (cf. Table 2 and Tables S2 and S3).

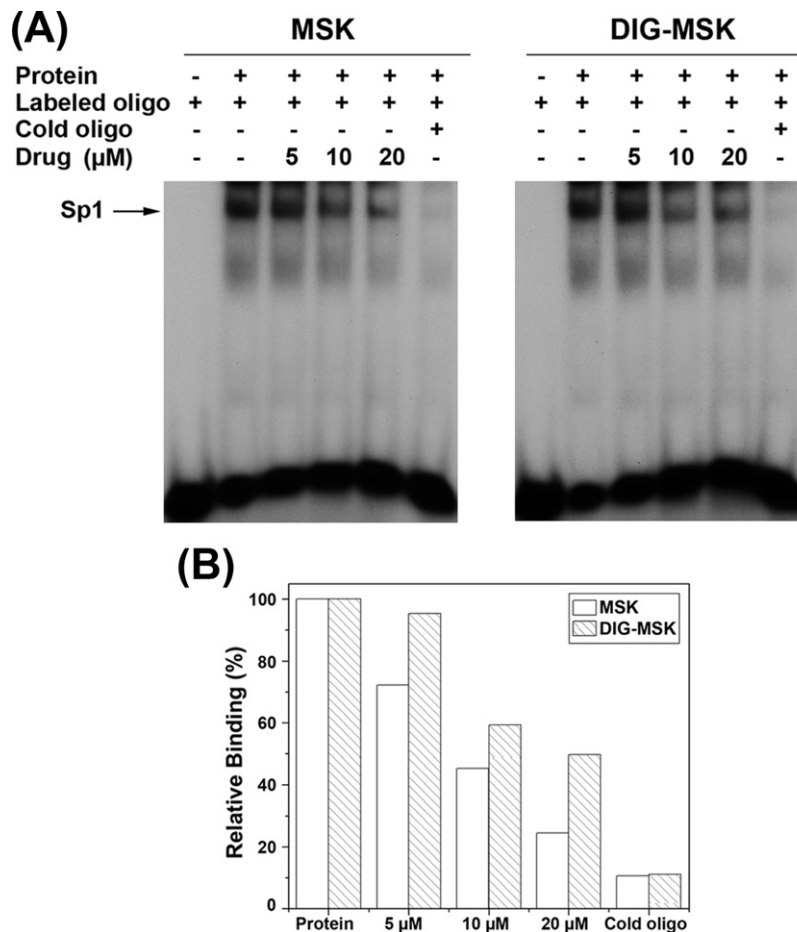


Fig. 4. Effect of MSK and DIG-MSK on the binding of Sp1 protein factor to a 22-mer duplex oligonucleotide encompassing a putative binding site. (A) Representative EMSA assays. The end-labeled duplex oligonucleotide was incubated with total protein cell extracts, and MSK or DIG-MSK at concentrations of 0 μM, 5 μM, 10 μM and 20 μM. The position of the Sp1-DNA complex is indicated, which was confirmed by using a large molar excess of cold duplex oligonucleotide. See the main text for further details. (B) Quantification of the relative binding of the protein in absence/presence of increasing concentrations of the compounds. The histograms depict average values obtained from two different EMSA experiments with similar results. MSK shows a strong effect on Sp1-DNA complexes.

Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.08.003>.

The interaction between the Sp1 transcription factor and its putative binding sites has been deeply characterized as a key target for several mithramycin analogs (see Sections 1 and 4). Given the higher percentage of Sp1 sites among the down-regulated genes, especially after treatment with DIG-MSK (Fig. 3), we sought a direct confirmation of DIG-MSK effect on Sp1–DNA interactions and compared it with MSK. Fig. 4A shows that MSK and DIG-MSK can directly interfere with the formation of Sp1–DNA complexes, although DIG-MSK was less effective than MSK in abrogating Sp1 binding to its putative binding site (Fig. 4B).

As mentioned above, 5 genes were significantly abrogated by both treatments. Interestingly, two of them lack of putative Sp1-binding sequence in their promoter region (*CKS2* and *TFDP1*), and thus the effect of the mithramycin analogs cannot be assigned to direct interference with Sp1 binding. However, *CKS2* contains putative binding sites for NF-Y, NF1 and CREB, which also recognize C/G-rich binding sequences (Table 2), and thereby potential binding sites for mithramycins. On the other hand, *TFDP1* contains, among others, three N-Myc consensus binding-sites and one NF1 and YY1 binding sites (Supplementary Tables S2 and S3).

Although we have paid greater attention to genes down-regulated after each treatment, consistent with the view of DNA-binding drugs as putative inhibitors of gene expression, it is also evident from the qRT-PCR analyses (Fig. 2 and Supplementary

Table S1) that there was also a small set of up-regulated genes after treatment with MSK or DIG-MSK. It is noteworthy that only *p21^{WAF1}/CDKN1A* was up-regulated by every treatment (Fig. 2B and Supplementary Table S1). The product of this gene is a cyclin kinase inhibitor involved in the arrest of cells in the G1 and G2/M checkpoints [12]. Moreover, *p53* was also up-regulated by DIG-MSK ($p = 0.056$; Supplementary Table S1). The up-regulation of *p53* may help to the enhancement of *p21^{WAF1}* expression as *p53* protein is known to activate the *p21^{WAF1}* proximal promoter [47]. The analysis of the corresponding protein levels, see Section 3.5, confirmed this idea.

3.5. Cell cycle distribution, changes in protein levels and cell death upon treatment

We sought to gain insights into how the down-regulation of a variety of genes related to cell cycle control, as well as the presence of up-regulated *p21^{WAF1}/CDKN1A*, can affect the distribution of HCT116 cells in the different phases of the cell cycle. Distribution of HCT116 cells after treatment with equitoxic concentrations of MSK and DIG-MSK was assessed (Fig. 5A and B) and connected to changes in levels of proteins known to be involved in the distribution of cells in the different phases of the cell cycle (Fig. 5C). By the same token, the analysis of protein levels allowed us to corroborate that the changes observed in gene transcription correlated, in turn, to changes in protein levels. In the set of genes

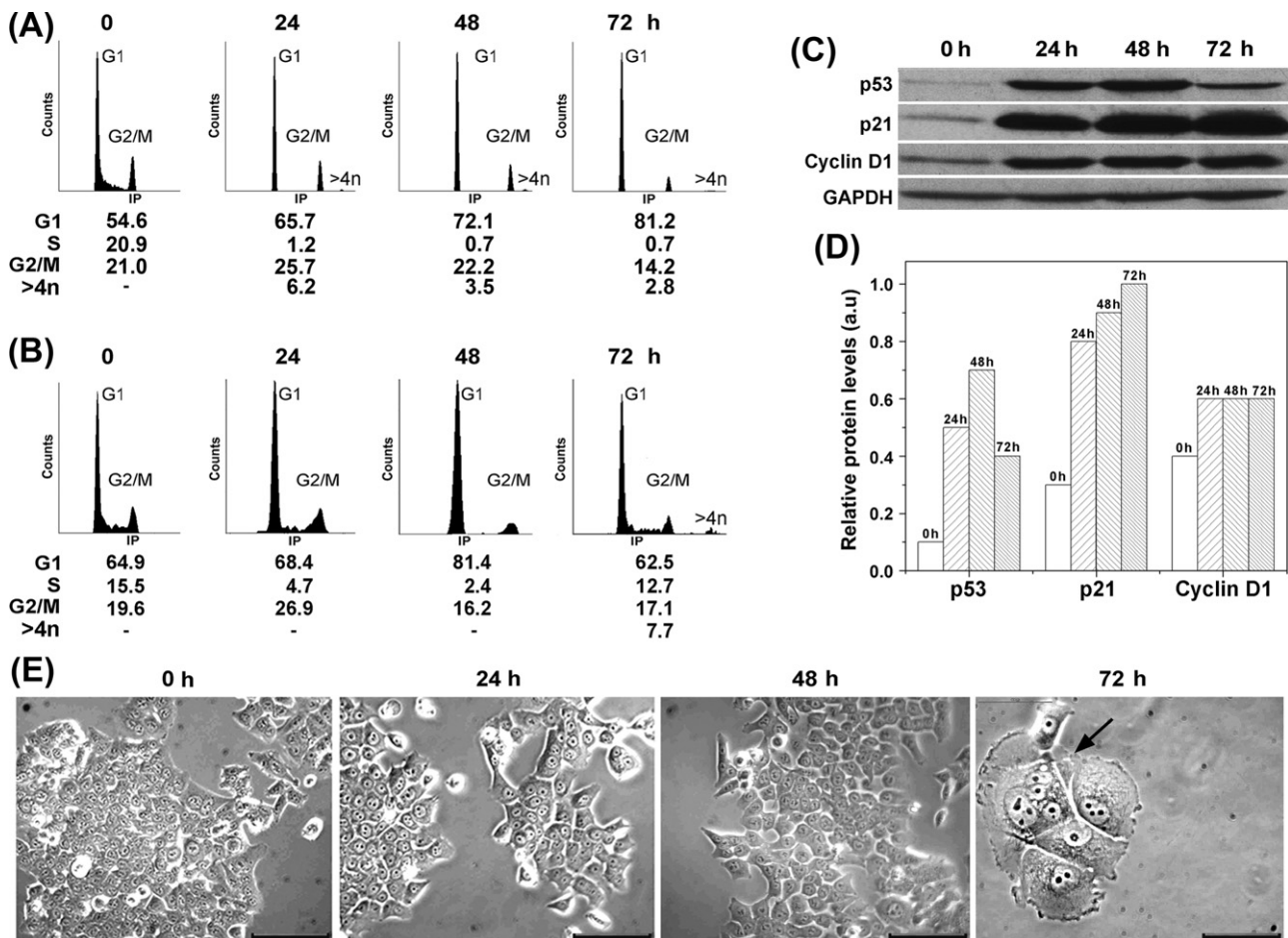


Fig. 5. Cell-cycle distribution and changes in protein levels. (A) Cell-cycle distribution of HCT116 cells after treatment with MSK. (B) Cell-cycle distribution of HCT116 cells after treatment with DIG-MSK. (C) Representative Western blots showing time-dependent changes in the levels of some protein involved in cell cycle checkpoint controls after treatment with DIG-MSK. Experiments were performed in duplicate with similar results. (D) Quantitative assessment of the changes in protein levels induced by DIG-MSK. Histograms are the average values obtained from two independent experiments like those shown in (C). (E) Phase-contrast microscopy of cells treated with DIG-MSK. The arrow in the 72-h panel indicates the presence of some multinucleate cells (about 8%, see panel (B)). Bars correspond to 50 μ m.

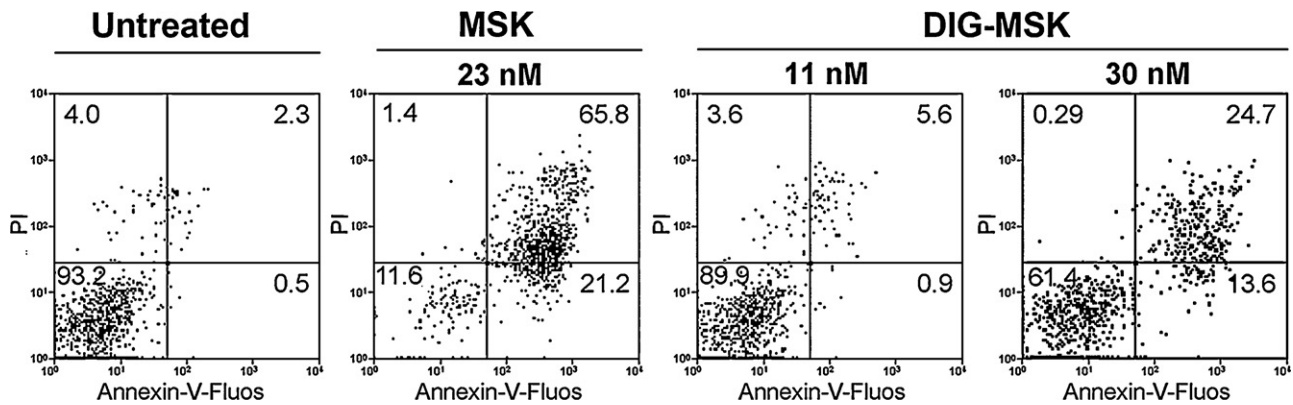


Fig. 6. Flow cytometry analysis of HCT116 cells stained with Annexin-V-fluorescein and PI (propidium iodide). Adherent (attached) and detached (floating) cell populations were pooled together and stained with Annexin-V-fluos and PI. Inside the panels there is the quantification of necrosis, either primary by lost of membrane ability to exclude PI (Annexin-V-/PI+) or in Annexin-V + PI + cells, together with primary apoptotic cell death (Annexin-V + PI-). This figure substantiates that 23 nM MSK (its IC_{75}) committed more cells to dying than 11 nM DIG-MSK (its IC_{75}) after 72-h continuous treatment. A higher DIG-MSK concentration, within the nanomolar range (30 nM), achieved about 50% cell death.

chosen for Western blot analysis, Fig. 5C and D shows time-dependent changes in p53, p21^{WAF1} and cyclin D protein levels, which were consistent with changes in the transcriptome and with that most of the cells were arrested in G1 phase up to 72-h treatments, with a decrease of p53 levels occurring after about 72 h. We also analyzed the final fate of cells treated with MSK or DIG-MSK that were overtaking G1 checkpoint after 72-h treatments. Fig. 5E shows that about 8% of the total cell population was multinucleated after treatment with DIG-MSK. Moreover, the morphology of MSK-treated HCT116 cells, which we have described previously [27], was not at variance with the presence of multinucleated cells upon treatment.

After treatment with the mithramycin analogs, most of the cells were halted at the G1 checkpoint, coincident with the presence of high levels of p21^{WAF1} protein (Fig. 5). Double staining of treated cells with Annexin-V-fluorescein and PI (Fig. 6) was used to determine the percentage of cell death by apoptosis and necrosis. The percentages of cell death produced by MSK or DIG-MSK were clearly different, with a higher degree of cell death produced by MSK, as detected cytometrically as both apoptotic and secondary necrosis (Fig. 6). Given that the MTT-assays, described in Section 3.1, indicated that DIG-MSK had a higher antiproliferative effect than MSK, the lower cell death observed upon 72-treatments would indicate that 11 nM DIG-MSK used to challenge gene transcription seemed to be cytostatic rather than cytotoxic, at these concentrations, in HCT116 colon carcinoma cells. Nevertheless, it is noteworthy that higher DIG-MSK concentrations, within the nanomolar range, achieved about 50% cell death (*cf.* the different panels in Fig. 6).

4. Discussion

Two major conclusions can be drawn from our quantitative analysis of the expression of genes involved in cell cycle control in human HCT116 colon carcinoma cells. First, MSK and DIG-MSK differentially alter the pattern of expression of cell cycle control genes. Second, although the inhibition of the binding of Sp1 to its putative binding sites by either drug (Fig. 4) is consistent with previous reports on the effects of mithramycins on Sp1-transactivated genes, the screening for the presence of putative binding sites for some transcription factors in the promoters of genes down-regulated by MSK or DIG-MSK reveals that other transcription factors, mainly those recognizing C/G-rich tracts (Table 2), can also be challenged by these compounds.

The analysis of transcripts affected by both drugs shows that each compound altered the expression of a different set of genes, with only 5 transcripts down-regulated by both analogs (Fig. 2B

and Table S1). The presence of genes affected by both MSK or DIG-MSK is not surprising because all mithramycin analogs bear the same chromophore (they generally differ by some changes in the alkyl chain at C-3 position) and they bind to C/G-rich tracts in DNA [25,26,30]. DIG-MSK differs from MSK in sugar E in the trisaccharide chain (Fig. 1), which only produces subtle differences in their DNA binding affinity (submitted for publication). Some examples exist of antitumor agents in which small changes in the molecular architecture can result in subtle differences in the mechanism of action, the levels of induced DNA damage or their respective pharmacological profiles, such as some anthracyclines [48] and enediynes [49]. In this context the difference in sugar E between MSK and DIG-MSK produces clear dissimilarities in their “anti-transcriptional” activity (Fig. 2 and Table S1) and potential antitumor properties [32].

The number and identity of the genes down-regulated by every analog was clearly different (Fig. 2), regardless of the very similar structure of these compounds (Fig. 1). Although for mithramycins DNA binding affinity and sequence selectivity are largely a property of the chromophore and its alkyl modifications [25,30,50], the presence of a modified sugar in DIG-MSK may be at the origin of the abrogation of a larger number of genes by disrupting more interactions between transcription factors and their consensus binding sites. Alternatively, DIG-MSK higher pharmacological activity, which has been evaluated *in vivo* using xenograft and hollow fiber assays [32], would result in a better drug availability to cells and on gene promoters.

Moreover, some genes were up-regulated after treatment; a property in which DIG-MSK also seems to have stronger effect than MSK. Gene over-expression can be caused by drug binding to promoters, but also it may be a consequence of indirect effects such as the cell response to stress, which can switch on certain genes that detect cell damage. The up-regulation of p53 and p21^{WAF1}/CDKN1A by DIG-MSK (Table S1) was consistent with that most of the human HCT116 colon carcinoma cells were halted at the G1 checkpoint after 72-h treatments. Only after p53 protein levels were reduced in a time-dependent way (Fig. 5C), some cells entered a faulty mitosis resulting in multinucleate cells (Fig. 5E). In this respect, the levels of p53, p21^{WAF1} and cyclin D proteins analyzed upon treatment with DIG-MSK are equivalent to those induced by treatment with MSK, which we have reported elsewhere [27]. The up-regulation of p21^{WAF1} expression by every compound suggests that they do not inhibit the recruitment of Sp1 to the p21^{WAF1} promoter, in agreement with previously published results demonstrating that the recruitment of Sp1 to the proximal p21^{WAF1} promoter is not compromised by MSK [36]. Nonetheless,

they are at variance with previous reports of the down-regulating effects of the parental MTA on $p21^{WAF1}$ expression under different experimental conditions in which plasmid constructions were analyzed in transfected cells rather than the expression of cell's genome [19].

Sp1 is member of a family of transcription factors that bind to G/C-rich promoter elements. The Sp family of proteins plays a critical role in growth and metastasis of many tumor types by regulating expression of cell cycle genes [51], as well as several genes in normal tissues and tumors [14,51]. Therefore, they are considered potential targets for cancer chemotherapy [6,14,52]. MSK and DIG-MSK visibly alter Sp1 binding to a duplex oligonucleotide encompassing a consensus sequence (Fig. 4), with a superior *in vitro* effect of MSK, in agreement with a tighter binding of MSK (submitted for publication). Nevertheless, the effects on Sp1-binding may differ *in vivo* (cultured cells) if the amount of DIG-MSK entering the cells were higher than of MSK, thus compensating partially the relatively reduced DNA binding of DIG-MSK. That hypothesis is concordant with the greater effect of DIG-MSK on transcription detected by qRT-PCR (Fig. 2).

Although challenging Sp1–DNA interactions is widely reckoned as a potential therapeutic target, the exact *in vivo* effect is not straightforward understandable because other members of the Sp-family of factors recognize similar, if not the same, sequences and they may have either activating or repressing activities depending on the physiological context [14,22]. In any case, challenging Sp1–promoter interactions would produce a more specific effect than Sp1 knockdown [22], in agreement with that targeting Sp1 binding to gene promoters by mithramycins is a reasonable approach to chemotherapy [20,21,38]. Besides, gene-selective inhibition of several Sp1-dependent genes by MTA and its analogs has been suggested to protect neurons from oxidative stress and death, which would indicate that mithramycins can act under certain circumstances in the crossroad between transformation and neurogeneration [36].

The main achievement of the present analysis of gene expression, aside from detecting differential effects on transcription of cell cycle control genes by MSK and DIG-MSK, is revealing that the interference of these analogs with more than one class of transcription factor might be involved in the changes observed in the transcriptome (Fig. 3 and Table 2). In this context, protein factors other than Sp1 have to be considered when interpreting MSK and DIG-MSK effects on the binding of other transcription factors to their respective consensus binding sequences on gene promoters. This point of view agrees with *in vitro* assays showing that some drugs block not only Sp1–DNA complexes but also E2F1–DNA complexes, thus inhibiting transcription [9,11]. Among the transcription factors whose transactivating capacity appears to be reduced by MSK or DIG-MSK (Fig. 3) it is interesting to mention YY1 (Fig. 3), a negative regulator of p53. YY1 is involved in a variety of biological processes, and its overexpression can affect to the clinical behavior of various cancers [53]. Consequently, challenging the interaction of YY1 with certain promoters may provide us with potential targets within the transcriptional network in cancer cells. DP1, the product of the *TFDP1* gene that is down-regulated by both mithramycin analogs, is known to form hetero- and homo-dimers in association with members of the E2F family, which cooperatively transactivate *c-myc* expression [54], a well known target of MTA [18]. Another gene down-regulated by both compounds is *CSK2*. This gene has been associated with the metastatic capacity of colon cancer [55], thus representing a potential *in vivo* target for MSK and DIG-MSK.

Whatever specificity exists in the interaction between either MSK or DIG-MSK and gene promoters, the capacity of these compounds to recognize distinct 4–5 bp-long nucleotide sequences, and to displace transcription factors from putative

binding sites would depend on a dynamic equilibrium between drug and protein binding to consensus sequences and, presumably, the chromatin state (DNA accessibility) of a particular gene during drug treatment. In this respect, a major difficulty in interpreting gene expression data resulting from chemotherapeutic intervention lies in evaluating and differentiating transcriptional changes arising from direct competition of each drug for a particular promoter from those that reflect that cell cycle regulation shares diverse pathways [15,16]. Two examples of these difficulties are clearly highlighted by our results. They are the up-regulation of $p21^{WAF1}$, regardless of the presence of Sp1-binding elements in its promoter [47]. Moreover, some protein factors that could be challenged by mithramycins in promoters of cell cycle control genes do not encompass C/G-rich regions required for the sequence-selective binding of MTA and its analogs to DNA ([24,25] and references therein). In any case, the abrogation of their binding, either directly or indirectly, would be required to obtain the observed down-regulation. It has been shown, using several complementary techniques [25,26,30,50] that MTA and MSK bind to very similar sequences with quite close affinities. Nevertheless, differences in their effect on gene transcription have been described, with a better profile for MSK [17]. Here, we have reported a superior “anti-transcriptional” effect of DIG-MSK in HCT116 colon carcinoma cells. Currently, DIG-MSK is being explored as a candidate for the treatment of colon cancer using tumor xenografts in nude mice [32].

Conflict of interests

FM, JAS and CM report ownership of stock in EntreChem SL. LEN and FM are employees of EntreChem SL. All other authors declare they have no conflict of interests.

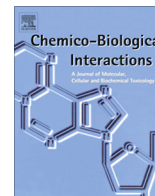
Acknowledgments

This work was supported by grant BFU2010-15518 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, and the FEDER program of the European Community, and it was performed within the framework of the “Xarxa de Referència en Biotecnologia” of the Generalitat de Catalunya. Carolina Vizcaíno is recipient of a JAE-Predoc2010 fellowship (CSIC), co-financed by the European Social Fund.

References

- [1] Lemon B, Tjian R. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 2000;14:2551–69.
- [2] Karamouzis MV, Gorgoulis VG, Papavassiliou AG. Transcription factors and neoplasia: vistas in novel drug design. *Clin Cancer Res* 2002;8:949–61.
- [3] Brown L, Boswell S, Raj L, Lee SW. Transcriptional targets of p53 that regulate cellular proliferation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2007;17:73–85.
- [4] Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2002;2:188–200.
- [5] Nickols NG, Jacobs CS, Farkas ME, Dervan PB. Modulating hypoxia-inducible transcription by disrupting the HIF-1–DNA interface. *ACS Chem Biol* 2007;2:561–71.
- [6] Mansilla S, Portugal J. Sp1 transcription factor as a target for anthracyclines: Effects on gene transcription. *Biochimie* 2008;90:976–87.
- [7] Lee K, Qian DZ, Rey S, Wei H, Liu JO, Semenza GL. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:2353–8.
- [8] Juven-Gershon T, Kadonaga JT. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev Biol* 2010;339:225–9.
- [9] Chiang SY, Azizkhan JC, Beerman TA. A comparison of DNA-binding drugs as inhibitors of E2F1- and Sp1–DNA complexes and associated gene expression. *Biochemistry* 1998;37:3109–15.
- [10] Gniazdowski M, Denny WA, Nelson SM, Czyz M. Effects of anticancer drugs on transcription factor–DNA interactions. *Expert Opin Ther Targets* 2005;9:471–89.
- [11] Portugal J, Mansilla S, Vizcaíno C, Barceló F. Promoter-specific transcriptional interference by DNA-binding drugs. Recent research developments in biochemistry, vol. 8. Kerala: Research Signpost; 2011. pp. 45–63.

- [12] Sánchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins CDKs, and cell cycle control. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16:311–21.
- [13] Witzel I-I, Koh LF, Perkins ND. Regulation of cyclin D1 gene expression. *Biochem Soc Trans* 2010;38:217–22.
- [14] Wierstra I. Sp1: Emerging roles—beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;372:1–13.
- [15] Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 2000;24:236–44.
- [16] Mansilla S, Piña B, Portugal J. Daunorubicin-induced variations in gene transcription: commitment to proliferation arrest, senescence and apoptosis. *Biochem J* 2003;372:703–11.
- [17] Albertini V, Jain A, Vignati S, Napoli S, Rinaldi A, Kwee I, et al. Novel GC-rich DNA-binding compound produced by a genetically engineered mutant of the mithramycin producer *Streptomyces argillaceus* exhibits improved transcriptional repressor activity: implications for cancer therapy. *Nucleic Acids Res* 2006;34:1721–34.
- [18] Snyder RC, Ray R, Blume S, Miller DM. Mithramycin blocks transcriptional initiation of the c-myc P1 and P2 promoters. *Biochemistry* 1991;30:4290–7.
- [19] Koutsodontis G, Kardassis D. Inhibition of p53-mediated transcriptional responses by mithramycin A. *Oncogene* 2004;23:9190–200.
- [20] Wang L, Guan X, Zhang J, Jia Z, Wei D, Li Q, et al. Targeted inhibition of Sp1-mediated transcription for antiangiogenic therapy of metastatic human gastric cancer in orthotopic nude mouse models. *Int J Oncol* 2008;33:161–7.
- [21] Previdi S, Malek A, Albertini V, Riva C, Capella C, Brogini M, et al. Inhibition of Sp1-dependent transcription and antitumor activity of the new aureolic acid analogues mithramycin SDK and SK in human ovarian cancer xenografts. *Gynecol Oncol* 2010;118:182–8.
- [22] Mansilla S, Priebe W, Portugal J. Changes in gene expression induced by Sp1 knockdown differ from those caused by challenging Sp1 binding to gene promoters. *Biochim Biophys Acta* 2011;1809:327–36.
- [23] DeVita VTJ, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: principles & practice of oncology*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA; 2005.
- [24] Hampshire AJ, Fox KR. The effects of local DNA sequence on the interaction of ligands with their preferred binding sites. *Biochimie* 2008;90:988–98.
- [25] Mansilla S, Garcia-Ferrer I, Méndez C, Salas JA, Portugal J. Differential inhibition of restriction enzyme cleavage by chromophore-modified analogues of the antitumor antibiotics mithramycin and chromomycin reveals structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 2010;79:1418–27.
- [26] Remsing LL, González AM, Nur-e-Alam M, Fernández-Lozano MJ, Braña AF, Rix U, et al. Mithramycin SK, A novel antitumor drug with improved therapeutic index, mithramycin SA, and demycarosyl-mithramycin SK: three new products generated in the mithramycin producer *Streptomyces argillaceus* through combinatorial biosynthesis. *J Am Chem Soc* 2003;125:5745–53.
- [27] Bataller M, Méndez C, Salas JA, Portugal J. Mithramycin SK modulates ploidy and cell death in colon carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7:2988–97.
- [28] Baig I, Perez M, Braña AF, Gomathinayagam R, Damodaran C, Salas JA, et al. Mithramycin analogues generated by combinatorial biosynthesis show improved bioactivity. *J Nat Prod* 2008;71:199–207.
- [29] Pérez M, Baig I, Braña AF, Salas JA, Rohr J, Méndez C. Generation of new derivatives of the antitumor antibiotic mithramycin by altering the glycosylation pattern through combinatorial biosynthesis. *Chembiochem* 2008;29:2295–304.
- [30] Barceló F, Ortiz-Lombardía M, Martorell M, Oliver M, Méndez C, Salas JA, et al. DNA binding characteristics of mithramycin and chromomycin analogues obtained by combinatorial biosynthesis. *Biochemistry* 2010;49:10543–52.
- [31] García B, González-Sabín J, Menéndez N, Braña AF, Nuñez LE, Moris F, et al. The chromomycin CmmA acetyltransferase: a membrane-bound enzyme as a tool for increasing structural diversity of the antitumor mithramycin. *Microb Biotechnol* 2011;4:226–38.
- [32] Núñez LE, Nybo SE, González-Sabín J, Pérez M, Menéndez N, Braña AF, et al. A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis. *J Med Chem* 2012;55:5813–25.
- [33] Lampronti I, Bianchi N, Zuccato C, Dall'acqua F, Vedaldi D, Viola G, et al. Increase in gamma-globin mRNA content in human erythroid cells treated with angelicin analogs. *Int J Hematol* 2009;90:318–27.
- [34] Hagiwara H, Iyo M, Hashimoto K. Mithramycin protects against dopaminergic neurotoxicity in the mouse brain after administration of methamphetamine. *Brain Res* 2009;1301:189–96.
- [35] Gao Y, Jia Z, Kong X, Li Q, Chang DZ, Wei D, et al. Combining betulinic acid and mithramycin effectively suppresses pancreatic cancer by inhibiting proliferation, invasion, and angiogenesis. *Cancer Res* 2011;71:5182–93.
- [36] Sleiman SF, Langley BC, Basso M, Berlin J, Xia L, Payappilly JB, et al. Mithramycin is a gene-selective Sp1 inhibitor that identifies a biological intersection between cancer and neurodegeneration. *J Neurosci* 2011;31:6858–70.
- [37] Jia Z, Zhang J, Wei D, Wang L, Yuan P, Le X, et al. Molecular basis of the synergistic antiangiogenic activity of bevacizumab and mithramycin A. *Cancer Res* 2007;67:4878–85.
- [38] Malek A, Nuñez LE, Magistri M, Brambilla L, Jovic S, Carbone GM, et al. Modulation of the activity of Sp transcription factors by mithramycin analogues as a new strategy for treatment of metastatic prostate cancer. *PLoS One* 2012;7:e35130.
- [39] Bataller M, Méndez C, Salas JA, Portugal J. Cellular response and activation of apoptosis by mithramycin SK in p21^{WAF1}-deficient HCT116 human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 2010;292:80–90.
- [40] Villamarín S, Mansilla S, Ferrer-Miralles N, Priebe W, Portugal J. A comparative analysis of the time-dependent antiproliferative effects of daunorubicin and WP631. *Eur J Biochem* 2003;270:764–70.
- [41] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611–22.
- [42] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- [43] Mi H, Dong Q, Muruganujan A, Gaudet P, Lewis S, Thomas PD. PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Res* 2010;38. D204-D10.
- [44] Chang JT, Nevins JR. GATHER: a systems approach to interpreting genomic signatures. *Bioinformatics* 2006;22:2926–33.
- [45] Cole SW, Yan W, Galic Z, Arevalo J, Zack JA. Expression-based monitoring of transcription factor activity: the TELIS database. *Bioinformatics* 2005;21:803–10.
- [46] Kong M, Barnes EA, Ollendorff V, Donoghue DJ. Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *EMBO J* 2000;19:1378–88.
- [47] Koutsodontis G, Moustakas A, Kardassis D. The role of Sp1 family members, the proximal GC-rich motifs, and the upstream enhancer region in the regulation of the human cell cycle inhibitor p21^{WAF1}/Cip1 gene promoter. *Biochemistry* 2002;41:12771–84.
- [48] Kizek R, Adam V, Hrabeta J, Eckschlager T, Smutny S, Burda JV, et al. Anthracyclines and ellipticines as DNA-damaging anticancer drugs: recent advances. *Pharmacol Ther* 2012;133:26–39.
- [49] Kennedy DR, Ju J, Shen B, Beeram TA. Designer enediynes generate DNA breaks, interstrand cross-links, or both, with concomitant changes in the regulation of DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:17632–37.
- [50] Barceló F, Scotta C, Ortiz-Lombardía M, Méndez C, Salas JA, Portugal J. Entropically-driven binding of mithramycin in the minor groove of C/G-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 2007;35:2215–26.
- [51] Safe S, Abdelrahim M. Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer* 2005;41:2438–48.
- [52] Jutooru I, Chadalapaka G, Lei P, Safe S. Inhibition of NFκB and pancreatic cancer cell and tumor growth by curcumin is dependent on specificity protein down-regulation. *J Biol Chem* 2010;285:25332–44.
- [53] Castellano G, Torrisi E, Ligresti G, Malaponte G, Militello L, Russo AE, et al. The involvement of the transcription factor Yin Yang 1 in cancer development and progression. *Cell Cycle* 2009;8:1367–72.
- [54] Majello B, De Luca P, Suske G, Lania L. Differential transcriptional regulation of c-myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins. *Oncogene* 1995;10:1841–8.
- [55] Fritzmann J, Morkel M, Besser D, Budczies J, Kosel F, Brembeck FH, et al. A colorectal cancer expression profile that includes transforming growth factor beta inhibitor BAMBI predicts metastatic potential. *Gastroenterology* 2009;137:165–75.



The activity of a novel mithramycin analog is related to its binding to DNA, cellular accumulation, and inhibition of Sp1-driven gene transcription



Azahara Fernández-Guizán^a, Sylvia Mansilla^b, Francisca Barceló^c, Carolina Vizcaíno^b, Luz-Elena Núñez^d, Francisco Morís^d, Segundo González^a, José Portugal^{b,*}

^a Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo, E-33006 Oviedo, Spain

^b Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

^c Departament de Biologia Fundamental i Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, E-07122 Palma de Mallorca, Spain

^d EntreChem SL, Edificio Científico Tecnológico, Campus El Cristo, E-33006 Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 March 2014

Received in revised form 25 April 2014

Accepted 27 May 2014

Available online 4 June 2014

Keywords:

Cell Uptake
DNA-binding
Mithramycin
Ovarian cancer
Transcription

ABSTRACT

DIG-MSK (demycarosyl-3D-β-D-digitoxosyl-mithramycin SK) is a recently isolated compound of the mithramycin family of antitumor antibiotics, which includes mithramycin A (MTA) and mithramycin SK (MSK). Here, we present evidence that the binding of DIG-MSK to DNA shares the general features of other mithramycins such as the preference for C/G-rich tracts, but there are some differences in the strength of binding and the DNA sequence preferentially recognized by DIG-MSK. We aimed at gaining further insights into the DIG-MSK mechanism of action by direct comparison with the effects of the parental MTA. Similar to MTA, MSK and DIG-MSK accumulated rapidly in A2780, IGROV1 and OVCAR3 human ovarian cancer cell lines, and DIG-MSK was a potent inhibitor of both basal and induced expression of an Sp1-driven luciferase vector. This inhibitory activity was confirmed for the endogenous *Sp1* gene and a set of Sp-responsive genes, and compared to that of MTA and MSK. Furthermore, DIG-MSK was stronger than MTA as inhibitor of Sp3-driven transcription and endogenous *Sp3* gene expression. Differences in the effects of MTA, MSK and DIG-MSK on gene expression may have a large influence on their biological activities.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Mithramycin A (MTA) is an aureolic acid-type polyketide antibiotic produced by various species of *Streptomyces* [1], which has been used in the treatment of Paget's disease and advanced testicular carcinoma [2]. However, it showed numerous toxic side effects, including severe hepatotoxicity [3], which have limited its clinical use. The activity of MTA has been associated with its ability to bind to G/C-rich DNA regions via the minor groove [4–7]. It inhibits transcription both *in vivo* and *in vitro* by interfering with protein–DNA interactions [8,9].

Abbreviations: DIG-MSK, demycarosyl-3D-β-D-digitoxosyl-mithramycin SK; MSK, mithramycin SK; MTA, mithramycin A; Sp1, specificity protein 1; Sp3, specificity protein 3; TSA, trichostatin A; ULBP1, UL16-binding protein 1.

* Corresponding author. Address: Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac, 10, E-08028 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 403 4959; fax: +34 93 403 4979.

E-mail address: jpbmcb@ibmb.csic.es (J. Portugal).

The genetic organization of the MTA biosynthesis gene cluster has been studied in detail, and the MTA biosynthetic pathway has been used to produce new compounds with enhanced biological characteristics [1,4,10–13]. Given the toxicity of MTA, the availability of analogs showing both lower toxicity and higher biological activity opens new possibilities for therapeutic applications [13,14]. Recently, two new analogs named mithramycin SK (MSK) and DIG-MSK (demycarosyl-3D-β-D-digitoxosyl-mithramycin SK; EC-8042) (Fig. 1) have been obtained. MSK and DIG-MSK show similar *in vivo* and *in vitro* antitumor activities, but DIG-MSK is less toxic than MSK and, at least, one order of magnitude less toxic than MTA [13]. In mice, the single maximum tolerated dose of DIG-MSK is the highest among the mithramycin analogs [13]. Furthermore, the *in vivo* evaluation of DIG-MSK antitumor activity through hollow fiber assays using 12 tumor cell lines and cancer xenograft models indicates that this compound could be a promising antitumor drug against colon, breast, ovarian, melanoma, non-small-cell lung and central nervous system cancers [13].

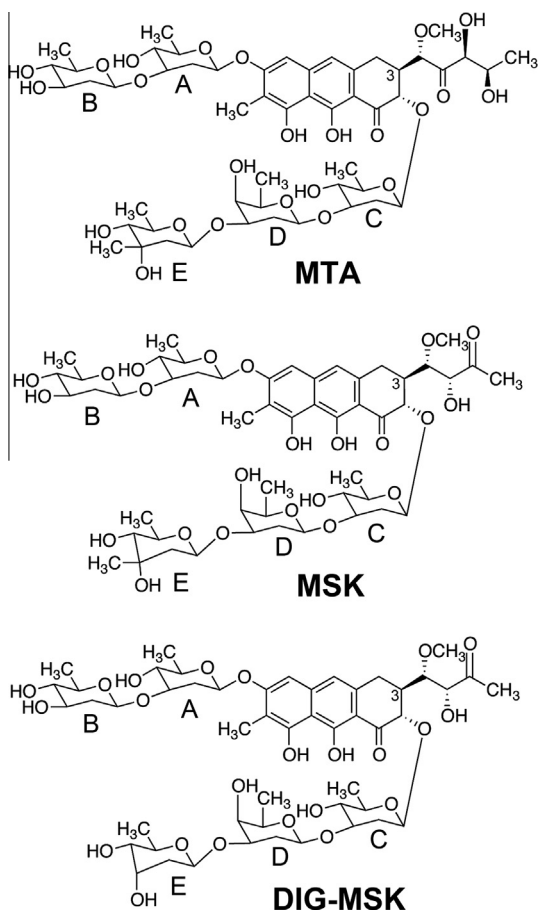


Fig. 1. Chemical formulae of mithramycin A (MTA), mithramycin SK (MSK) and demycarosyl-3D-β-D-digitoxosyl-mithramycin SK (DIG-MSK). MTA differs from the other two analogs in the side chain linked to C-3. MSK and the structurally related DIG-MSK differ in sugar E in the trisaccharide moiety.

We have reported that several mithramycin analogs show differences in both the magnitude of their binding to DNA and the exact composition of their C/G-rich preferred binding sites. These differences might depend on the composition of their respective side chains attached at C-3 [15,16].

Here, we compare the effects of MTA and the structurally related analogs DIG-MSK and MSK on DNA binding and cellular and nuclear accumulation in A2780, IGROV1 and OVCAR3 human ovarian cancer cell lines. MSK has profound effects on the growth and survival of those ovarian cancer cells [17], including A2780 xenografts [18], as well as on other cancer cells [19].

Several transcription factors that recognize C/G-rich tracts in promoters have been identified as potential targets for MSK and DIG-MSK, thus providing further evidence on the “transcription factor-based” action of mithramycin analogs [14,17,20]. The levels of Sp1 transcription factor are frequently altered in numerous human cancers [21], and the expression of Sp1 is enhanced in ovarian cancer [18]. Because MSK is a potent inhibitor of Sp1-dependent transcription both *in vitro* and in tumor xenografts [18], we explore the effects of structurally related DIG-MSK on Sp1-mediated transcription. We aimed at gaining further insights into the DIG-MSK mechanism of action by direct comparison with the effects of the parental MTA, a compound that is routinely used in different experimental systems to assess the role of the Sp1 transcription factor in gene expression, and the function of this transcription factor in cancer (see, [22–24], and references therein) as well as to abrogate Sp1 expression *in vivo* [9]. Furthermore, we examine the effect of these mithramycins on Sp3, another member

of the Sp-family of transcription factors which also binds with similar affinity to C/G-rich sequences [25]. To this end, the effect of MTA and DIG-MSK on *ULBP1* promoter activity and gene expression was also analyzed. *ULBP1* is a ligand of the NKG2D receptor expressed by NK and T cells, which is involved in the immune surveillance of cancer [26,27], and it is a predictor of poor prognosis in ovarian cancer [28]. The effects of mithramycin analogs on the *ULBP1* promoter activity are of interest because this is one of the few genes in which Sp3, but not Sp1, is a key gene regulator, increasing more than 500-fold the *ULBP1* promoter activity [26,27]. We observed that the effect of the novel DIG-MSK on transcription depends on the cell line examined and, in general, it is equivalent, or even stronger, than the parental MTA.

2. Materials and methods

2.1. Mithramycins

Mithramycin A (MTA), mithramycin SK (MSK) and demycarosyl-3D-β-D-digitoxosyl-mithramycin SK (DIG-MSK; EC-8042) were isolated and purified from the producing organisms as described previously [4,13], and their purity ($\geq 97\%$) was checked by HPLC. Stock solutions of the different compounds were prepared at either 10 mM in DMSO or 500 μM in 50 mM NaCl, 20 mM Hepes (pH 7.5), kept at -20°C , and diluted to the desired concentration before the experiments, using the same buffer or tissue culture medium. When required for the different experiments, MgCl_2 was added to the same buffer at various concentrations in the 1 to 3 mM range.

2.2. Fluorescence spectroscopy

Fluorescence spectroscopy experiments were carried out in a Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer (Varian Inc.) using 1-cm pathlength, as described previously [16] with minor modifications. In brief, DNA binding was measured by fluorescence titration (λ_{ex} : 410 nm, λ_{em} : 548 nm) of 22 μM solutions of DIG-MSK dissolved in 50 mM NaCl, 20 mM Hepes (pH 7.5) containing either 1, 1.5 or 3 mM MgCl_2 and incubated for 1 h at 25°C or 37°C to ensure the Mg^{2+} -mediated dimerization of the compounds. Small aliquots of sonicated calf thymus DNA (Sigma) in the same buffer were added to the drug solutions and the fluorescence spectra obtained after 3 min equilibrium at both 25°C and 37°C .

2.3. Thermal denaturation studies

Ultraviolet DNA melting curves were determined using a Jasco V-650 spectrophotometer equipped with an ETC-505T (Jasco) temperature controller. Samples contained 20 μM (in bp) sonicated calf thymus DNA (Sigma) and either MTA, MSK or DIG-MSK to obtain drug/DNA molar ratios of 0.25 (enough to saturate the potential drug-binding sites [16]) in 50 mM NaCl, 20 mM Hepes (pH 7.5) containing 1 mM MgCl_2 . The samples were equilibrated at 25°C for 30 min and then heated at a rate of 1°C min^{-1} , while continuously monitoring the absorbance at 260 nm. The Spectra Manager software (Jasco) was used to analyze the data and to calculate the DNA melting temperature (T_m).

2.4. Restriction enzyme cleavage assays

The effects of the different mithramycin analogs on the first-order rate constant at the individual restriction enzyme sites were determined as described elsewhere [15]. In brief, plasmid pBR322 was linearized by cleavage with *Bam*HI (Fermentas). *Bsp*68I (*Nru*I) and *Eco*52I (*Eag*I) from Fermentas were used for restriction enzyme

assays using the buffers supplied by the vendor. These two enzymes cleave the pBR322 plasmid at unique sites. DNA cleavage reactions containing 40 μ M (in bp) DNA and 8 μ M MTA, MSK or DIG-MSK (corresponding to a 0.20 drug/DNA (bp) molar ratio) were pre-incubated at 25 °C for 20 min, and the cleavage reactions initiated at 37 °C by the addition of the appropriate enzyme. Time-course digestion products were resolved by electrophoresis on 1.2% agarose gels. After running, the gels were stained with ethidium bromide, documented using a GeneGenius Biolmaging system and quantified. Linear-least-squares fit of the logarithm of the relative amount of uncut DNA versus time renders the first-order rate constant for cleavage at each restriction site [29].

2.5. Cell culture

A2780, OVCAR3 and IGROV1 human ovarian carcinoma cell lines were grown in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Invitrogen), 2 mM L-glutamine, 1 mM pyruvate, and 200 μ g/ml gentamicin, at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

2.6. Cellular accumulation of mithramycin analogs

Ovarian cancer cells (1×10^4 cells) were incubated in RPMI 1640 medium with either DMSO or 100 μ M of each mithramycin analog. After 2 and 4 h incubation, cells were repeatedly washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), harvested and immediately analyzed using a BD FACSCanto flow cytometer. Isolation of intact nuclei was carried out as described elsewhere [17]. Nuclei yield and integrity were confirmed by Trypan blue staining and microscopic examination.

2.7. Transient transfections and luciferase reporter assays

A2780, OVCAR 3 and IGROV1 cells were transfected with 300 ng of the TransLucent Sp1 reporter (Sp1-Luc) from Panomics or the ULBP1 reporter [26] and 12 ng of pRL-null vector (Promega) as internal control, by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's recommendations. Briefly, 5×10^3 cells were transfected in 12-well plates, and 200 nM MTA or DIG-MSK—a concentration that would reduce cell population by 90% after 72-h treatments, according to Trypan blue staining—were assayed as inhibitors of Sp-driven transcription, which was examined after 24-h, when most of the cells remained viable. For experiments carried out in the presence of the deacetylase inhibitor TSA (trichostatin A, Sigma), this compound was prepared in DMSO and added to cells at 500 nM, followed by addition of 200 nM MTA or DIG-MSK. Cultures containing the same amount of DMSO were used as controls for the different experiments. Each mithramycin analog was added 4 h after DNA transfections, either in the absence or in presence of TSA, and the expression levels analyzed after 24 h. To assess the effect of the mithramycins on cells overexpressing either Sp1 or Sp3, the different cell lines were co-transfected with 400 ng of either pN3-Sp1FL or pN3-Sp3FL expression plasmids and pN3 empty vector (used to normalize for the transfection efficiency)—all of them kindly supplied by Dr. G. Suske (Philipps-Universität Marburg, GE)—, together with 100 ng of the Sp1-Luc reporter (Panomics) by using the protocol described above (this reporter vector contains a C/G-rich box that can be also recognized by other members of the Sp-family of transcription factors). Each mithramycin analog (200 nM final concentration) was added 4 h after DNA transfections. Luciferase activity was assayed using the Dual Luciferase Reporter System (Promega) and a Turner BioSystems TD20/20 luminometer.

2.8. Quantitative real-time RT-PCR assays

Total RNA was isolated from control cells (those to which no drug was added) and from cells treated with MTA, MSK or DIG-MSK for either 8 h or 24 h, depending on the experiment (see Section 3). Total RNA was extracted from cells using the High Pure RNA Isolating kit (Roche Diagnostics) and cDNA was obtained using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocols. Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) experiments were performed in either a 7900HT Real-Time System (Applied Biosystems), using the SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), or in a Roche Light-Cycler 480, using the SYBR-Green PCR Master Mix (Roche Diagnostics). The primers used for qRT-PCR are shown in Table 1. PCR conditions included an initial denaturation step at 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 20 s and an annealing step at 60 °C for 30 s, and an elongation step at 72 °C for 30 s. A final dissociation curve was generated to verify that a single product was amplified. Reactions in the absence of template and in the absence of enzyme were also included as negative controls. Relative expression values of the different genes were calculated from the threshold cycle (C_t) following the $\Delta\Delta C_t$ method using *GAPDH* as an internal housekeeping control for gene expression normalization.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS v.20 (IBM Corp.) software. Results represent the mean \pm SD, or mean \pm SEM, values of three to six experiments. Two sample group differences were evaluated using the Student's *t*-test. Depending on the data characteristics and the number of independent experiments performed, multiple group comparison were assessed by either Kruskal–Wallis one-way analysis of variance and further pairwise Mann–Whitney *U* test analysis, or by one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

3. Results

3.1. The binding of DIG-MSK to DNA shows some differences compared to that of other mithramycins

As a first approach, we explored the binding of MTA, MSK and DIG-MSK to DNA by monitoring changes in DNA melting temperature (T_m) calculated from absorbance (at 260 nm) versus temperature melting curves in the presence of mithramycin analogs (Table 2). The raise of T_m values obtained at a 0.25 drug/DNA (bp) molar ratio that corresponds to a binding stoichiometry of

Table 1

Primers used for qRT-PCR analysis of the expression of some endogenous genes in human ovarian carcinoma cell lines. The housekeeping gene *GAPDH* was used for data normalization.

GENE	Primers
<i>Sp1</i>	forward: 5'-AGAATTGAGTACCCCAATGAGAACA-3' reverse: 5'-GTTGTGTGGCTGTGAGGTCAAG-3'
<i>Sp3</i>	forward: 5'-CCAGGATGTGGTAAAGTCTA-3' reverse: 5'-CTCCATTGTCTCATTTCAG-3'
<i>CCNB1</i>	forward: 5'-CAGGATAATTGTGTGCCCAAGA-3' reverse: 5'-TGCCAGTGACACCAACCAGT-3'
<i>VEGF-C</i>	forward: 5'-CTACAGATGTGGGGTTGCT-3' reverse: 5'-GCTGCTGACACTGTGGTAA-3'
<i>E2F1</i>	forward: 5'-AAGCGGCGCATCTATGACAT-3' reverse: 5'-AATGAGCTGGATGCCTCAA-3'
<i>ULBP1</i>	forward: 5'-ATCAGCGCCTCTGTCCAC-3' reverse: 5'-AAAGACAGTGTGTGTCGACCCAT-3'
<i>GAPDH</i>	forward: 5'-CTCTGCCCTCTGCTGAT-3' reverse: 5'-CTTCTCATGGTTCACCCCATG-3'

Table 2

Effects of mithramycin A (MTA), mithramycin SK (MSK) and demycarosyl-3D- β -digitoxosyl-mithramycin SK (DIG-MSK) on the melting temperature of calf thymus DNA (Tm).^a

	r ^b	Tm (°C) ^c	Δ Tm (°C)
DNA	—	86.9 \pm 0.3	—
MTA	0.25	90.2 \pm 0.4	3.3
MSK	0.25	89.0 \pm 0.5	2.1
DIG-MSK	0.25	87.6 \pm 0.3	0.7

^a DNA melting curves were measured in 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 20 mM Hepes (pH 7.5).

^b r = drug/DNA (bp) molar ratios; r = 0.25 corresponds to a binding stoichiometry of 4 mol of bp per mol of drug, enough to saturate the potential binding sites [16].

^c Mean \pm SD values from three independent experiments.

4 mol of DNA (bp) per mol of drug—enough to saturate the potential G/C-rich binding sites in heterogeneous DNA [16]—indicated that all mithramycins bind to DNA and that the parental MTA binds tighter than MSK or DIG-MSK.

Fluorescence titration experiments showed that DIG-MSK solutions titrated with increased concentration of calf thymus DNA behaved rather different in experiments performed at 25 °C (Fig. 2A) and at 37 °C (Fig. 2B). While at 25 °C fluorescence increased after adding higher concentrations of DNA, the same kind of experiments carried at 37 °C showed that fluorescence was quenched. Moreover, after that an \sim 5–6 DNA(bp)/drug molar ratio was reached there was no significant increase/decrease in fluorescence at either temperature, and therefore it was not possible to obtain experimental values that could be used to fit accurately binding models that require the emission intensity to be linearly proportional to the concentration of the drug [16]. These results did not depend on the MgCl₂ concentration used (see Sec-

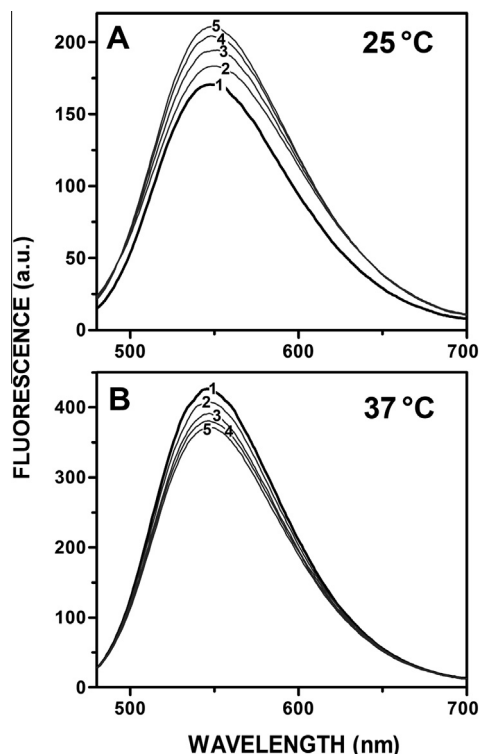


Fig. 2. DIG-MSK binds to DNA. Fluorescence spectra of the complexes formed between Mg²⁺-coordinated DIG-MSK dimers and DNA in 50 mM NaCl, 20 mM Hepes (pH 7.5) buffer containing 1.5 mM MgCl₂ at 25 °C (A) and 37 °C (B). The different complexes correspond to the titration of 22 μ M compound (line 1) with 45, 70, 95 and 120 μ M calf thymus DNA (lines 2, 3, 4 and 5, respectively). Adding higher DNA concentrations did not result in appreciable changes in fluorescence emission.

tion 2). We have previously described the thermodynamic parameters of MSK binding to DNA based on similar fluorescence titrations, which rendered an apparent binding constant of 1.2×10^4 M⁻¹ in a buffer containing 1.5 mM MgCl₂ [16]. In any case, from a mere qualitative point of view the superior protection of DNA melting by MSK (Table 2) would indicate that MSK binds DNA tighter than DIG-MSK.

As a quantification of DIG-MSK binding was not attained, we followed a different approach to explore whether the difference between MSK and DIG-MSK sugar moieties (Fig. 1) may result in differences in the DNA sequence that is preferentially recognized by the two analogs. To this end, we analyzed the differential inhibition of restriction enzyme cleavage by MTA, MSK and DIG-MSK on a linearized DNA plasmid (Fig. 3). MTA protected better than MSK or DIG-MSK both 5'-TCGCGA-3' (*Bsp68I*) and 5'-CGGCCG-3' (*Eco52I*) sequences from digestion (Fig. 3). Moreover, MSK was superior to DIG-MSK in abrogating *Eco52I* cleavage ($p < 0.05$; Fig. 3B). Roughly speaking, the higher Tm values in the presence of MSK (Table 2) as well as the superior protection of 5'-CGGCCG-3' tracts by MSK (Fig. 3) were consistent with that MSK binds to DNA tighter than DIG-MSK, and that MSK can be more prone to accept different C/G-rich sequence arrangements at the binding site. The differences observed between the binding of MSK and DIG-MSK were a consequence of the distinct sugar E in the trisaccharide chain (Fig. 1), which can entail changes in the interaction with DNA.

3.2. DIG-MSK accumulated in human ovarian tumor cell lines

Given that previous studies had revealed that mithramycins are highly active in gynecological cancer [17,18], we sought to unveil whether the cellular and nuclear accumulation of MTA, MSK and DIG-MSK in three human ovarian carcinoma cell lines was equivalent. Fig. 4 shows that every mithramycin analog fairly accumulated after 2 h, while larger 4-h incubations did not result in a significant increase in drug accumulation. The three compounds also reached the nuclei of all the cell lines within 2 h. A comparison of the uptake of MTA or MSK between 2-h and 4-h treatments showed a time-dependent nuclear accumulation in IGROV1 and OVCAR3 cells (see legend to Fig. 4). DIG-MSK accumulated in OVCAR3 nuclei with significant differences between 2-h and 4-h treatments, yet the drug levels were lower than of MTA (Fig. 4). These experiments on cellular and nuclear accumulation indicated that the behavior of the mithramycins depended on the ovarian cell line used and the incubation time.

3.3. DIG-MSK is a potent inhibitor of Sp1-driven transcription and Sp1 expression

Because several mithramycins have been characterized as potent inhibitors of Sp1-activated transcription, we examined the effects of DIG-MSK on the expression of a transfected luciferase reporter vector containing several Sp1 response elements (CG-boxes). Since MTA is routinely used as a tool to assess whether Sp1 transactivates a variety of promoters *in vivo* (cell culture), we employed it as a control to be compared to the new DIG-MSK in experiments undertaken in ovarian cancer cell lines. DIG-MSK retains the capacity of MTA to potently inhibit Sp1-driven promoter activity in A2780 and OVCAR3 cells, and it significantly inhibits ($p < 0.01$) the transcriptional activity in IGROV1 cells (Fig. 5A). To strength the evidence, the effect of mithramycins on the Sp1-mediated promoter activity was also analyzed in cells treated with trichostatin A (TSA), an inhibitor of histone deacetylases that enhances Sp1-activation levels [30]. Fig. 5B shows that even in the presence of TSA, MTA and DIG-MSK markedly reduced luciferase levels.

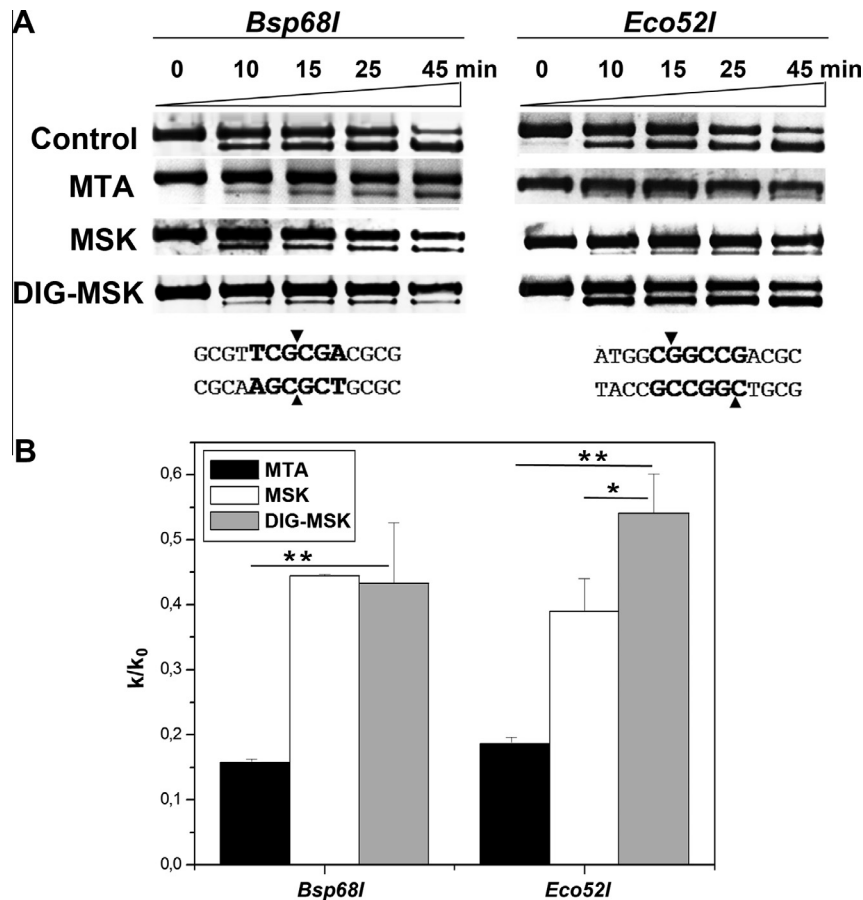


Fig. 3. Inhibition of restriction enzyme cleavage by mithramycins. (A) Representative agarose gels depicting the time course of cleavage of linearized pBR322 by *Bsp68I* or *Eco52I* restriction enzymes in the absence (control) or the presence of MTA, MSK or DIG-MSK. In the experiments depicted in the figure the drug/DNA (bp) molar ratio was 0.2, which corresponds to a stoichiometry of 5 mol of DNA (bp) per mol of mithramycin analog. (B) Histograms represent the change in the rate of restriction cleavage by the presence of each mithramycin analog (k) and in their absence (k_0). Lower k/k_0 values (mean \pm SD from three independent experiments, as those shown in panel A, indicate a higher degree of inhibition (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

To characterize how the alteration of Sp1 levels impinge on the effect of DIG-MSK against the expression of Sp1-driven report plasmids, the Sp1-mediated promoter activity was enhanced by the transient co-transfection of an Sp1 expression vector in the different ovarian cell lines. Sp1 over-expression enhanced about 15-fold the expression of the reporter plasmid in IGROV1 cells and about 3-fold in A2780 and OVCAR3 cells. In the presence of Sp1 expression vector, DIG-MSK showed an “anti-transcriptional effect” similar to that of the parental MTA in A2780 and OVCAR3 cells, whereas the relative inhibition was clearly higher in IGROV1 cells when compared to untreated cells (Fig. 5C).

Given that the *Sp1* gene is regulated by itself in a feedback positive manner, we next assessed the effects on the transcription of endogenous gene by treating ovarian cells with MTA and DIG-MSK, and the expression of the endogenous *Sp1* was measured by qRT-PCR. DIG-MSK produced a significant inhibition ($p < 0.01$) of the expression of *Sp1* in both A2780 and IGROV1 cells, which, nevertheless, was similar to that of MTA (Fig. 5D). Taken together, these experiments indicate that DIG-MSK is a potent inhibitor of Sp1-mediated transcription and *Sp1* gene expression in ovarian cells, a property it shares with the other mithramycin analogs.

3.4. DIG-MSK is stronger than MTA as inhibitor of Sp3 expression and Sp3-mediated transcription

Sp3 is a member of the family of Sp1-related genes that also binds to C/G-rich boxes. We examined the capacity of DIG-MSK

for inhibiting Sp3-driven transcription. As a first approach, a luciferase reporter plasmid under the control of the ULBP1 promoter was used since Sp3 is a potent and specific regulator of *ULBP1* transcription, which is able to induce more than 500-fold the promoter activity of the gene [26]. MTA and DIG-MSK inhibited ULBP1 promoter activity in A2780 and IGROV1, while the inhibitory capacity of DIG-MSK was higher than of MTA in IGROV1 cells (Fig. 6A). Sp1 stimulates the activity of a variety of promoters, while Sp3 is a bifunctional transcription factor that either stimulates or represses the transcription of *ULBP1*, among other genes. Interestingly, the luciferase activity driven by the ULBP1 promoter activity was up-regulated in OVCAR3 cells by MTA and DIG-MSK (Fig. 6A). Seemingly, in this cell line Sp3 could gain access to the promoter acting as activator in the presence of the compounds, yet the three ovarian cell lines can differ in the abundance and activity of the Sp3 isoforms. To further characterize the effect of DIG-MSK on Sp3-mediated promoter activity, Sp3 was over-expressed in the ovarian cell lines by transient transfection of an Sp3-expression vector and the promoter activity was analyzed by using a luciferase reporter vector that contains several C/G-rich response elements. DIG-MSK was stronger than MTA in inhibiting the promoter activity induced by Sp3 over-expression in the three ovarian cell lines (Fig. 6B).

The effect of MTA and DIG-MSK on the expression of the endogenous *Sp3* and *ULBP1* genes was also measured by qRT-PCR. With regard to *Sp3* gene inhibition, MTA and DIG-MSK down-regulated its expression in OVCAR3 and IGROV1 cells, while no significant

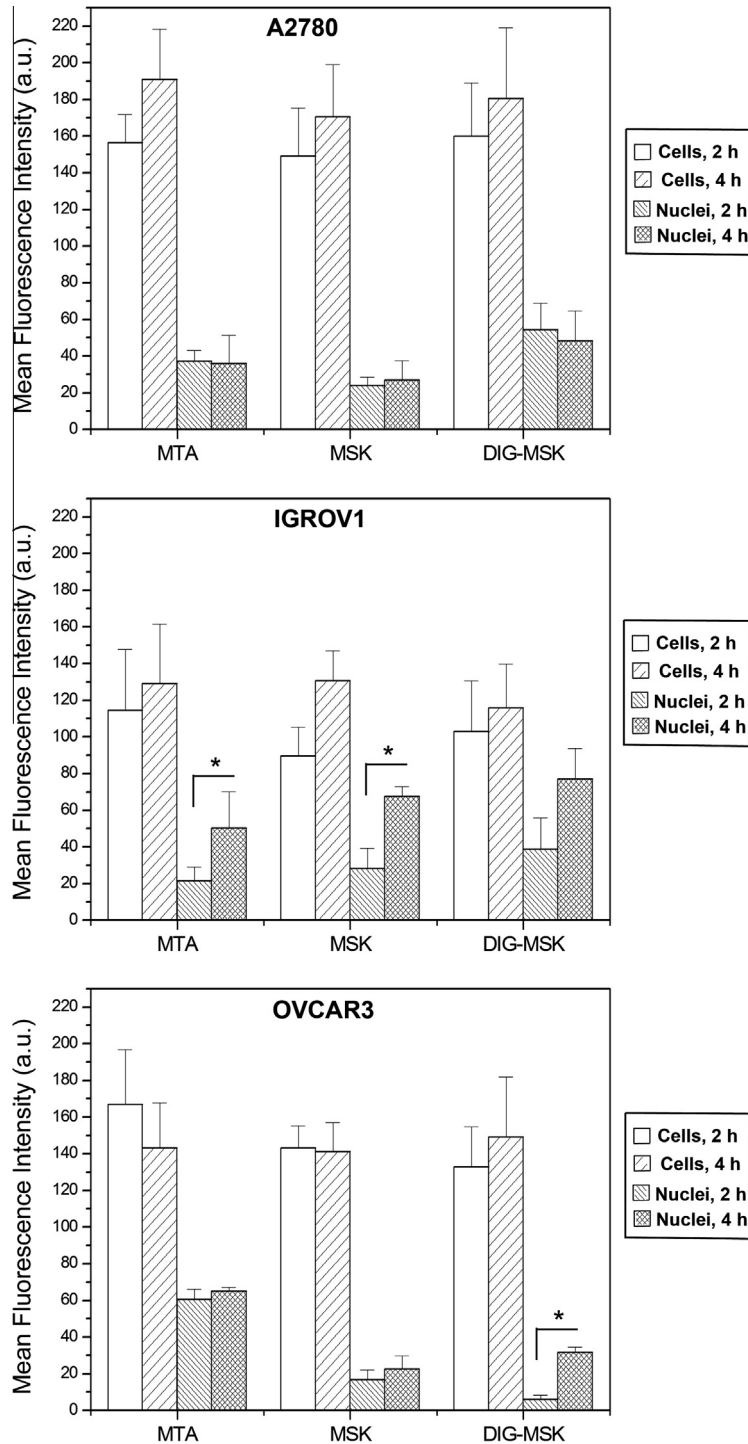


Fig. 4. Cellular and nuclear accumulation of MTA, MSK and DIG-MSK by A2780, OVCAR3 and IGROV1 human ovarian carcinoma cells. About 1×10^4 viable cells were examined. Results represent the mean fluorescence intensity (a.u.) of the total cell population \pm SEM for 4–6 independent experiments; * $p < 0.05$, comparing drug accumulation between 2-h and 4-h treatments.

changes were observed in A2780 cells (Fig. 6C). DIG-MSK was significantly stronger than MTA ($p < 0.01$) in inhibiting the endogenous *Sp3* gene in OVCAR3 and IGROV1 cells. DIG-MSK significantly inhibited the *UBLP1* gene ($p < 0.01$) in the three ovarian cell lines (Fig. 6D), while MTA enhanced its expression in IGROV1 cells ($p < 0.05$). Moreover, DIG-MSK had a higher inhibiting effect on *UBLP1* expression in IGROV1 and OVCAR3 cells. Taken together, these results suggested that DIG-MSK did not only inhibit Sp1-induced transcription but

also altered Sp3-mediated transcription in ovarian cell lines. Although the down-regulation of the *Sp1* gene can result in a shortage of Sp1 factor, our luciferase reporter assays suggest that the final outcome in cells treated with DIG-MSK depended on the direct competition between Sp1 and DIG-MSK for consensus binding sequences in gene promoters, consistent with our previous *in vitro* EMSA (electrophoretic mobility assays) that showed that DIG-MSK displaces Sp1 from its putative binding sites [20].

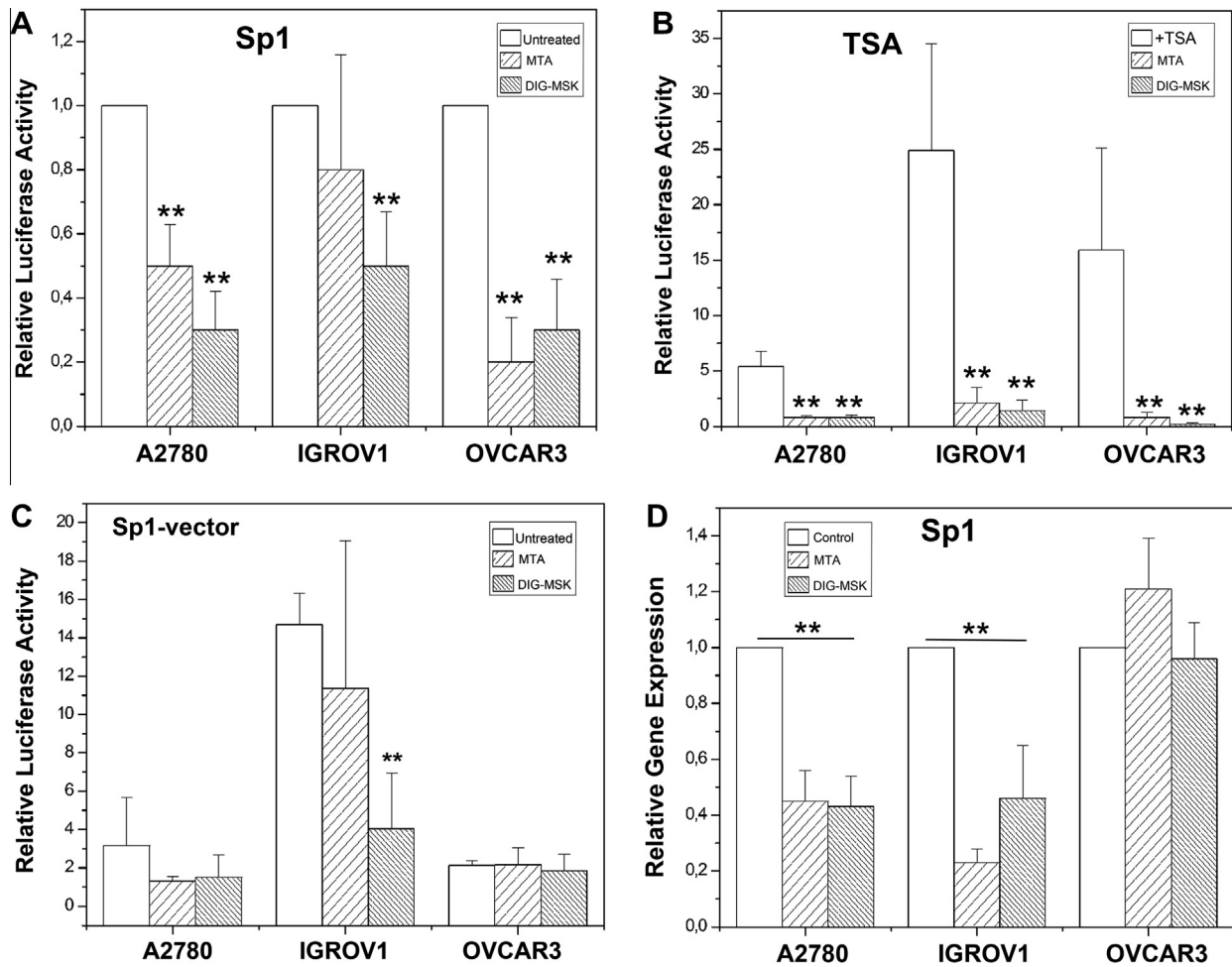


Fig. 5. Effects of MTA and DIG-MSK on transcription driven by the Sp1 transcription factor in A2780, OVCAR3 and IGROV1 cells. (A) Relative changes in the luciferase activity of a transfected Sp1-reporter vector in the presence of 200 nM MTA or DIG-MSK, compared to control, untreated, cells (mean \pm SD from six independent experiments; $**p < 0.01$). (B) Luciferase activity in cells treated with 400 nM trichostatin A (TSA), followed by treatment with 200 nM MTA or DIG-MSK. TSA produced an enhancement of Sp1-transactivating activity, which was measured relative to control experiments in panel A (mean \pm SD from six independent experiments; $**p < 0.01$, compared to TSA-treated cells). (C) Effects of 200 nM MTA or DIG-MSK on the expression of a transfected Sp1-luciferase reporter vector after co-transfection of the different cell lines with pN3-Sp1FL expression vector (mean \pm SD from three independent experiments; $**p < 0.01$). (D) qRT-PCR analysis of the expression of the endogenous Sp1 gene in the presence of 200 nM MTA or DIG-MSK, compared to untreated cells (mean \pm SD from six independent experiments; $**p < 0.01$).

3.5. The novel mithramycin analog DIG-MSK down-regulated the expression of a variety of endogenous genes in human ovarian cancer cells

To further assess the relevance of the effects of DIG-MSK on gene expression, we studied a set of Sp1/Sp3-responsive endogenous genes and compared the changes in gene expression with those induced by MTA or MSK. The set included genes involved in the control of gene transcription (*E2F1*), cell cycle (*CCNB1*) or angiogenesis (*VEGF-C*). Fig. 7 shows their relative expression in the three ovarian cell lines together with that of Sp1, Sp3 and ULBP1. The three compounds abrogated the expression of the angiogenesis-related *VEGF-C* gene in all the ovarian cell lines. The *CCNB1* (*cyclin B1*) gene was more down-regulated by DIG-MSK than by its analogs in A2780 cells (Fig. 7A). However, DIG-MSK was not efficient in abrogating the expression of *E2F1* in A2780 cells (Fig. 7A), whereas it was rather active on the same gene in the other ovarian cancer cells (Fig. 7B and C). Besides, the three compounds did not down-regulate the endogenous Sp1 gene in OVCAR3 cells (Fig. 7C). In IGROV1 and OVCAR3 cells Sp3 expression was strongly reduced, with a superior effect of DIG-MSK (Fig. 7B and C). DIG-MSK was a strong inhibitor of both Sp3 and the *ULBP1* gene expression, the latter being strongly Sp3-dependent, as described above.

4. Discussion

MSK has an improved therapeutic index compared to the parental MTA [4,17] and it inhibits the transcription of several genes [17,31], which is likely to occur, at least in part, by direct abrogation of the Sp1-transactivating effects on gene expression [14,32]. Here, we show that the novel analog DIG-MSK also binds to DNA and it alters gene expression, which may be a desirable mechanism of intervention in certain cancers [33]. Furthermore, DIG-MSK entails an improved pharmacological profile with high antitumor activity and less toxicity [13].

In a previous paper, we calculated by fluorescence titration the binding of several mithramycin analogs to DNA [16]. However, when we used the same approach to analyze the DNA binding of the new DIG-MSK we did not obtain a reliable apparent binding constant (K_{obs}), see Section 3. DIG-MSK shows a rather peculiar behavior because its fluorescence was enhanced or quenched by DNA depending on the temperature. We are at a loss to explain why such fluorescence behavior ensued, although examples exist of DNA-binding agents which fluorescence can be enhanced or quenched upon binding [34]. In our experiments it is peculiar that this phenomenon is observed with the same molecule binding to DNA at different temperatures. From a qualitative point of view,

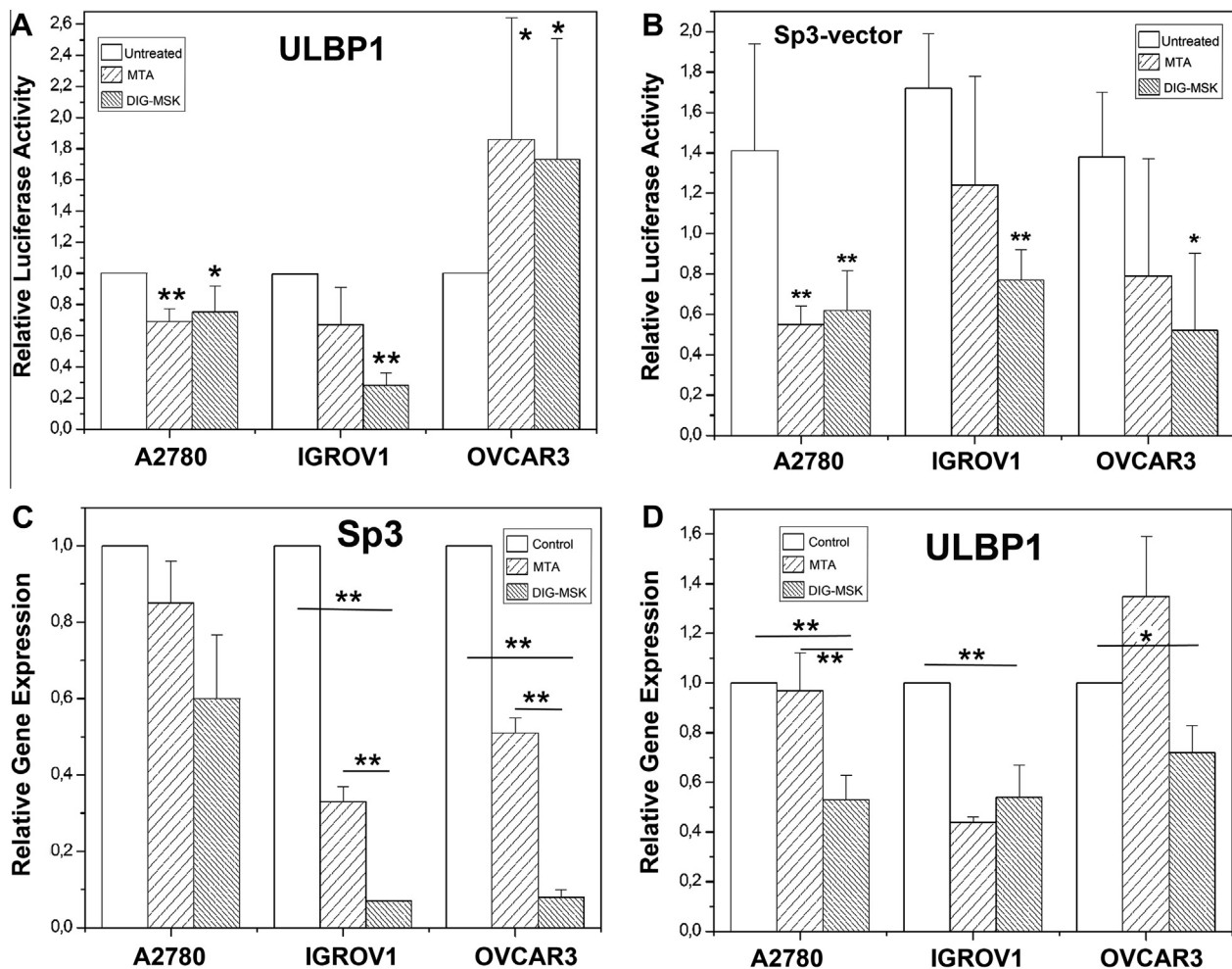


Fig. 6. Effects of MTA and DIG-MSK on transcription driven by the Sp3 transcription factor in A2780, OVCAR3 and IGROV1 cells. (A) Effects of MTA and DIG-MSK on luciferase reporter activity driven by the ULBP1 promoter (mean \pm SD from six independent experiments; * p < 0.05, ** p < 0.01). (B) Effects of 200 nM MTA or DIG-MSK on the expression of a transfected Sp1-luciferase reporter vector (which is also responsive to Sp3) after co-transfection of A2780, OVCAR3 and IGROV1 cells with pN3-Sp3FL expression vector (mean \pm SD from three independent experiments; * p < 0.05, ** p < 0.01). (C) Relative changes in the expression of Sp3 gene in the presence of 200 nM MTA or DIG-MSK determined by qRT-PCR (mean \pm SD from six independent experiments; ** p < 0.01). (D) Relative changes in ULBP1 expression in the presence of 200 nM MTA or DIG-MSK (mean \pm SD from six independent experiments; * p < 0.05, ** p < 0.01).

we can infer that the binding of DIG-MSK to DNA is similar to that of other MTA analogs, thus producing changes in gene expression.

We used a promoter-luciferase reporter driven by Sp1-responsive elements to characterize whether DIG-MSK interferes with basal and induced Sp1-driven transcription (Fig. 5). The effects of DIG-MSK on gene expression are higher than of MTA in some ovarian cell lines (Figs. 5–7). Sp1 is a well-known member of a growing family of transcription factors that also includes Sp3, which display similar DNA binding characteristics, but also some different functional properties [22,25,35]. Together with the effect of mithramycins on Sp1, we have also analyzed the effects on Sp3-mediated transcription and Sp3 gene expression. To differentiate the specific effects of Sp3 from Sp1 ones, we assessed the effects of DIG-MSK on the ULBP1 promoter activity. ULBP1, a predictor of poor prognosis in ovarian cancer patients [28], is one of the few genes in which Sp3, but not Sp1, has been reported to be a specific and strong regulator of its transcription [26]. The effect on Sp3-mediated transcription was further analyzed by over-expressing Sp3 in the ovarian cell lines. In general, DIG-MSK is equivalent or significantly stronger than the parental MTA in inhibiting Sp3-mediated transcription. DIG-MSK has a superior inhibiting effect on the expression of endogenous Sp3 and ULBP1 genes

(Fig. 6 and Fig. 7). Because of the ubiquitous expression of Sp3, and its role in regulating a wide variety of genes, we suggest that such differences may contribute to the distinct pharmacological profile of DIG-MSK. In OVCAR3 cells, the three mithramycins had little effect on Sp1 gene expression, regardless of their effects on other endogenous Sp1-responsive genes (Fig. 7C). This peculiarity may arise from the large polymorphism observed in the Sp1/Sp3 binding-sites in OVCAR cells, which could protect them against time-dependent silencing [36].

Given that Sp1 is an important regulator of the expression of multiple angiogenic factors [22], the down-regulation of VEGF-C by the new MSK and DIG-MSK (Fig. 7) might have clinical implications, as it has been suggested for the parental MTA [9]. DIG-MSK would be advantageous on account of its lower toxicity. The superior effect of DIG-MSK on the expression of CCNB1 (cyclin B1) in A2780 cells (Fig. 7A) is consistent with the effects of this compound on genes involved in cell cycle control in colon carcinoma cells [20]. In transfected IGROV1 cells the down-regulation of Sp1-driven luciferase expression, as well as the down-regulation of a set of cellular genes which includes Sp1, Sp3 and ULBP1, by DIG-MSK correlates with its superior antitumor effect on these cells [13].

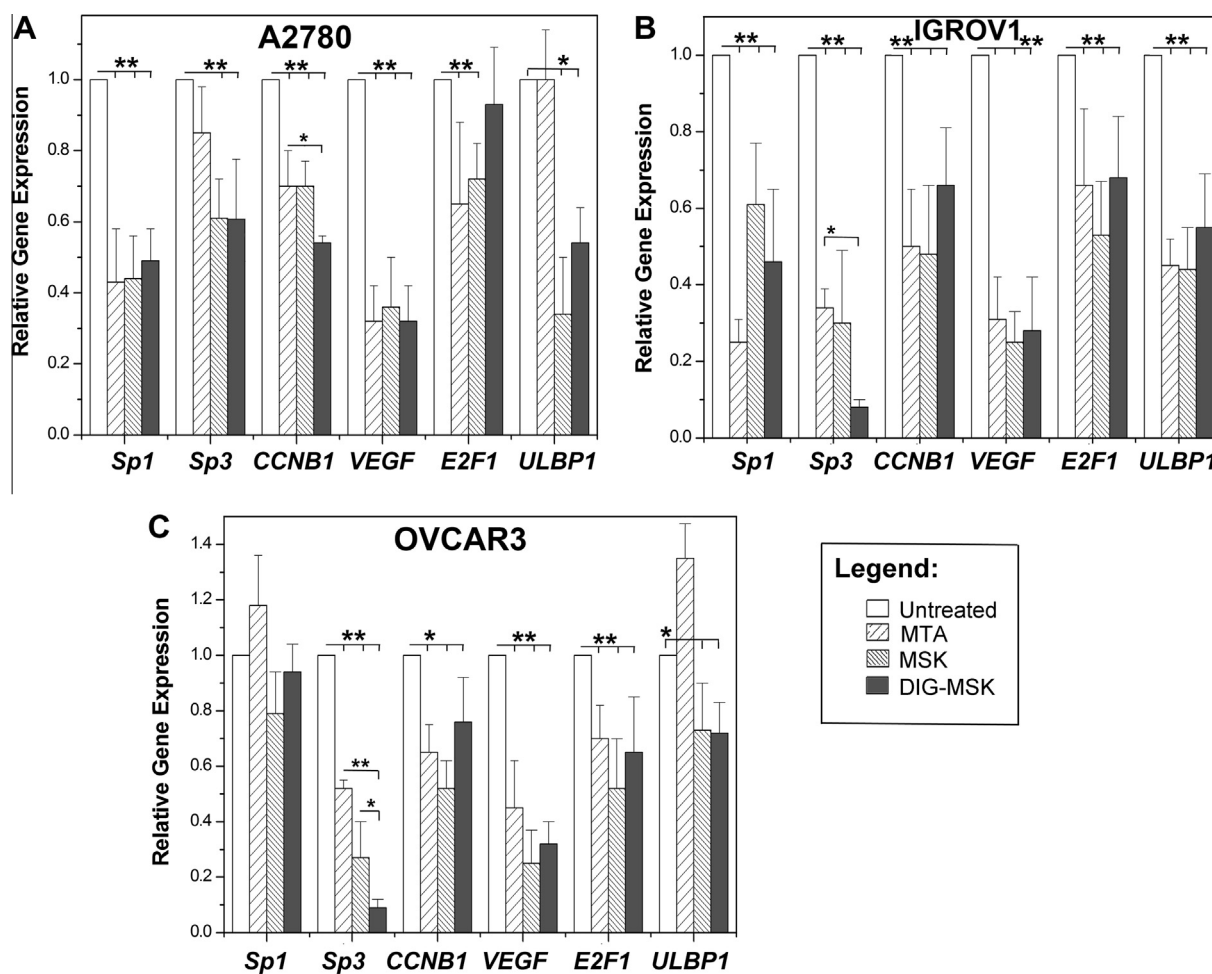


Fig. 7. Expression of a set of endogenous Sp-responsive genes in A2780, IGROV1 and OVCAR3 cells. Cells were treated with either 100 nM MTA, MSK or DIG-MSK for 24 h. Individual transcripts were quantified by qRT-PCR, normalized by the expression of the housekeeping *GAPDH* gene, and compared to untreated cells. (A) Relative gene expression in A2780 cells. (B) Relative gene expression in IGROV1 cells. (C) Relative gene expression in OVCAR3 cells. Data are mean \pm SD from three to six independent experiments (* p < 0.05, ** p < 0.01).

All the mithramycin analogs bind to DNA significantly and they interfere with the transcription machinery. Nevertheless, the improved characteristics of MSK and DIG-MSK can be a consequence of other aspects like their selective accumulation in certain cells and tissues, (Fig. 4 and [13,15,17]). In fact, the lower systemic toxicity of DIG-MSK suggests a selective distribution of this analog [13], in keeping with our results. Altogether, the novel DIG-MSK is interesting in the pursuit of improved targeting in the treatment of ovarian cancer [37].

In summary, the distinctive antitumor activities of MSK and DIG-MSK against several experimental models and the different cytotoxic effects might be attributed to the differential capacity of these molecules for traversing cell membranes, which can result in direct binding to DNA, and, in general, in making gene expression rather sensitive to the mithramycins. The improved pharmacological and toxicological profiles of novel mithramycin analogs such as MSK and DIG-MSK provide us with grounds for considering that new possibilities exist for taking advantage of the unique characteristics of these compounds for therapeutic applications.

Conflict of Interest

L-EN and FM are employees of EntreChem SL. FM reports ownership of stock in EntreChem SL. All other authors declare they have no conflict of interests.

Transparency Document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found in the online version.

Acknowledgments

We thank José L. Insua for helping us in the fluorescence experiments. This work was supported by grant BFU2010-15518 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, and the FEDER program of the European Community, and it was performed within the framework of the “Xarxa de Referencia en Biotecnologia” of the Generalitat de Catalunya. It was also supported by the Principado de Asturias Government through PCTI funds 2006-2009, 80% co-financed with the FEDER Operative Program of the Principado de Asturias 2007-2013 (project FC-11-PC-10-31) and Fondo de Investigaciones Sanitarias (Institute Carlos III) PS09/00420 and PI12/01280. A. F-G. is co-financed by the project COF-11-24 from FICYT. C.V. is recipient of a JAE-Predoc2010 fellowship (CSIC), co-financed by the European Social Fund.

References

- [1] F. Lombó, N. Menéndez, J.A. Salas, C. Méndez, The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73 (2006) 1–14.

- [2] V.T. DeVita Jr., S. Hellman, S.A. Rosenberg, *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, 7th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2005.
- [3] P.D. King, M.C. Perry, Hepatotoxicity of chemotherapy, *Oncologist* 6 (2001) 162–176.
- [4] L.L. Remsing, A.M. González, M. Nur-e-Alam, M.J. Fernández-Lozano, A.F. Braña, U. Rix, M.A. Oliveira, C. Méndez, J.A. Salas, J. Rohr, S.K. Mithramycin, A novel antitumor drug with improved therapeutic index, mithramycin SA, and demycarosyl-mithramycin SK: three new products generated in the mithramycin producer *Streptomyces argillaceus* through combinatorial biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 5745–5753.
- [5] M. Sastry, D.J. Patel, Solution structure of the mithramycin dimer–DNA complex, *Biochemistry* 32 (1993) 6588–6604.
- [6] A.J. Hampshire, K.R. Fox, The effects of local DNA sequence on the interaction of ligands with their preferred binding sites, *Biochimie* 90 (2008) 988–998.
- [7] F. Barceló, C. Scotta, M. Ortiz-Lombardía, C. Méndez, J.A. Salas, J. Portugal, Entropically-driven binding of mithramycin in the minor groove of C/G-rich DNA sequences, *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 2215–2226.
- [8] D.E. Jones Jr., D.M. Cui, D.M. Miller, Expression of β -galactosidase under the control of the human c-myc promoter in transgenic mice is inhibited by mithramycin, *Oncogene* 10 (1995) 2323–2330.
- [9] Z. Jia, J. Zhang, D. Wei, L. Wang, P. Yuan, X. Le, Q. Li, J. Yao, K. Xie, Molecular basis of the synergistic antiangiogenic activity of bevacizumab and mithramycin A, *Cancer Res.* 67 (2007) 4878–4885.
- [10] D. Rodríguez, L.M. Quirós, J.A. Salas, MtmMII-mediated C-methylation during biosynthesis of the antitumor drug mithramycin is essential for biological activity and DNA–drug interaction, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 8149–8158.
- [11] M. Pérez, I. Baig, A.F. Braña, J.A. Salas, J. Rohr, C. Méndez, Generation of new derivatives of the antitumor antibiotic mithramycin by altering the glycosylation pattern through combinatorial biosynthesis, *ChemBioChem* 29 (2008) 2295–2304.
- [12] B. García, J. González-Sabín, N. Menéndez, A.F. Braña, L.E. Nuñez, F. Moris, J.A. Salas, C. Méndez, The chromomycin CmmA acetyltransferase: a membrane-bound enzyme as a tool for increasing structural diversity of the antitumor mithramycin, *Microb. Biotechnol.* 4 (2011) 226–238.
- [13] L.E. Nuñez, S.E. Nybo, J. González-Sabín, M. Pérez, N. Menéndez, A.F. Braña, M. He, F. Moris, J.A. Salas, J. Rohr, C. Méndez, A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 5813–5825.
- [14] A. Malek, L.E. Nuñez, M. Magistri, L. Brambilla, S. Jovic, G.M. Carbone, F. Moris, C.V. Catapano, Modulation of the activity of Sp transcription factors by mithramycin analogues as a new strategy for treatment of metastatic prostate cancer, *PLoS One* 7 (2012) e35130.
- [15] S. Mansilla, I. García-Ferrer, C. Méndez, J.A. Salas, J. Portugal, Differential inhibition of restriction enzyme cleavage by chromophore-modified analogues of the antitumor antibiotics mithramycin and chromomycin reveals structure–activity relationships, *Biochem. Pharmacol.* 79 (2010) 1418–1427.
- [16] F. Barceló, M. Ortiz-Lombardía, M. Martorell, M. Oliver, C. Méndez, J.A. Salas, J. Portugal, DNA binding characteristics of mithramycin and chromomycin analogues obtained by combinatorial biosynthesis, *Biochemistry* 49 (2010) 10543–10552.
- [17] V. Albertini, A. Jain, S. Vignati, S. Napoli, A. Rinaldi, I. Kwee, M. Nur-e-Alam, J. Bergant, F. Bertoni, G.M. Carbone, J. Rohr, C.V. Catapano, Novel GC-rich DNA-binding compound produced by a genetically engineered mutant of the mithramycin producer *Streptomyces argillaceus* exhibits improved transcriptional repressor activity: implications for cancer therapy, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 1721–1734.
- [18] S. Previdi, A. Malek, V. Albertini, C. Riva, C. Capella, M. Broggin, G.M. Carbone, J. Rohr, C.V. Catapano, Inhibition of Sp1-dependent transcription and antitumor activity of the new aureolic acid analogues mithramycin SDK and SK in human ovarian cancer xenografts, *Gynecol. Oncol.* 118 (2010) 182–188.
- [19] M. Bataller, C. Méndez, J.A. Salas, J. Portugal, Mithramycin SK modulates ploidy and cell death in colon carcinoma cells, *Mol. Cancer Ther.* 7 (2008) 2988–2997.
- [20] C. Vizcaíno, S. Mansilla, L.E. Nuñez, C. Méndez, J.A. Salas, F. Moris, J. Portugal, Novel mithramycins abrogate the involvement of protein factors in the transcription of cell cycle control genes, *Biochem. Pharmacol.* 84 (2012) 1133–1142.
- [21] S. Safe, M. Abdelrahim, Sp transcription factor family and its role in cancer, *Eur. J. Cancer* 41 (2005) 2438–2448.
- [22] I. Wierstra, Sp1: emerging roles—beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372 (2008) 1–13.
- [23] M. Zhang, A. Mathur, Y. Zhang, S. Xi, S. Atay, J.A. Hong, N. Datrice, T. Upham, C.D. Kemp, R.T. Ripley, G. Wiegand, I. Avital, P. Fetsch, H. Mani, D. Zlott, R. Robey, S.E. Bates, X. Li, M. Rao, D.S. Schrupp, Mithramycin represses basal and cigarette smoke-induced expression of ABCG2 and inhibits stem cell signaling in lung and esophageal cancer cells, *Cancer Res.* 72 (2012) 4178–4192.
- [24] S. Su, C.J. Omiecinski, Sp1 and Sp3 transcription factors regulate the basal expression of human microsomal epoxide hydrolase (EPHX1) through interaction with the E1b far upstream promoter, *Gene* 536 (2014) 135–144.
- [25] G. Suske, The Sp-family of transcription factors, *Gene* 238 (1999) 291–300.
- [26] A. López-Soto, A. Quiñones-Lombrana, R. López-Arbesu, C. López-Larrea, S. González, Transcriptional regulation of ULBP1, a human ligand of the NKG2D receptor, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 30419–30430.
- [27] A. López-Soto, A.R. Folgueras, E. Seto, S. González, HDAC3 represses the expression of NKG2D ligands ULBPs in epithelial tumour cells: potential implications for the immunosurveillance of cancer, *Oncogene* 28 (2009) 2370–2382.
- [28] R.W. McGilvray, R.A. Eagle, P. Rolland, I. Jafferji, J. Trowsdale, L.G. Durrant, ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients, *Int. J. Cancer* 127 (2010) 1412–1420.
- [29] A.D. Malcolm, J.R. Moffatt, Differential reactivities at restriction enzyme sites, *Biochim. Biophys. Acta* 655 (1981) 128–135.
- [30] P.M. Yang, P.J. Lin, C.C. Chen, CD1d induction in solid tumor cells by histone deacetylase inhibitors through inhibition of HDAC1/2 and activation of Sp1, *Epigenetics* 7 (2012) 390–399.
- [31] M. Bataller, C. Méndez, J.A. Salas, J. Portugal, Cellular response and activation of apoptosis by mithramycin SK in p21^{WAF1}-deficient HCT116 human colon carcinoma cells, *Cancer Lett.* 292 (2010) 80–90.
- [32] L.L. Remsing, H.R. Bahadori, G.M. Carbone, E.M. McGuffie, C.V. Catapano, J. Rohr, Inhibition of c-src transcription by mithramycin: structure–activity relationships of biosynthetically produced mithramycin analogues using the c-src promoter as target, *Biochemistry* 42 (2003) 8313–8324.
- [33] P.D. Grivas, H. Kiaris, A.G. Papavassiliou, Tackling transcription factors: challenges in antitumor therapy, *Trends Mol. Med.* 17 (2011) 537–538.
- [34] V.A. Bloomfield, D.M. Crothers, I. Tinoco Jr., *Physical Chemistry of Nucleic Acids*, Harper & Row, New York, 1974, p. 436.
- [35] S. Mansilla, J. Portugal, Sp1 transcription factor as a target for anthracyclines: effects on gene transcription, *Biochimie* 90 (2008) 976–987.
- [36] Y.A. Bumber, Y. Kondo, X. Chen, L. Shen, Y. Guo, C. Tellez, M.R. Estecio, S. Ahmed, J.P. Issa, An Sp1/Sp3 binding polymorphism confers methylation protection, *PLoS Genet.* 4 (2008) e1000162.
- [37] S.N. Westin, T.J. Herzog, R.L. Coleman, Investigational agents in development for the treatment of ovarian cancer, *Invest. New Drugs* 31 (2013) 213–229.

Genome-wide modulation of gene transcription in ovarian carcinoma cells by a new mithramycin analogue

Carolina Vizcaíno¹, Luz-Elena Núñez², Francisco Morís² & José Portugal^{1*}

1 Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac10, E-08028 Barcelona, Spain

2 EntreChem SL, Edificio Científico Tecnológico, Campus El Cristo, E-33006 Oviedo, Spain

Short Title: Modulation of gene transcription by a new mithramycin analogue

*corresponding author:

Dr. José Portugal, Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac, 10; E-08028 Barcelona, Spain.

Phone: +34 93 403 4959, FAX: +34 93 403 4979, E-mail: jpmbmc@ibmb.csic.es

Genome-wide modulation of gene transcription in ovarian carcinoma cells by a new mithramycin analogue

Carolina Vizcaíno¹, Luz-Elena Núñez², Francisco Morís² & José Portugal^{1*}

1 Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac10, E-08028 Barcelona, Spain

2 EntreChem SL, Edificio Científico Tecnológico, Campus El Cristo, E-33006 Oviedo, Spain

Short Title: Modulation of gene transcription by a new mithramycin analogue

*corresponding author:

Dr. José Portugal, Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de Barcelona, Baldiri Reixac, 10; E-08028 Barcelona, Spain.

Phone: +34 93 403 4959, FAX: +34 93 403 4979, E-mail: jpmbmc@ibmb.csic.es

Abstract

Ovarian cancer has a poor prognosis due to intrinsic or acquired resistance to some cytotoxic drugs, raising the interest in new DNA-binding agents such as mithramycin analogues as potential chemotherapeutic agents in gynecological cancer. Using a genome-wide approach, we have analyzed gene expression in A2780 human ovarian carcinoma cells treated with the novel mithramycin analogue DIG-MSK (demycarosyl-3D- β -D-digitoxosyl-mithramycin SK) that binds to C+G-rich DNA sequences. Nanomolar concentrations of DIG-MSK abrogated the expression of genes involved in a variety of cell processes including transcription regulation and tumor development, which resulted in cell death. Some of those genes have been associated with cell proliferation and poor prognosis in ovarian cancer. Sp1 transcription factor regulated most of the genes that were down-regulated by the drug, as well as the up-regulation of other genes mainly involved in response to cell stress. The effect of DIG-MSK in the control of gene expression by other transcription factors was also explored. Some of them, such as CREB, E2F and EGR1, also recognize C/G-rich regions in gene promoters, which encompass potential DIG-MSK binding sites. DIG-MSK affected several biological processes and molecular functions related to transcription and its cellular regulation in A2780 cells, including transcription factor activity. This new compound might be a promising drug for the treatment of ovarian cancer.

Introduction

Ovarian cancer is an important cause of morbidity and mortality worldwide and the main cause of death among gynecological cancers [1,2]. Surgery followed by platinum-taxane chemotherapy is the standard treatment for ovarian cancer [3]. Despite improvements in complete clinical remission and progression-free survival, resistance to chemotherapy presents a major problem in the treatment of ovarian cancer and a contributing factor in cancer-associated mortality [1-3]. Therefore, given that ovarian cancer shows a high risk of relapse, it seems necessary to improve the efficacy of novel targeted therapies [4].

Regulation of gene transcription is often a central point in oncogenic signaling [5]. In ovarian cancer, an integrated genomic analysis has been undertaken [6], and there have been intents to assess the association between transcription, overall survival and response to chemotherapy [7,8]. In this context, identifying transcription factors that are involved in tumorigenesis and cancer progression may provide us with targets for chemotherapeutic intervention based on small compounds [5,9]. Although targeting transcription factors and their interactions with gene promoters is a difficult approach, it is nowadays considered an attainable goal [5,9]. In fact, many clinically useful agents, such as the anthracyclines doxorubicin and

daunorubicin, several alkylating agents and mithramycin A, can regulate gene expression by binding to C+G-rich DNA sequences recognized by the Sp-family of transcription factors, thus abrogating the transcriptional activity of genes essential for cancer cell growth [9,10]. Ovarian cancer cells over-express several genes that contribute to tumor development [6,11-15]. In many cases, these genes are activated by Sp1 [16-18] and/or by other transcription factors [7], representing potential targets for therapeutic intervention.

Mithramycin A (MTA) is an aureolic acid-type polyketide antibiotic produced by various species of *Streptomyces* [19]. It has been used in the treatment of Paget's disease and advanced testicular carcinoma, but it showed numerous toxic side effects which have limited its clinical use [20]. At the molecular level, the activity of MTA and several of its analogues has been associated with their ability to bind to C/G-rich regions within the DNA minor groove [21-23], and references therein. At present, MTA is the subject of ongoing clinical trials in Ewing sarcoma (<http://www.ClinicalTrials.gov>; Identifier: NCT01610570) and lung, esophagus and other chest cancers (<http://www.ClinicalTrials.gov>; Identifier: NCT01624090), indicating a renewed interest in this kind of compounds for clinical cancer treatment.

The genetic organization of the MTA biosynthesis gene cluster has been studied in detail, and the MTA biosynthetic pathway used to produce new compounds with enhanced biological characteristics [19,21,24-26]. New mithramycin analogues bearing both lower toxicity and higher biological activity are now available, providing new possibilities for therapeutic application [18,19,25]. MTA and its analogues tested to date can inhibit transcription both *in vivo* and *in vitro* by interfering with protein-DNA interactions, especially the inhibition of Sp1-dependent transcription [17,18,27-29]. Recently, a new analogue named DIG-MSK (demycarosyl-3D- β -D-digitoxosyl-mithramycin SK; EC-8042) (Fig. 1) has been obtained and characterized [25]. DIG-MSK shows *in vivo* and *in vitro* antitumor activities similar to other novel analogues like the structurally related MSK, but DIG-MSK is 10-fold less toxic *in vivo* than MTA and 25% less toxic than MSK [25]. Remarkably, the single maximum tolerated dose of DIG-MSK in mice is the highest among the mithramycin analogues [25]. DIG-MSK inhibits the growth of HCT-116 human colon carcinoma cells, where it inhibits the interaction between transcription factors and DNA [29]. Moreover, the *in vivo* evaluation of DIG-MSK antitumor activity by hollow fiber assays indicates that it is a promising antitumor drug against ovarian cancer, among other neoplasms [25].

Using A2780 human ovarian carcinoma cells, we sought to characterize the effects of the mithramycin analogue DIG-MSK on transcription through a genome-wide analysis of changes in gene expression. As expected, we observed this compound reduced the expression of a variety of genes, many of which have been related with ovarian cancer progression, but also up-regulates

the expression of other genes, consistent with the stress response that chemotherapeutic drugs can produce in treated cells. We postulate that the effects of DIG-MSK on gene transcription are mainly due to interference with the binding of Sp1 to its putative binding sites in gene promoters, yet we also observed that other transcription factors were modulated by the drug in their binding to gene promoters, in keeping with our previous observations in colon carcinoma cells [29]. Besides, several biological processes and molecular functions related to transcription and its cellular regulation, including transcription factor activity, were significantly influenced by DIG-MSK in A2780 cells.

Materials and Methods

Cell culture and drug treatments

A2780 human ovarian carcinoma cells were grown in RPMI 1640 medium (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM sodium pyruvate at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Demycarosil-3D-β-D-digitoxosyl mithramycin SK (DIG-MSK; EC-8042) (Fig. 1) was isolated and purified (HPLC ≥ 97%) from the producer *Streptomyces* species as described elsewhere [25]. Stocks of DIG-MSK were prepared as 1 mM solutions in sterile 150 mM NaCl, maintained at -20°C, and brought to the final concentrations just before use. Exponentially growing cells subcultured at a density of 2.5 x 10⁴ cells/ml were grown in the presence of several concentrations of DIG-MSK in the nanomolar range.

Assessment of cell proliferation and viable cell number

The capacity of DIG-MSK to interfere with the growth of A2780 cells proliferation was determined by the MTT assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (Sigma, St. Louis, MO) as described elsewhere [30]. Briefly, cells subcultured at a density of 2.5 x 10⁴ cells/ml were incubated with a nanomolar range of drug concentrations at 37 °C for 72 h, and MTT was added to each culture. Viable cell number was determined at different intervals based on the exclusion of Trypan blue dye and a hemocytometer.

RNA preparation

Cell lysates were prepared from A2780 human ovarian carcinoma cells treated in triplicate with 8 nM or 80 nM DIG-MSK —see Results about how these drug concentrations were selected—, and from untreated cells. RNA was isolated from those independent biological replicates by using the Ultraspec RNA reagent (Biotecx) following the manufacturer's recommendations. RNA was digested with RNase-free DNase I (Roche Diagnostics) in the

presence of RNasin (Promega), phenol extracted and precipitated, and the pellets were dissolved in RNase-free water. RNA was quantified using a NanoDrop spectrophotometer, and the integrity of total RNA monitored with an Agilent 2100 Bioanalyzer. All samples showed a RIN higher than 7.

Microarray analysis

Total RNAs (0.2 μ g) from each sample (biological replicates) were amplified, labeled and hybridized to a SurePrint G3 Human Gene Expression Microarray (Agilent, ID 028004). RNA labeling was performed with the Low Input Quick Amp Labeling kit (Agilent) following the manufacturer's protocol. Oligoarray hybridization buffer (In Situ Hybridization Kit Plus (Agilent)) was added afterwards, and samples applied to microarrays enclosed in Agilent SureHyb-enabled hybridization chambers. Images of the microarrays were acquired using a G2505C Scanner (Agilent). Background subtraction and locally weighted scatterplot smoothing (lowess) normalization were performed using the Feature Extraction Software v. 10.7.3.1 (Agilent). Arrays were processed at Bioarray SL (Elche, Spain). All statistical and differential expression analyses were carried out with an empirical Bayes approach on linear models using the Limma package from Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>). Gene expression was considered up- or down-regulated when it changed ≥ 1.5 -fold (up-regulated) or ≤ 0.67 -fold (down-regulated) and statistically significant ($p < 0.05$). The microarray data can be accessed at the Gene Expression Omnibus (GEO) database:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE46926>.

Validating microarray data by qRT-PCR

An aliquot of the RNA preparations from untreated and drug-treated samples used in the microarray analysis were saved for validation by qRT-PCR. RNAs from each experimental condition were pulled together and analyzed in three independent quantifications. First strand cDNAs were synthesized from DNase I-treated total RNA. The qRT-PCR reactions were performed in triplicate in a Roche LightCycler 480, using the SYBR-Green PCR Master Mix (Roche Diagnostics), and the primers shown in Supporting Table S1. PCR conditions included an initial denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of a denaturation step at 95 °C for 15 s and an annealing/extension step at 60 °C for 1 min. A final dissociation curve was generated to verify that a single product was amplified. Reactions in the absence of template and in the absence of enzyme were also included as negative controls. Fold changes between treatments were determined by the Δ Ct method [31], using the expression of the housekeeping *GAPDH* gene for data normalization.

Gene Ontology (GO) analysis

Functional classification of the genes down-regulated upon treatment with DIG-MSK (≤ 0.67 -fold change) in *Biological Process* and *Molecular Function* categories was performed by comparison with the list of all the genes studied by using PANTHER v.7 (<http://www.pantherdb.org/tools/>), which uses the binomial test for assessing statistical significance [32].

Identification of transcription factors associated to genes affected by DIG-MSK

The Transcription Element Listening System (TELiS) [33] was used to analyze the prevalence of transcription factor-binding motifs, among the promoters of genes down-regulated upon exposure to DIG-MSK. The *Incidence analyses*, provided by the software, indicated genes bearing at least one binding site for a particular transcription factor that were present in a greater fraction of differentially expressed genes than in the sampling frame as a whole. This binary analysis was executed online as an exact binomial test at <http://www.telis.ucla.edu/index.php?cmd=transfac>; using default parameters (promoter size “-600” and stringency setting “0.9”). Consensus sequences corresponding to transcription-factor binding sites were located in the promoter regions of the genes down-regulated by DIG-MSK through multiple comparative analysis, and retrieved using TELiS.

Consensus transcription factor binding sites were identified using both the JASPAR database (http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl) and MatInspector 8.0 (Genomatix Software Suite).

An enrichment analysis was performed using Enrichr [34] to obtain an unbiased identification of whether genes down-regulated by DIG-MSK were among those described to be up-regulated in A2780 human carcinoma cells, thus they participate in the characteristics of A2780 transformed state. A list consisting of down-regulated genes (≤ 0.67 -fold, $p < 0.05$) was uploaded at: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>, where it was compared with the Cancer Cell Line Encyclopedia [35]. The Fisher’s exact test, provided by Enrichr [34], was used to assess the statistical significance of the overlap between the input list and genes overexpressed in A2780 cells.

Hierarchical clustering of selected data

Logarithmic (\log_2) values of the normalized expression ratios (treated *versus* untreated cells) were hierarchically clustered using the TIGR-MeV program [36], based on the Pearson correlations. A comparison was undertaken with the total of genes differentially expressed by 8 and 80 nM DIG-MSK for bibliographic co-citations, pathways and diseases (MeSH terms) in the Genomatix Pathways System (GePS) platform included in the Genomatix Software Suite (<http://www.genomatix.de/solutions/genomatix-software-suite.html>). A set of 32 genes was selected from the genes modulated by both 8 nM and 80 nM DIG-MSK in A2780 cells, filtered

by *Diseases (MeSH)* and *Ovarian neoplasm* by using GePS in the Genomatix Software Suite, and for the presence of consensus Sp1 binding sites in their promoters using TELiS [33]. Details on the whole procedure are provided in Results.

Cell cycle analysis by flow cytometry

A2780 cells treated with DIG-MSK and untreated, control, cells were harvested at different periods of time, fixed with 70% ethanol, and stained with PI (propidium iodide, Sigma) as described elsewhere [30]. Nuclei were analyzed with a Coulter Epics-XL flow cytometer (Coulter Corporation), using the 488 nm line of an argon laser and standard optical emission filters.

Assessment of the mechanisms of cell death

Apoptosis was quantified and distinguished from necrosis by using the Annexin-V-Fluos staining kit (Roche Diagnostics) and flow cytometry in a Coulter Epics-XL flow cytometer (Beckman Coulter).

Western analysis

Protein was extracted from A2780 cells treated with 80 nM DIG-MSK and from untreated cells. About 20 µg of denatured proteins were subjected to electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels, blotted onto Optitran BA-S85 membranes (Schleicher & Schuell), probed with specific antibodies: p21^{WAF1} (Calbiochem), p53 (Santa Cruz), Sp1 (Santa Cruz), Sp3 (Santa Cruz), and GAPDH (Sigma), incubated with secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch), and detected by chemiluminescence using the Immobilon Western HRP Substrate (Millipore).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

For chromatin immunoprecipitation (ChIP), about 10⁷ A2780 cells either untreated or treated with 80 nM DIG-MSK for 24 h were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min. After quenching formaldehyde, cells were collected, lysed, and washed with cold PBS. Chromatin was re-suspended in 4 ml of a buffer consisting of 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), containing protease inhibitors, and sonicated in a Bioruptor (Diagenode) for 25 min to obtain 200–500 bp fragments. Cross-linked chromatin was pre-cleared with 40 µl Dynabeads-Protein A (Invitrogen) and then immunoprecipitated with anti-Sp1 antibody (H-225X, Santa Cruz) in RIPA buffer (140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.1% sodium deoxycholate, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), and protease inhibitors) using 30 µl of pre-blocked Dynabeads-Protein A (Invitrogen). As a negative control, mock immunoprecipitations were carried out using rabbit IgG (Thermo Scientific). Subsequently, cross-links were reversed and DNA purified. qRT-PCR was performed on ChIP material using the primers for *XIAP*, *CRABP1*, *MDK*, *KCNMA*, and a *GAPDH* coding region lacking Sp1

binding sites —negative control— shown in Supporting Table S1, and the experimental conditions described above.

Results

DIG-MSK inhibits the proliferation of A2780 human ovarian carcinoma cells

Antiproliferative effects of nanomolar concentrations of DIG-MSK on A2780 cells were evaluated after 72-h continuous treatments (Fig. 2). From the plot in Fig. 2, we calculated the IC_{50} (drug concentration required to inhibit cell growth by 50%) and IC_{75} values (drug concentration required to inhibit cell growth by 75%) to be 4.25 ± 0.39 nM and 7.44 ± 0.12 nM, respectively. Moreover, the assessment of the reduction in viable cell number indicated that 8 nM DIG-MSK (~ its IC_{75} at 72 h) produced around 4% cell death at 24 h, which reached 9% in 72-h treatments. Besides, 80 nM DIG-MSK (i.e. 10-fold the IC_{75} concentration measured after 72-h treatments) produced ~16% death after 24 h and 90% after 72-h treatments.

DIG-MSK modulates gene expression in A2780 cells

We analyzed the effects of 8 and 80 nM DIG-MSK on gene expression in A2780 human ovarian cancer cells after 24-h treatments. These sub-lethal concentrations were selected from the analysis of cell proliferation (Fig. 2) and viability by Trypan blue exclusion by living cells. The supporting microarray data have been submitted to the GEO repository (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE46926>). After 24-h continuous treatments, 8 nM DIG-MSK affected the expression of 667 genes (1.5-fold; $p < 0.05$), of which 160 were down-regulated (Fig. 3A). At the same threshold, 80 nM DIG-MSK affected 4889 transcripts, of which 2503 were down-regulated. Most of the genes showing altered expression were down-regulated by the higher concentration. Besides, 105 genes showed down-regulated gene expression at both concentrations (intersection in the Venn diagrams in Fig. 3A).

We sought independent validation by qRT-PCR of the DIG-MSK effects on gene expression. We selected 11 transcripts that were reported to be challenged by DIG-MSK in a different cancer cell type [29]. The genes analyzed by qRT-PCR are also related to ovarian cancer [6] and/or contain putative Sp1-binding sites. Significant and substantial down-regulation by DIG-MSK was seen for several genes, in keeping with the microarray data, although for some transcripts was less than indicated by the array. Two up-regulated genes were also included and validated by qRT-PCR (Fig. 3B).

Gene Ontology (GO) of genes differentially expressed upon treatments with DIG-MSK

Table 1 classifies down-regulated genes in gene ontology (GO) classes. This table also provides a statistical estimate of the overrepresentation of a given functional class. DIG-MSK

affected a variety of biological routes, including genes related to transcription regulation and metabolic cellular processes. *Molecular function* and *biological processes* GO categories highlighted the presence of genes involved in transcription regulation and nucleic acids metabolism among the genes affected by 80 nM DIG-MSK, which suggested that DIG-MSK alters the expression, or binding activities, of a variety of transcriptional factors. A similar analysis was undertaken using the results of the treatment with 8 nM DIG-MSK (Table 2). In this case, both the number of genes and the GO categories represented significantly ($p < 0.05$) were smaller, indicating a dose-dependent response to the drug.

Identification of transcription factors associated with genes down-regulated by DIG-MSK

Given that the mithramycin analogues can be *in vivo* and *in vitro* inhibitors of gene transcription through direct competition with proteins for binding to DNA, we explored whether among transcription factors that recognize gene promoters there was an ‘enrichment’ in their putative binding sites in the promoters of down-regulated genes. This might explain the repression of gene expression by DIG-MSK. Drug-repressed genes encompassed in their promoters a higher proportion of binding sites for several transcription factors than it was expected to occur by simple chance (Table 3). Sp1 had the highest representation among the transcription factors, in line with DIG-MSK effects on Sp1-activated gene expression in human colon carcinoma cells [29], and consistent with the fact that Sp1 and the mithramycin analogues bind preferentially to C-rich regions in DNA. Other transcription factors that bind to G+C sequences and participate in the control of gene expression during cancer development, such as EGR2, N-Myc, or E2F, were among the more represented factors (Table 3).

Clustering and gene network analyses reveal peculiarities in the effect of DIG-MSK on ovarian carcinoma cells

The effects of DIG-MSK on gene expression were also examined by clustering analysis of a selected set of genes. A hierarchical clustering, based on Pearson correlation coefficients, of 32 differentially expressed genes is shown in Fig. 4A. This set of genes was obtained after filtering the 278 up- and down-regulated genes influenced by both DIG-MSK concentrations (intersections in the Venn diagrams shown in Fig. 3A) using the Genomatix Pathway System (GePs). GePs identified 72 genes as belonging to “Ovarian Neoplasm” category within “Diseases/MeSH”. Ten of these genes were eliminated from the following analysis because their interaction with others was not evident. The remaining genes were then interrogated for the presence of putative Sp1 binding sites in their promoters using TELiS. Of them, 32 genes contained at least one Sp1-binding consensus sequence. Therefore, the clustered heat-map (Fig. 4A) summarizes the relationship between drug activity at each concentration and changes in the expression of Sp1-responsive genes relevant to ovarian cancer progression. Figure 4A offers a

convenient way to visualize patterns of dissimilarity in the effects of either drug concentration. Dendrograms, showing average-linkage hierarchical clustering, clustered together several genes involved in common cellular pathways. For the sake of comparison, we have labeled those clusters using lowercase letters (Fig. 4A). Cluster labeled “a” contains genes up-regulated by either treatment, although 80 nM DIG-MSK had a superior enhancing effect. It encompassed genes related to various cell functions, as cell adhesion, migration, and proliferation, including genes involved in the control cell-cycle progression such as *CDKN1A* (*p21^{WAF}*), which up-regulation was consistent with the transient halt of cells in G1 phase, described below. Most of these up-regulated genes, listed in Table 2, also contain putative Sp1-binding sites, although, in this case, Sp1 and DIG-MSK did not seem to compete directly for binding to consensus promoter sequences. Cluster “b” contains not only several genes that have been described to be highly expressed in ovarian cancer, but also *DDB2*, which enhanced expression would correlate with an augmented sensitivity of ovarian cancer cells to some chemotherapeutic agents [37]. Cluster “c” contains genes usually found highly expressed in ovarian carcinoma. DIG-MSK did not abrogate the expression of that particular group of genes. Cluster “d” contains genes whose expression can be induced in cellular stress conditions, as we may expect after drug treatment. We marked as “e” a single gene (*GRN*) that, although it clustered near others, it was peculiar in being up-regulated by 8 nM DIG-MSK and down-regulated by 80 nM DIG-MSK. *GRN* is a prognostic marker in epithelial ovarian carcinoma [38]. The large cluster “f” consists of genes that underwent a dose-dependent down-regulation. Among the genes clustered there was E2F1, a transcription factor, as well as genes that may contribute to tumorigenesis, including invasive ovarian carcinoma [39]. At the very edge of cluster “f”, but still closely related to it, *KCNMA1* was labeled as “g” (Fig. 4A). Amplification of this gene, which was strongly inhibited by DIG-MSK, has been associated with high cell proliferation and poor prognosis [40].

Genes down-regulated by 80 nM DIG-MSK were uploaded into GePS for transcriptional network analysis with sentence-level co-cited transcription factors annotation type (Genomatix Literature Mining). This provided insights into the functional connections among genes. Four transcription factors, Sp1, BIRC5, YY1 and BRCA1, showed significant ($p < 0.05$) enrichment in that annotation type (Supporting Table S2). As a representative network, Fig. 4B presents genes regulated by Sp1, in which there was a dominance of *Myc* and *EGR1* as pivotal nodes.

Alongside the enrichment analysis in Gene Ontology terms described above (Tables 1 and 2), we undertook an unbiased enrichment comparison of the list of genes down-regulated by DIG-MSK with the list of terms available for A2780 human ovarian carcinoma cells in the Cancer Cell Encyclopedia [35]. We observed a strong and somewhat specific effect of DIG-MSK on genes that were up-regulated in A2780 cells, as deemed by the high statistical

significance of the overrepresentation of DIG-MSK-abrogated genes among those up-regulated in A2780 cells ($p = 2.45E-14$; Fisher's exact test). DIG-MSK was rather effective in abrogating highly expressed genes in A2780 cells, which indicates its preference for interfering with over-expressed genes. This observation, a condition required to link its antitumor activity to changes in gene expression, was in keeping with the finding that other DNA-binding drugs show selective inhibiting effects on inducible genes [41], yet in our case the effect seemed related to a direct inhibition of transcription factor binding rather than due to downstream events.

DIG-MSK challenges Sp1-binding to gene promoters

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was used to measure Sp1 occupancy at the promoters of *XIAP*, *CRABP1*, *MDK* and *KCNMA1* genes, which were repressed by the treatments with 80 nM DIG-MSK. All of them are involved in the development of ovarian carcinoma [6]. A negative control was also included, which consisted of a down-stream region of the housekeeping *GAPDH* gene that lacks Sp1-binding sites. DIG-MSK decreased Sp1 binding to those promoters, with a superior effect on *KCNMA1* (Fig. 5).

DIG-MSK changes the cell cycle traverse in A2780 cells and commits cells to dying

Changes in cell cycle distribution of A2780 cells after treatments with DIG-MSK were both concentration- and time-dependent (Fig. 6A). Adherent and detached cells were pooled together for cytometric analysis. A2780 cells treated with 8 nM DIG-MSK maintained a relatively uniform phase distribution throughout the experiment, with most cells in G1 phase, while 80 nM DIG-MSK produced a progressive increase in the sub-G0 population.

Flow cytometry bivariate-plots of Annexin-V-fluos and PI staining distinguished apoptosis from necrosis in A2780 cells treated with DIG-MSK for 72 h (Fig. 6B). Cells were mainly dying by secondary necrosis/apoptosis, which seemingly occurred after a fast apoptotic phase. Cell death was concentration-dependent with a higher effect of 80 nM DIG-MSK, which was also indicated by Trypan blue staining, and the increase in the G0-phase population (Fig. 6A).

Changes in protein levels induced by DIG-MSK are consistent with changes in gene expression

Figure 7 presents some examples illustrating changes in protein levels after treatment of A2780 cells with DIG-MSK. Sp1 and Sp3 protein levels were in line with the down-regulation of gene expression by the drug. The levels of p53 increased after 24-h treatments, decreasing afterwards (Fig. 7B), consistent with cell arrest observed after 72 h (cf. Figs. 7A and 6A). Meanwhile, p21^{WAF} (*CDKN1A*) levels remained high. Altogether, changes in protein levels were fully consistent with both the array/qRT-PCR assays and the changes in the distribution of cells in the different phases of the cell cycle (Fig. 6A).

Discussion

It is a matter of current interest whether small-molecule drugs targeting putative transcription-factor binding sites can cause sequential biological effects on gene expression, thus representing practical and reliable antitumor agents [5,9]. Here, we have presented a genome-wide analysis probing the “anti-transcriptional” properties of the novel mithramycin analogue DIG-MSK, which had shown a promising *in vivo* antitumor profile [25].

We observed dose-dependent differences in the number of genes affected by DIG-MSK in A2780 cells. However, 105 genes were down-regulated regardless of the drug concentration (Fig. 3A, bottom panel). According to gene ontology (GO) analysis, they mainly belong to the categories of nucleic acid binding, transcription regulator activity and angiogenesis. Whereas 8 nM DIG-MSK had little effect on cell viability in up to 72-h treatments, the higher 80 nM DIG-MSK concentration, still in the nanomolar range, showed a remarkable time-dependent cytotoxicity, with most cells dying by apoptosis and secondary apoptosis/necrosis (Fig. 6B). At first glance, this would indicate that low concentrations of DIG-MSK are enough to produce specific effects on the expression of a relatively small number of genes, while higher concentrations affects a larger number of genes, which, in turn, augments cell death.

Transcription is the main target for DIG-MSK, as it also for other mithramycin analogues [10,17,29,42]. The set of genes down-regulated by DIG-MSK comprises an extensive representation of genes that are up-regulated in untreated A2780 cells. Although the meaning of this observation has to be contemplated with caution, the genes overexpressed are a molecular signature of the transformed state of A2780 cells [35], thus they represent potential targets for therapeutic intervention in ovarian cancer [6].

The clustering analysis of a set of genes that displayed altered expression upon treatment (Fig. 4A) indicates that putative Sp1-binding sites, which are also potential binding sites for mithramycin analogues [10,43], play a central role in both up-regulated and down-regulated genes. Among them, *GRN* (granulin epithelium precursor) is remarkable because it was up-regulated by 8 nM and down-regulated by 80 nM DIG-MSK. GRN has been characterized as a prognostic marker in ovarian cancer [38].

Functional network investigation of Sp1 co-expressed genes in DIG-MSK-treated cells highlights that *Myc* and *EGR1* are central nodes in the transcriptional network. They exhibited strong interactions with other genes, including *BIRC5*, *E2F1*, and members of the Sp-family genes (Fig. 4B and Supporting Table S2). All these genes encode transcription factors that are potential diagnostic biomarkers in ovarian cancer [7,44]. Their activities were modulated by DIG-MSK (Table 3) as it also occurs in other cancer cell lines [29]. Moreover, *Myc* and *EGR1*

are involved in cancer development [45]. It is noteworthy that clustering gene expression (Fig. 4A) revealed that *KCNMA1* clustered with other genes down-regulated by any DIG-MSK concentration, but it was distinctly at the very edge of the rest of the cluster, denoting peculiarities of gene expression in presence of the drug; its expression was strongly inhibited by DIG-MSK. Such down-regulation is meaningful because *KCNMA1* high expression has been associated with cell proliferation and poor prognosis in cancer [40]. Hence, it is a candidate to be explored as target in ovarian cancer.

Here, we have shown that Sp1 is involved in the regulation of gene expression in A2780 human carcinoma cells treated with DIG-MSK. Differences in the down-regulating effects of 8 nM and 80 nM DIG-MSK can indicate differences in the binding affinity of Sp1 and the mithramycins for certain consensus C/G-rich tracts in DNA (i.e. DNA regions with high C+G content, in which these nucleotides are arranged in peculiar sequences), like in the *KCNMA1* promoter, which may result in variations in their concentration-dependent down-regulation (Fig. 4A). Given that Sp1 is overexpressed in cancer cells [46], its diminished levels upon treatments with DIG-MSK (Fig. 7) may result in tumor remission. In this regard, DIG-MSK activity resembles that of the structurally related MSK [17,18,29,47]. DIG-MSK shows high activity in ovarian carcinoma cells [25] and Figs. 2 and 6B, while it has, in general, lower toxicity [25]. ChIP experiments show that the Sp1 occupies its binding sites in the promoters of *XIAP*, *CRABP1*, *MDK*, and *KCNMA1* (Fig. 5), and that DIG-MSK decreases Sp1 binding to them with a superior effect on *KCNMA1*, a gene associated with high proliferation in cancer cells [40]. The effect of DIG-MSK was also evident on the loading of Sp1 on the other gene promoters (Fig. 5): *XIAP* whose down-regulation can induce cell death [12], *CRABP1*, a gene involved in the development of ovarian carcinoma [11], and *MDK* that is a marker in ovarian cancer [14]. Besides, DIG-MSK modifies the interaction of other factors that also recognize C+G-rich regions in gene promoters. Some of them, including E2F1 and several members of the Sp-family of transcription factors, have been identified as biomarkers of ovarian cancer [44]. Among those transcription factors, E2F1 is member of one of the nodes of the cellular networks highly influenced by DIG-MSK (Fig. 4B).

Deregulated activity of transcription factors and the consequent overexpression of some genes frequently occur in cancer. In this context, MTA has been characterized a potent agent in abrogating the transcription driven by the EWS-FLI1 oncogenic transcription factor, a hallmark of the Ewing sarcoma family of tumors [48]. This is in keeping with the finding that binding to DNA of transcription factors other than the members of the Sp-family can be targeted by MTA and its analogues. Targeting over-expressed genes in ovarian cancer, including those of transcription factors such as Sp1 [7,44] might be an appealing strategy to abrogate genes

associated with resistance to other drugs [8]. As mentioned above, DIG-MSK shares with other mithramycin analogues the ability of shifting Sp1 binding, yet its better pharmacological profile [25] suggests that this new mithramycin analogue is a promising drug for the treatment of ovarian cancer.

Acknowledgments

We thank Dr. Luis Alcaraz (Bioarray SL) for his help and encouragement.

Author contributions

Conceived the experiments: JP. Performed the experiments: CV. Contributed materials: L-EN, FM. Analyzed the data: CV, JP. Wrote the manuscript: JP, CV. All authors reviewed and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, et al. (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69-90.
2. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M (2009) Ovarian cancer. *Lancet* 374: 1371-1382.
3. Kigawa J (2013) New strategy for overcoming resistance to chemotherapy of ovarian cancer. *Yonago Acta Med* 56: 43-50.
4. Hall M, Gourley C, McNeish I, Ledermann J, Gore M, et al. (2013) Targeted anti-vascular therapies for ovarian cancer: current evidence. *Br J Cancer* 108: 250-258.
5. Grivas PD, Kiaris H, Papavassiliou AG (2011) Tackling transcription factors: challenges in antitumor therapy. *Trends Mol Med* 17: 537-538.
6. *The Cancer Genome Atlas Research Network* (2011) Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 474: 609-615.
7. Crijns AP, Fehrmann RS, de Jong S, Gerbens F, Meersma GJ, et al. (2009) Survival-related profile, pathways, and transcription factors in ovarian cancer. *PLoS Med* 6: e1000024.
8. Solár P, Sytkowski AJ (2011) Differentially expressed genes associated with cisplatin resistance in human ovarian adenocarcinoma cell line A2780. *Cancer Lett* 309: 11-18.
9. Yan C, Higgins PJ (2013) Drugging the undruggable: Transcription therapy for cancer. *Biochim Biophys Acta* 1835: 76-85.
10. Portugal J, Mansilla S, Vizcaíno C, Barceló F (2011) Promoter-specific transcriptional interference by DNA-binding drugs. *Recent Research Development in Biochemistry Vol 8*. Kerala: Research Signpost. pp. 45-63.
11. Skubitz AP, Pambuccian SE, Argenta PA, Skubitz KM (2006) Differential gene expression identifies subgroups of ovarian carcinoma. *Transl Res* 148: 223-248
12. Shaw TJ, Lacasse EC, Durkin JP, Vanderhyden BC (2008) Downregulation of XIAP expression in ovarian cancer cells induces cell death in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 122: 1430-1034.
13. Duncan TJ, Al-Attar A, Rolland P, Scott IV, Deen S, et al. (2008) Vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer: a model for targeted use of novel therapies? *Clin Cancer Res* 14: 3030-3035.

14. Rice GE, Edgell TA, Autelitano DJ (2010) Evaluation of midkine and anterior gradient 2 in a multimarker panel for the detection of ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 29: 62.
15. Kelly ZL, Michael A, Butler-Manuel S, Pandha HS, Morgan RG (2011) HOX genes in ovarian cancer. *J Ovarian Res* 4: 16.
16. Honda H, Pazin MJ, Ji H, Wernyj RP, Morin PJ (2006) Crucial roles of Sp1 and epigenetic modifications in the regulation of the CLDN4 promoter in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 281: 21433-21444
17. Albertini V, Jain A, Vignati S, Napoli S, Rinaldi A, et al. (2006) Novel GC-rich DNA-binding compound produced by a genetically engineered mutant of the mithramycin producer *Streptomyces argillaceus* exhibits improved transcriptional repressor activity: implications for cancer therapy. *Nucleic Acids Res* 34: 1721-1734.
18. Previdi S, Malek A, Albertini V, Riva C, Capella C, et al. (2010) Inhibition of Sp1-dependent transcription and antitumor activity of the new aureolic acid analogues mithramycin SDK and SK in human ovarian cancer xenografts. *Gynecol Oncol* 118: 182-188.
19. Lombó F, Menéndez N, Salas JA, Méndez C (2006) The aureolic acid family of antitumor compounds: structure, mode of action, biosynthesis, and novel derivatives. *Appl Microbiol Biotechnol* 73: 1-14.
20. King PD, Perry MC (2001) Hepatotoxicity of chemotherapy. *Oncologist* 6: 162-176.
21. Remsing LL, González AM, Nur-e-Alam M, Fernández-Lozano MJ, Braña AF, et al. (2003) Mithramycin SK, A novel antitumor drug with improved therapeutic index, mithramycin SA, and demycarosyl-mithramycin SK: Three new products generated in the mithramycin producer *Streptomyces argillaceus* through combinatorial biosynthesis. *J Am Chem Soc* 125: 5745-5753.
22. Barceló F, Scotta C, Ortiz-Lombardía M, Méndez C, Salas JA, et al. (2007) Entropically-driven binding of mithramycin in the minor groove of C/G-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 35: 2215-2226.
23. Barceló F, Ortiz-Lombardía M, Martorell M, Oliver M, Méndez C, et al. (2010) DNA binding characteristics of mithramycin and chromomycin analogues obtained by combinatorial biosynthesis. *Biochemistry* 49: 10543-10552.
24. Pérez M, Baig I, Braña AF, Salas JA, Rohr J, et al. (2008) Generation of new derivatives of the antitumor antibiotic mithramycin by altering the glycosylation pattern through combinatorial biosynthesis. *ChemBiochem* 29: 2295-2304.
25. Núñez LE, Nybo SE, González-Sabín J, Pérez M, Menéndez N, et al. (2012) A novel mithramycin analogue with high antitumor activity and less toxicity generated by combinatorial biosynthesis. *J Med Chem* 55: 5813-5825.
26. Zabala D, Braña AF, Florez AB, Salas JA, Méndez C (2013) Engineering precursor metabolite pools for increasing production of antitumor mithramycins in *Streptomyces argillaceus*. *Metab Eng* 20: 187-197.
27. Jones DE, Jr., Cui DM, Miller DM (1995) Expression of β -galactosidase under the control of the human c-myc promoter in transgenic mice is inhibited by mithramycin. *Oncogene* 10: 2323-2330.
28. Jia Z, Zhang J, Wei D, Wang L, Yuan P, et al. (2007) Molecular basis of the synergistic antiangiogenic activity of bevacizumab and mithramycin A. *Cancer Res* 67: 4878-4885.
29. Vizcaíno C, Mansilla S, Núñez LE, Méndez C, Salas JA, et al. (2012) Novel mithramycins abrogate the involvement of protein factors in the transcription of cell cycle control genes. *Biochem Pharmacol* 84: 1133-1142.
30. Villamarín S, Mansilla S, Ferrer-Miralles N, Priebe W, Portugal J (2003) A comparative analysis of the time-dependent antiproliferative effects of daunorubicin and WP631. *Eur J Biochem* 270: 764-770.
31. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.

32. Mi H, Dong Q, Muruganujan A, Gaudet P, Lewis S, et al. (2010) PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Res* 38: D204-D210.
33. Cole SW, Yan W, Galic Z, Arevalo J, Zack JA (2005) Expression-based monitoring of transcription factor activity: the TELiS database. *Bioinformatics* 21: 803-810.
34. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, et al. (2013) Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* 14: 128.
35. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, et al. (2012) The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483: 603-607.
36. Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, et al. (2003) TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34: 374-378.
37. Barakat BM, Wang QE, Han C, Milum K, Yin DT, et al. (2010) Overexpression of DDB2 enhances the sensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin by augmenting cellular apoptosis. *Int J Cancer* 127: 977-988.
38. Davidson B, Alejandro E, Florenes VA, Goderstad JM, Risberg B, et al. (2004) Granulin-epithelin precursor is a novel prognostic marker in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 100: 2139-2147.
39. Reimer D, Hubalek M, Riedle S, Skvortsov S, Erdel M, et al. (2010) E2F3a is critically involved in epidermal growth factor receptor-directed proliferation in ovarian cancer. *Cancer Res* 70: 4613-4623.
40. Oeggerli M, Tian Y, Ruiz C, Wijker B, Sauter G, et al. (2012) Role of KCNMA1 in breast cancer. *PLoS One* 7: e41664.
41. Minuzzo M, Ceribelli M, Pitarque-Marti M, Borrelli S, Erba E, et al. (2005) Selective effects of the anticancer drug Yondelis (ET-743) on cell-cycle promoters. *Mol Pharmacol* 68: 1496-1503.
42. Malek A, Nuñez LE, Magistri M, Brambilla L, Jovic S, et al. (2012) Modulation of the activity of Sp transcription factors by mithramycin analogues as a new strategy for treatment of metastatic prostate cancer. *PLoS One* 7: e35130.
43. Fernández-Guizán A, Mansilla S, Barceló F, Vizcaíno C, Nuñez LE, et al. (2014) The activity of a novel mithramycin analog is related to its binding to DNA, cellular accumulation, and inhibition of Sp1-driven gene transcription. *Chem Biol Interact* 219: 123-132.
44. Kaur M, MacPherson CR, Schmeier S, Narasimhan K, Choolani M, et al. (2011) *In Silico* discovery of transcription factors as potential diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *BMC Syst Biol* 5: 144.
45. Albiñ A, Johnsen JJ, Henriksson MA (2010) MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Adv Cancer Res* 107: 163-224.
46. Safe S, Abdelrahim M (2005) Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer* 41: 2438-2448.
47. Bataller M, Méndez C, Salas JA, Portugal J (2008) Mithramycin SK modulates polyploidy and cell death in colon carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 7: 2988-2997.
48. Grohar PJ, Woldemichael GM, Griffin LB, Mendoza A, Chen QR, et al. (2011) Identification of an inhibitor of the EWS-FLI1 oncogenic transcription factor by high-throughput screening. *J Natl Cancer Inst* 103: 962-978.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Chemical formulae of the mithramycin analogue DIG-MSK (demycarosyl-3D-β-D-digitoxosyl-mithramycin SK). DIG-MSK differs from the parental mithramycin A in the side chain linked to C-3 and the distal sugar in the trisaccharide moiety.

Figure 2. Assessment of cell proliferation. Effects of DIG-MSK on the proliferation of A2780 human ovarian carcinoma cells after 72-h continuous treatments. Data are mean ± SEM from 6 independent experiments.

Figure 3. Analysis of gene expression in A2780 cells treated with DIG-MSK. (A) Venn diagrams representing genes affected, either up-regulated or down-regulated in microarray analysis by treatments with 8 nM or 80 nM DIG-MSK (1.5-fold changes, $p < 0.05$). Numbers inside the intersections correspond to genes influenced by both drug concentrations. (B) Quantitative real-time PCR measurements of a set of genes selected among those differentially expressed in A2780 cells treated with DIG-MSK. Histograms represent mean ± SD from 3 independent experiments (** $p < 0.01$, Student's t-test comparison between treatments).

Figure 4. Effects of the treatment of A2780 cells with 8 nM or 80 nM DIG-MSK on a panel of genes characterized as being related to “ovarian neoplasm” and containing at least one putative Sp1-binding site in the proximal promoter region. (A) Hierarchical clustering of changes in gene expression for each treatment. Dendrograms show average-linkage hierarchical clustering based in Pearson correlation coefficients. For the sake of comparison, lowercase letters at the right side indicate “clusters” with shared characteristics that are detailed in Results. (B) Network generated by the Genomatix Pathway System (GePS) representing bibliographic relationships for Sp1 co-expressed gene profiles ($p = 1.48E-03$). Dashed lines indicate genes associated by co-citation, while continuous lines indicate genes associated by expert-curation. Filled diamonds and triangles indicate the promoter of gene “B” (the gene with the diamond/triangle) has a corresponding experimentally validated binding site for the transcription factor encoded by gene “A”. Open triangles indicate that the binding of a particular transcription factor to the gene promoter has not been described unambiguously. The sequence logo for the consensus Sp1 binding site, retrieved from JASPAR, is shown at the top right of panel B.

Figure 5. Chromatin immunoprecipitation analysis of Sp1 binding to the promoters of XIAP, CRABP1, MDK and KCNMA1 genes in A2780 cells in the presence/absence of 80 nM

DIG-MSK. ChIP was performed using an anti-Sp1 specific antibody. A DNA fragment that does not contain Sp1-binding sites was also immunoprecipitated as a negative control, as well as an unspecific immunoprecipitation using IgG (Mock). DNA in both the input and in the immunoprecipitated fractions was quantified by qRT-PCR. Data (mean \pm SD from 3 independent experiments) are shown as the enrichment of input DNA in the immunoprecipitated fractions (** $p < 0.01$; Student's t-test).

Figure 6. Cell cycle distribution and mechanisms of cell death. (A) Flow cytometry analysis of the time-dependent changes in cell cycle distribution of A2780 cells treated with either 8 nM or 80 nM DIG-MSK. Both adherent (attached) and detached (floating) cell populations were pooled together and their distribution in the different phases of the cell cycle quantified. (B) Analysis of cell death in A2780 human ovarian carcinoma cells treated with 8 nM or 80 nM DIG-MSK. This panel shows time-course bivariate flow cytometry analyses of control and DIG-MSK-treated cells stained with Annexin-V-Fluos and PI. Percentages of necrosis, apoptosis and secondary necrosis/apoptosis (double staining) are indicated inside the panels.

Figure 7. Immunoblotting analysis of protein levels. (A) Western blots showing changes in protein levels in A2780 cells treated with 80 nM DIG-MSK for the times indicated at the top of the panel. Experiments were performed in duplicate with similar results. (B) Quantification of the Western blots shown in panel A. It shows the time-dependent decrease in Sp1 and Sp3 (short isoform) protein levels, and the time-dependent enhancement of p53 and p21^{WAF1} (CDKN1A) protein levels.

Table 1. Gene Ontology (GO) categories affected by 80 nM DIG-MSK.

GO categories ^a	Agilent Microarray (Ref. list)	Number of down- regulated genes	Number of expected genes	<i>p</i> -value ^b
<i>Biological process</i>				
Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	3101	571	385.44	4.69E-21
Transcription	1879	381	233.55	3.02E-19
Transcription from RNA polymerase II promoter	1874	380	232.93	3.44E-19
Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	1493	306	185.57	1.54E-15
Primary metabolic process	6704	978	833.27	2.18E-08
Metabolic process	7060	1010	877.51	7.65E-07
System development	1167	212	145.05	6.27E-06
Establishment or maintenance of chromatin architecture	228	58	28.34	9.58E-05
Organelle organization	253	60	31.45	5.42E-04
Developmental process	2022	317	251.32	1.96E-03
Cellular process	5081	713	631.54	1.29E-02
<i>Molecular function</i>				
Binding	5511	915	684.98	2.71E-23
DNA binding	2041	417	253.68	4.42E-22
Nucleic acid binding	3196	581	397.24	2.60E-20
Transcription factor activity	1817	364	225.84	1.77E-17
Transcription regulator activity	1817	364	225.84	1.77E-17
Transcription cofactor activity	162	44	20.14	3.74E-04
Structural constituent of ribosome	176	5	21.88	2.34E-03

^a The GO analysis was undertaken on down-regulated genes by PANTHER 7.0.

^b Binomial test.

Table 2. Gene Ontology (GO) categories affected by 8 nM DIG-MSK.

GO categories ^a	Agilent Microarray (Ref. list)	Number of Down- regulated genes	Number of expected genes	<i>p</i> -value ^b
<i>Biological process</i>				
Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	3101	48	25.03	4.33E-4
Cell cycle	10.85	22	8.76	1.06E-02
Primary metabolic process	6704	74	54.11	7.69E-02
<i>Molecular function</i>				
Binding	5511	75	44.48	1.17E-05
DNA binding	3196	50	25.79	1.49E-04

^aThe GO analysis was undertaken on down-regulated genes by PANTHER 7.0.

^bBinomial test.

Table 3. Transcription factors whose consensus binding sequences are over-represented in the promoter region of genes down-regulated by either 8 nM or 80 nM DIG-MSK in A2780 human ovarian carcinoma cells.

Transcription factor	Consensus sequence ^a	8 nM		80 nM	
		Observed genes AG: 81 ^b	Incidence <i>p</i> -value ^c	Observed genes AG: 1262 ^b	Incidence <i>p</i> -value ^c
CREB	GGTGACGTAAGG	19	1.0E-03	190	1.0E-10
EGR1	ATGCGTGGGCGT	//	//	20	2.2E-03
EGR2	A/TTGCGTGGGCGT	//	//	31	1.0E-10
EGR3	ATGCGTGGGCGT	3	4.5E-02	21	1.3E-02
E2F	TTTC/GGCGC	8	2.3E-02	66	2.0E-04
NF-kB	GGGACTTTCCA	18	1.4E-01	218	6,90E-03
N-Myc	TCCCACGTGTCA/C/G	20	1.8E-03	198	4.0E-04
MAX	AAAA/CCACGTGGTTT	13	4.9E-02	149	1.2E-02
USF	GTCACGTGGC	51	1.3E-02	//	//
Sp1	A/GGGGGGCGGGGCC	68	2.8E-07	816	1.0E-10

^a According to TELiS database (<http://www.telis.ucla.edu/>).

^b AG: Number of genes analysed.

^c Ranking according to the *p*-value (*p* < 0.05) in incidence analyses.

//These transcription factors were not enriched in the promoters.

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

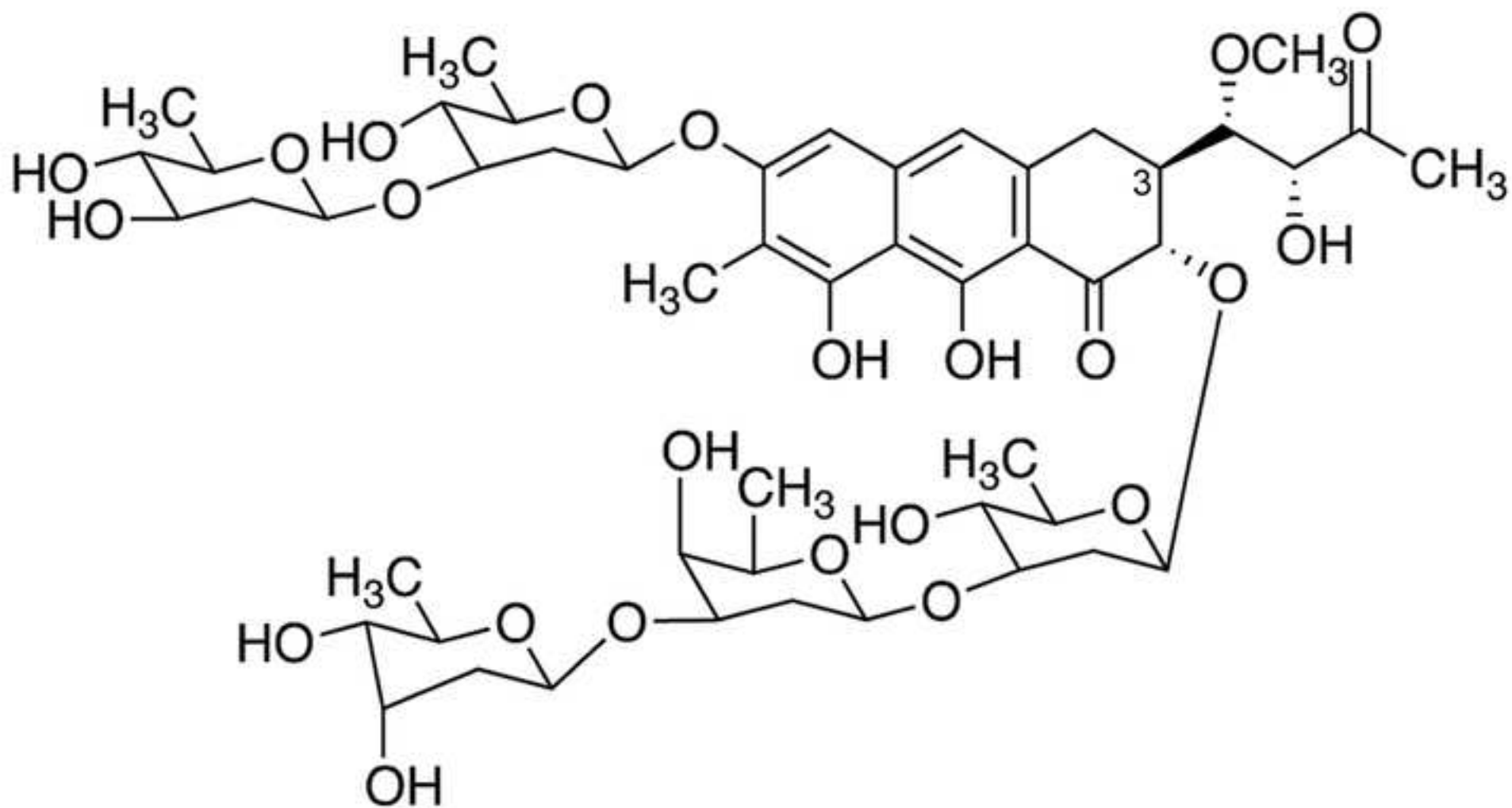


Fig. 1

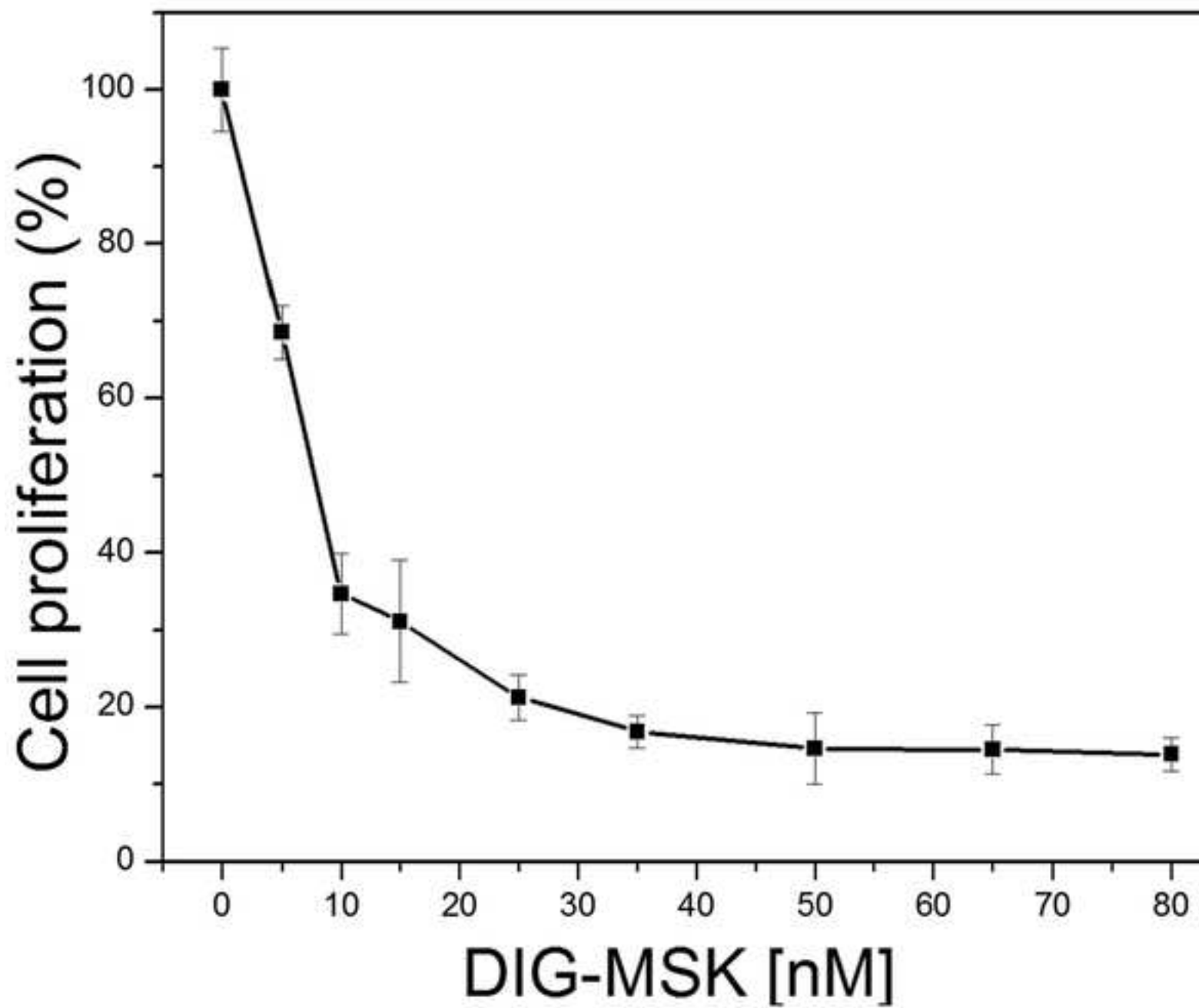


Fig. 2

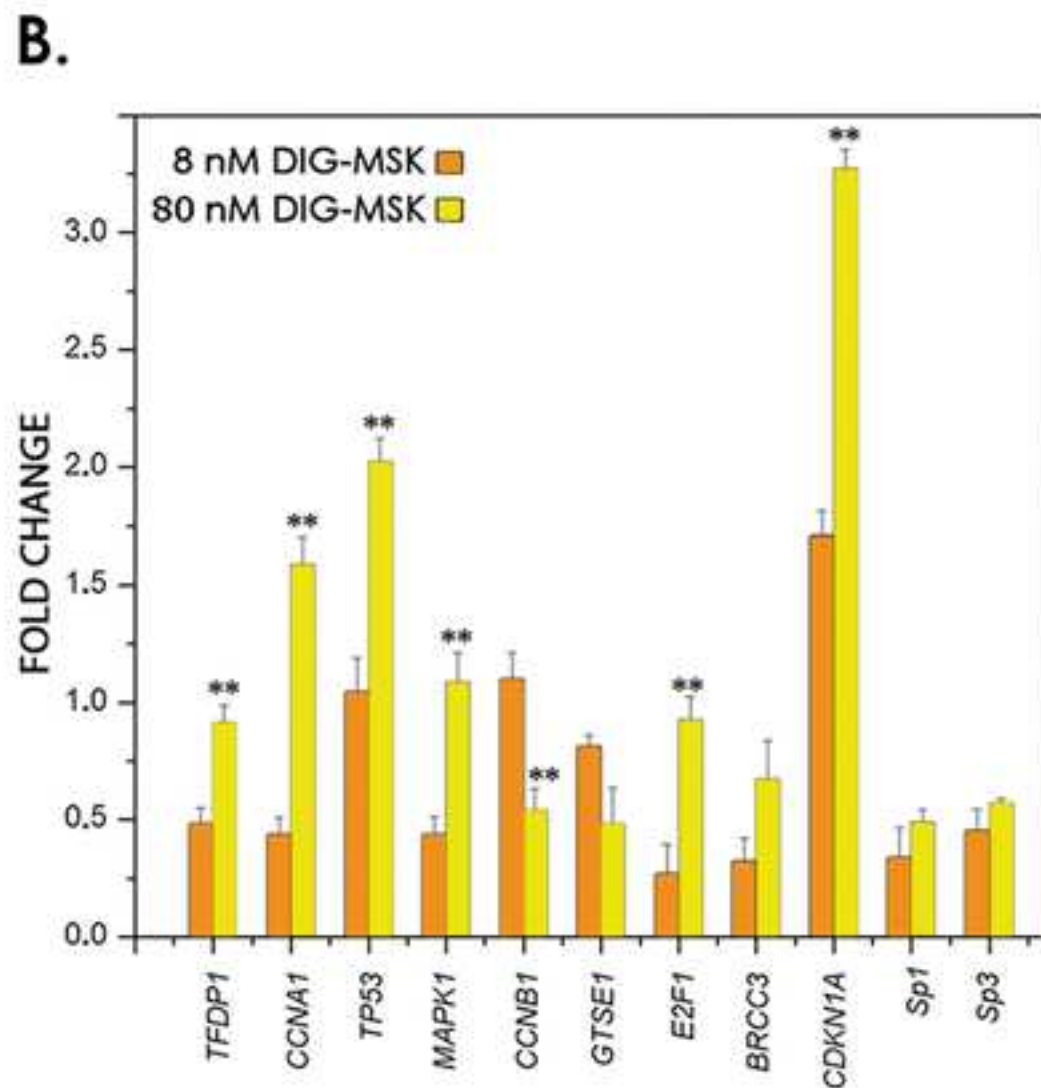
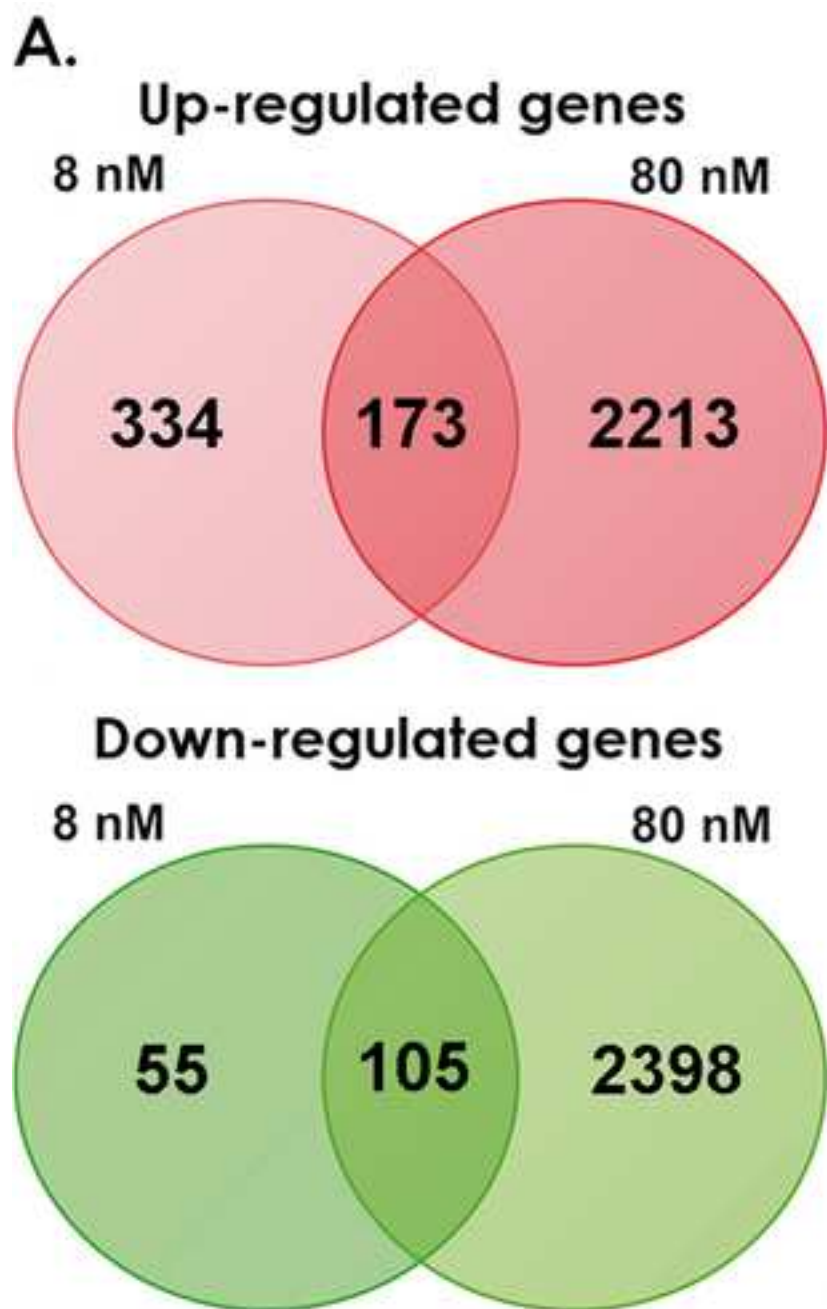


Fig. 3

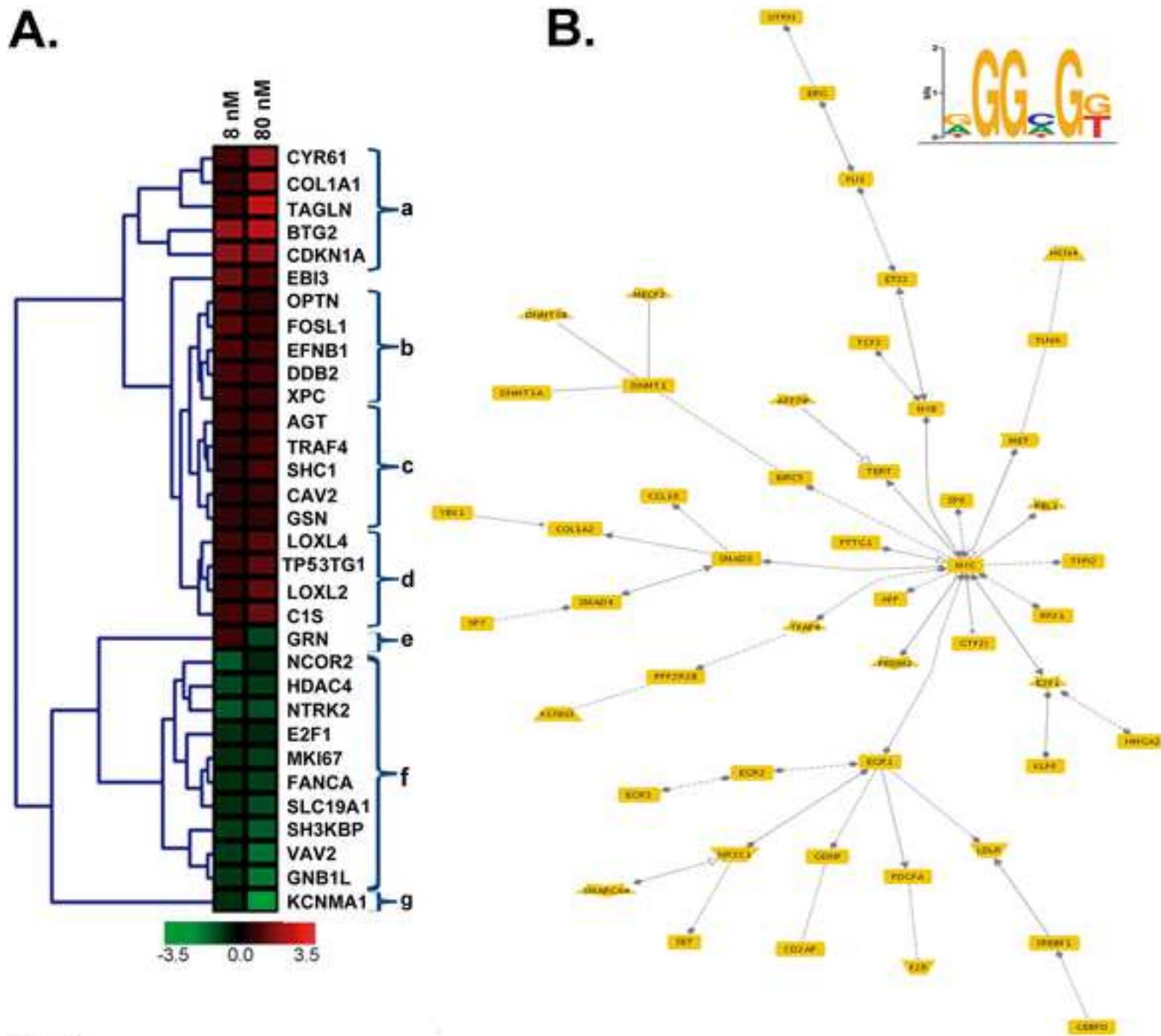


Fig. 4

Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

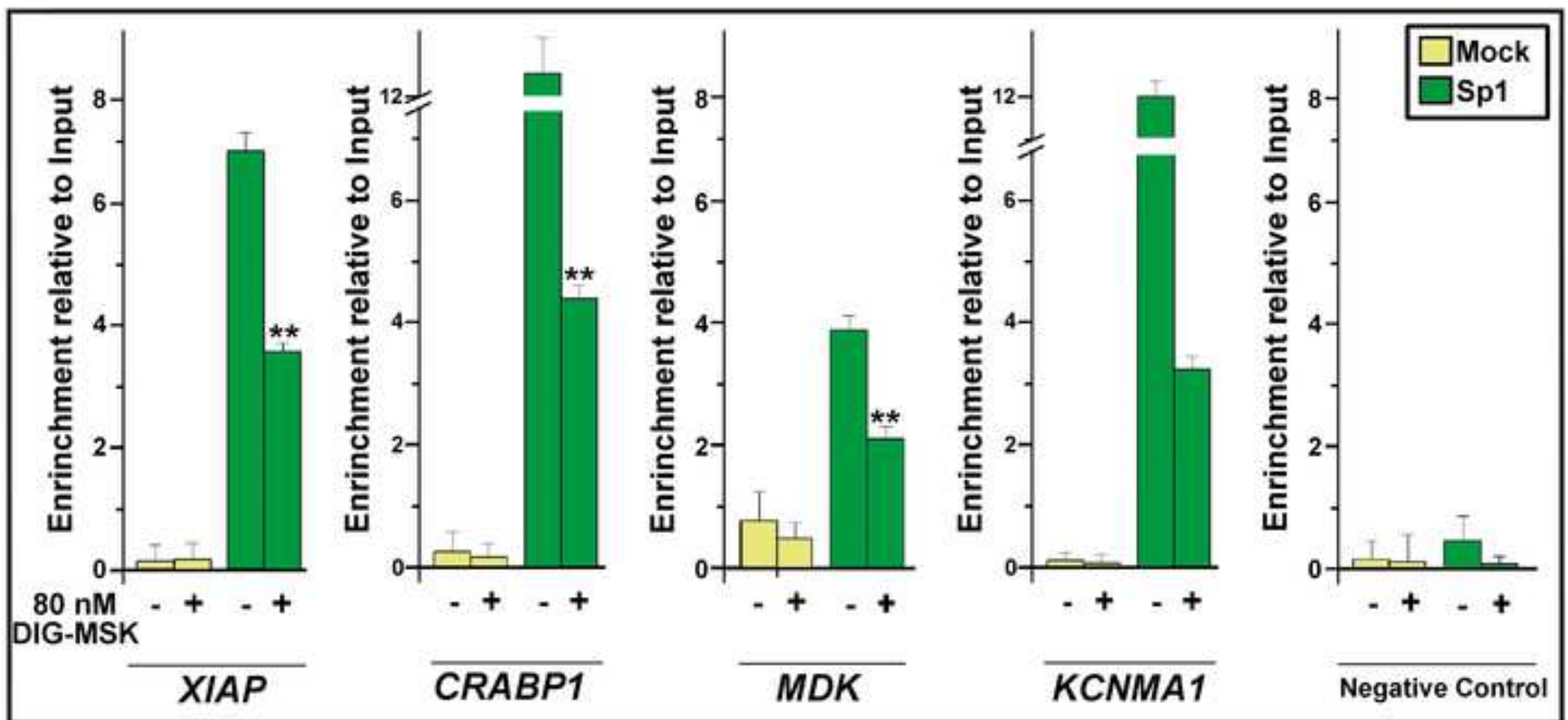


Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)

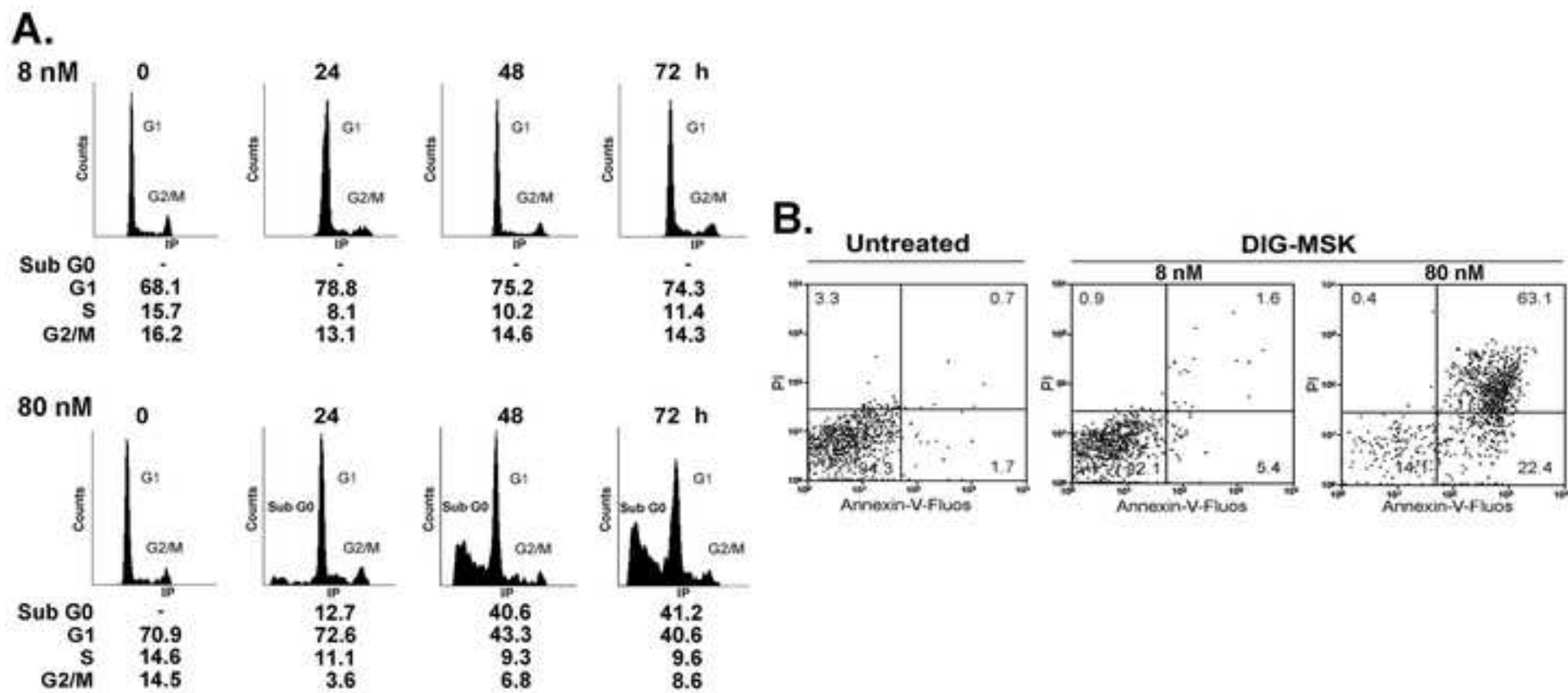
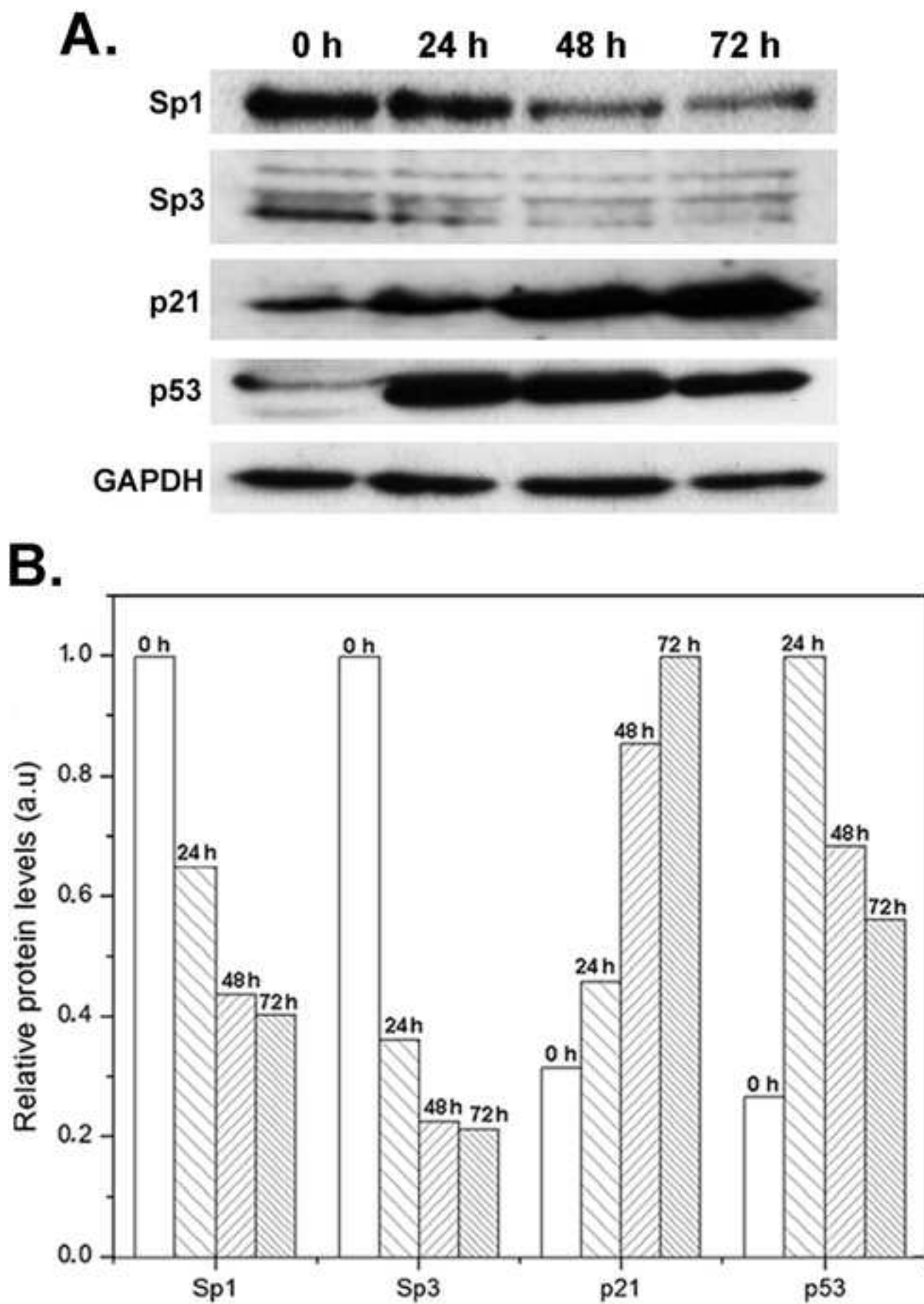


Fig. 6

**Fig. 7**

1
2
3 **Autophagy modulates the effects of bis-anthracycline WP631 on p53-deficient**
4 **prostate cancer cells**
5
6

7
8 **Sylvia Mansilla^a, Carolina Vizcaíno^a, Maria A. Rodríguez-Sánchez^a, Waldemar Priebe^b,**
9 **and José Portugal^{a*}**
10

11 ^a*Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de Barcelona, Barcelona,*
12 *Spain*
13

14 ^b*The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA*
15
16
17
18
19
20
21
22

23 *to whom correspondence should be addressed:
24

25 Dr. José Portugal, Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Parc Científic de
26 Barcelona, Baldiri Reixac, 10; E-08028 Barcelona, Spain.
27

28 Phone: +34 93 403 4959, FAX: +34 93 403 4979, E-mail: jpmbmc@ibmb.csic.es
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Treatment of p53-deficient PC-3 human prostate carcinoma cells with nanomolar concentrations of bis-anthracycline WP631 induced changes in gene expression, which resulted in G2/M cell cycle arrest, autophagy and cell death. The presence of 2-deoxy-D-glucose (2-DG), which induces metabolic stress and autophagy, enhanced the antiproliferative effects of WP631. Changes induced by WP631, 2-DG, or co-treatments with both compounds, in the expression of a variety of genes involved in autophagy and apoptosis were quantified by real-time PCR. They were consistent with a raise in autophagy followed by cell death. Some cells dying from G2/M phase showed features of necrosis like early changes in membrane permeability, while others were dying by apoptosis that occurred in presence of little caspase-3 activity. Our results indicate that WP631 is not only an antiproliferative agent acting on gene transcription, but it can also induce autophagy regardless of the presence of other pro-autophagy stimuli. The development of autophagy seemed to improve the cytotoxicity of WP631 in PC-3 cells. Our results indicate that autophagy would enhance the activity of DNA-binding drugs like WP631 that are potent inhibitors of gene transcription.

Keywords: Autophagy, Cell death, PC-3 cells, Sp1, WP631

Introduction

Diverse responses can be activated in cancer cells during chemotherapy, which depend on the antitumor agent, the dose used and the genetic background [1]. Because the loss of the ability of tumor cells to activate apoptosis following treatment with radiation or chemotherapy is one of the most frequent alterations that occur in solid tumors, the elucidation of the pathways that control p53-dependent and p53-independent cell death should provide new strategies for the development of more effective drugs. In this context, it is worth exploring whether bis-anthracycline WP631, which is known to inhibit the binding of Sp1 transcription factor to promoters [2,3] producing extensive changes in cell's transcriptome [4], can undertake its activity in autophagic cells. Autophagy is a cellular process that plays a central role in the integrated stress response [5]. It is activated by a variety of stress stimuli, including nutrient starvation, hypoxia or DNA damage, thus it can exert a pro-survival role in cell homeostasis [6,7]. To some extent, this is accomplished through the expression of genes related to autophagy, and thus the situation can be challenged by the treatment with some molecules like bis-anthracycline WP631 that abrogate gene expression.

1
2
3 Autophagy participates in the control of cellular damage in response to stress, limiting tumor
4 growth [6]. However, the process of stress survival afforded by autophagy may be a major
5 obstacle to achieving successful chemotherapeutic treatment of cancer. In fact, autophagy appears
6 to play dual roles in cancer by clearing away damaged proteins and organelles, and by preventing
7 genome damage by maintaining energy homeostasis [8-11]. Hence, disruption of autophagy,
8 which reduces cellular fitness, would promote tumorigenesis. Nonetheless, whether autophagy
9 may contribute to chemoresistance or it represents a mechanism of cell death after chemotherapy
10 is still a controversial subject [1,12]. To develop successful autophagy-modulating strategies
11 against cancer, we need to better understand how the roles played by autophagy differ depending
12 on the cell type and genetic factors. It is also necessary to determine how autophagic pathways
13 are activated or inhibited by antitumor agents. For clinical use, it is relevant to determine whether
14 enhanced autophagy is a sign of drug responsiveness or resistance [7,13,14]. Besides, when a
15 decrease in the apoptotic response occurs during therapy, this may be compensated by alternative
16 cell death mechanisms, including necrosis/necroptosis, mitotic catastrophe, and by the presence
17 of autophagy or senescence [1,15,16].

18
19
20 Bis-anthracycline WP631 bisintercalates into C/G-rich DNA regions with higher sequence-
21 selectivity and affinity than monomeric anthracyclines [17,18]. WP631 is a potent inhibitor of
22 transcription, fundamentally through direct competition with the Sp1 transcription factor for their
23 consensus binding sites in gene promoters both *in vitro* and *in vivo* [2-4,19]. In general,
24 nanomolar concentrations of WP631 have a superior cytotoxic activity than monomeric
25 anthracyclines in human cancer cell lines, and they can induce both p53-dependent and p53-
26 independent cell death [20,21]. In some human breast carcinoma cells this occurs through mitotic
27 catastrophe by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms [21].

28
29
30 The synthetic glucose analog 2-deoxy-D-glucose (2-DG) inhibits glycolysis and interferes
31 with protein folding. It can specifically amplify metabolic stress, and its use combined with
32 chemotherapeutic agents has been suggested to increase therapeutic efficacy [22]. Furthermore,
33 2-DG can be used to produce/enhance autophagy in cells [8], providing us with a tool to study the
34 effects of antitumor drugs in cells undergoing autophagy. Autophagy involves the formation of
35 autophagosomes, which are double-membrane structures that enclose and isolate targeted cellular
36 components to travel to the lysosomes, where they are degraded by acidic hydrolases [13].
37 Several genes that regulate the formation of autophagosomes and some of them, such as *LC3* and
38 *Beclin 1*, can be used as molecular markers of autophagy [23], while in turn their expression can
39 be targeted by WP631.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Pharmacological inhibition of autophagy sensitizes cancer cells to chemotherapy, suggesting
4 that suppression of the autophagic pathways is a strategy for cancer treatment [6,24,25].
5
6 Nevertheless, efficient stimulation of autophagy may also provide a therapeutic strategy for
7
8 treating resistant cancer cells that show poor apoptotic response [6].
9

10 In this paper, we evaluate whether the antitumor activity of WP631 on the p53-defective PC-
11 3 human prostate carcinoma cells is modulated by the autophagy-inductor 2-DG. Nanomolar
12 concentrations of WP631 inhibited cell growth and induced autophagy in PC-3 cells. Given that
13 the induction of autophagy appeared to contribute to chemosensibilization in PC-3 cells, we
14 hypothesize that enhancing autophagy in p53-defective cells can be used as a strategy to improve
15 the sensitivity of tumor cells to DNA-binding agents that inhibit transcription.
16
17
18
19
20
21

22 **Materials and methods**

23 **Materials and cell culture**

24 Bis-anthracycline WP631 was synthesized as described elsewhere [17]. Stocks were prepared as
25 500 μ M solutions in sterile 150 mM NaCl, maintained at -20 °C, and brought to the final
26 concentration before use with cell culture medium. 2-deoxy-D-glucose (2-DG), acridine orange,
27 Trypan blue, bafilomycin A1 (BafA1) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
28 bromide (MTT) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). BrdU (5'-bromo-2'-
29 deoxy-uridine) was from Roche Diagnostics (Madrid, Spain). All the other chemicals were
30 reagent or molecular grade, as appropriate.
31
32
33
34
35
36

37 PC-3 human prostate carcinoma cells were maintained in RPMI-1640 medium (Life
38 Technologies, Prat de Llobregat, Spain) supplemented with 2 mM sodium pyruvate (Life
39 Technologies), 10% fetal bovine serum (Life Technologies), 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml
40 streptomycin, at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Exponentially growing cells
41 subcultured at a density of 2.5 x 10⁴ cells/ml were treated with WP631, 2-DG or WP631 plus 2-
42 DG at 37 °C at the concentrations specified in Results for different periods of time.
43
44
45
46

47 **Cytotoxicity assays**

48 The effect of WP631 on PC-3 cell growth was determined by the MTT-method. Cells subcultured
49 at a density of 2.5 x 10⁴ cells/ml in 96-well microtiter plates (Corning Costar, Corning, NY) in a
50 total volume of 100 μ l were incubated with various concentrations of WP631 at 37 °C for 72 or
51 96 h. After incubation, MTT was added to each culture, and the dark-colored crystals produced
52 by viable cells were solubilized. Absorbance was determined at 570 nm using a BioTek ELx800
53
54
55
56
57
58
59
60

microplate reader (BioTek Instruments, Winooski, VT). Moreover, viable cell number was determined based on the exclusion of Trypan blue dye and a hemocytometer.

Apoptosis was quantified and distinguished from necrosis by using the Annexin-V-Fluos staining kit (Roche Diagnostics) and flow cytometry in a Coulter Epics-XL flow cytometer (Beckman Coulter, Hialeah, FL).

Quantification of acidic vesicular organelles

PC-3 cells at a density of 2.5×10^4 cells/ml were grown in 25 cm² flasks (Corning), and incubated with different concentrations of 2-DG for 24, 48 or 72 h. Cells were resuspended in PBS, incubated with 5 µg/ml acridine orange (Sigma) for 15 minutes at room temperature, washed twice with PBS, and analyzed in a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL). Fluorescence intensity values were used to calculate the relative fluorescence ratio (treated vs. control cells).

Analysis of cell cycle distribution by flow cytometry

PC-3 untreated (control) cells and cells treated with either 2-DG, WP631, or co-treated with 2-DG plus WP631 for different times were collected, fixed with 70% ethanol, stained with PI (Propidium iodide, Sigma-Aldrich), and the cell cycle distribution was determined by analyzing the nuclei in a Coulter Epics-XL flow cytometer.

Determination of DNA synthesis and quantification of the mitotic index

DNA synthesis was determined by measuring the incorporation of BrdU using a fluorescence-conjugated antibody against BrdU (BD Biosciences, San Agustín de Guadalix, Spain), co-stained with PI, and analyzed in a Coulter Epics-XL flow cytometer.

To analyze the mitotic fraction, fixed cells were incubated with the anti-phospho-Histone H3 (ser 10) antibody (Merck Millipore, Madrid, Spain) followed by Cy2-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK). Stained cells were then counterstained with PI and analyzed for Cy2 and PI fluorescence in a Coulter Epics-XL flow Cytometer.

Measurements of caspase-3 activity

A bivariate flow cytometry analysis of intracellular caspase-3 activation and apoptotic cell death was used to distinguish between cells dying by apoptosis through activation of caspase 3 from those dying through different routes. Caspase-3 activity assay was performed by incubating cells with PhiPhiLux G1D2 substrate solution (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Germany) for 1 h at 37 °C in 5% CO₂, while apoptosis was assessed by co-staining with Annexin-V-Fluos (Roche Diagnostics). The different samples were immediately analyzed in a BD FACSARIA flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) using excitations at 488 nm and 532 nm.

RNA extraction and quantitative real-time PCR analysis

1
2
3 Total RNA was extracted from control (untreated) cells and from cells treated with 2-DG, WP631
4 or 2-DG plus WP631, at the concentrations indicated below, for 24 hours. The UltraspecRNA
5 isolation reagent (Biotechx, Houston, TX) was used following the procedure provided by the
6 supplier. RNA was digested with RNase-free DNase I (Roche Diagnostics) in the presence of
7 RNase inhibitors (RNasin, Promega Biothech Iberica, Madrid, Spain), phenol extracted and
8 precipitated, and the pellet was dissolved in RNase-free water. The yield and purity of total RNA
9 were assessed spectrophotometrically, and RNA integrity examined in an Agilent 2100
10 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Wilmington, DE).

11
12
13
14
15
16 Quantitative real time PCR (qRT-PCR) experiments were designed and performed in
17 accordance with the MIQE guidelines.[26] cDNAs were synthesized from 2 µg of isolated RNA
18 obtained from two biological replicates, in a 20 µl reaction volume using the Transcriptor First
19 Strand cDNA synthesis kit (Roche Diagnostics) following manufacturer's instructions. A set of
20 10 human genes involved in the response to cellular stress, autophagy and apoptosis, as well as
21 the housekeeping gene *GAPDH*, were selected to be analyzed by qRT-PCR (see Results). Gene-
22 specific primers sets were designed using the Primer Express software (Applied Biosystems). The
23 primers used for qRT-PCR are listed in Table 1. Reactions were performed in triplicate using the
24 SYBR-Green PCR Master Mix (Roche Diagnostics). Amplification and detection were
25 performed in triplicate in a Roche LightCycler 480 system. PCR conditions included an initial
26 denaturation step at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of a denaturation step at 95 °C for
27 10 s, an annealing step at 60 °C for 30 s, and an extension step at 72°C for 10 s. Series of 10-fold
28 dilutions of cDNA were used to generate the standard curves to calculate the efficiency of the
29 amplifications. Reactions in absence of template RNA and in the absence of enzyme were also
30 performed for each primer pair as negative controls. A final dissociation curve was generated to
31 verify that a single product was amplified. Relative expression values of the different genes were
32 calculated from the threshold cycle (Ct) following the $\Delta\Delta C_t$ method [27], using *GAPDH* as
33 internal housekeeping control.

46 Western blot

47 Protein was extracted from control and treated PC-3 cells using a lysis buffer consisting of 50
48 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Igepal (NP-40) and 0.1 mM
49 phenylmethylsulfonyl fluoride, containing 2 µg/ml aprotinin (Sigma) and 1 µg/ml leupeptin
50 (Sigma). Total protein was quantified by the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA). About 50
51 µg of denatured protein was subjected to electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels, blotted
52 onto Optitran BA-S85 membranes (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany), probed with the
53 specific antibodies for LC3 (MBL, BioNova, Madrid, Spain), Beclin 1 (AbDSerotec, BioNova),
54
55
56
57
58
59

1
2
3 Anti-p62/SQSTM1 (Sigma-Aldrich), Anti-PARP (Roche Diagnostics) and β -tubulin (Merck
4 Millipore), incubated with secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) and detected by
5 using Luminol (Sigma).
6
7

8 **Statistical analysis**

9
10 Statistical analysis was performed using SPSS v.21 (IBM Corp., Armonk, NY). Results represent
11 the mean \pm SD, or mean \pm SEM values, from three independent experiments. Statistical
12 differences in gene expression between control, untreated cells, and each of the treatments were
13 evaluated by the unpaired Student's t-test. One-way analysis of variance (ANOVA) and further
14 Tukey's post-hoc test were performed for multiple comparisons of differences in the relative gene
15 expression after the various treatments.
16
17
18
19

20 **Results**

21 **Autophagy potentiates the antiproliferative effects of WP631 on PC-3 human prostate** 22 **carcinoma cells**

23
24 As the first step toward characterizing the effects of WP631 on PC-3 human prostate carcinoma
25 cells, we evaluated its antiproliferative effects by the MTT-assay, using a wide range of drug
26 concentrations for 72 and 96 h (Fig. 1A). Low nanomolar concentrations of WP631 strongly
27 inhibited cell growth, although the drug concentration required to inhibit the growth of PC-3 cells
28 by 75% (its IC_{75}) was only quantifiable after 96-h treatment ($IC_{75}=165.0 \pm 0.8$ nM), see Fig. 1A.
29
30
31
32

33
34 The glucose analog 2-deoxy-D-glucose (2-DG) was used to examine whether activating
35 autophagy in PC-3 cells may alter the cytotoxic effects of WP631. To define optimal
36 experimental conditions, PC-3 cells were treated with either 5 mM or 15 mM 2-DG for 24, 48,
37 and 72 h respectively, stained with acridine orange and analyzed by flow cytometry (Fig. 1B),
38 taking advantage of the acridine orange accumulation on acidic organelles (autophagosomes and
39 autolysosomes) [25]. In parallel, we determined cell viability after those treatments by Trypan
40 blue staining (Fig. 1B). The ratios between the mean acridine orange fluorescence in cells treated
41 with either 5 or 15 mM 2-DG and in untreated cells are shown in Fig. 1B, together with the
42 corresponding percentages of cell viability. The presence of 2-DG increased the fluorescence
43 ratios in a dose-dependent way, which implies that acidic vesicular organelles were formed,
44 consistent with the induction of autophagy. Altogether, the experiments shown in Fig. 1 allowed
45 us to determine the concentration of 2-DG inducing autophagy without massive cell death that
46 was suitable for combination studies. The highest fluorescence intensity was obtained in cells
47 treated with 15 mM 2-DG, but this treatment induced high mortality (50% of the treated cells
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 were positive for Trypan blue staining (Fig. 1B)). Hence, a concentration of 5 mM 2-DG was
4 selected for further experiments to investigate the effect of double treatments for longer periods.

5
6 Quantification of the number of viable cells in the presence of either 5 mM 2-DG or 165 nM
7 WP631 showed that both compounds had similar effects in cell viability after 5-h or 3-day
8 treatments (Fig. 1C). However, WP631 was more cytotoxic than 2-DG, as measured by the
9 ability of living cells to exclude Trypan blue after continuous treatments. About 69% cells treated
10 with 161 nM WP631 for 10 days were dead and detached, floating, in the culture medium, while
11 2-DG only produced 28% mortality (Fig. 1C). The cytotoxic effect of WP631 was strongly
12 enhanced by co-treatment with 2-DG since almost 100% cells died after 10-day continuous
13 treatment, while most of the untreated cells remained alive (Fig. 1C).

14 15 16 17 18 19 **WP631 induces autophagy in PC-3 cells, which is followed by transient cell cycle arrest in** 20 **G2/M phase**

21
22 Western blot analyses revealed the rise in the levels of the autophagy marker LC3-II in PC-3 cells
23 treated with 5 mM 2-DG for 24 h (Fig. 2), consistent with the acridine orange staining
24 experiments described above. We used time-course immunoblotting analyses to compare the
25 differences in the levels of LC3-II between cells treated with WP631 or co-treated with 2-DG
26 plus WP631, and compare them to those induced by 2-DG alone. Treatments with 165 nM
27 WP631 rose the levels of the lipidated LC3-II form in keeping with autophagy activation. Co-
28 treatment with 2-DG plus WP631 for 24 h produced higher accumulation of the LC3-II marker
29 (Fig. 2A). Because LC3-II may be itself degraded during autophagy [28], we sought further
30 evidences on whether WP631, either alone or in presence of 2-DG, activated autophagy by
31 examining the autophagic flux in the presence of 100 nM BafA1 that blocked the fusion between
32 autophagosomes and lysosomes (Fig. 2B). WP631 increased the LC3-II levels in 24-h treatments,
33 while co-treatments with 2-DG plus WP631 caused the highest LC3-II levels. Moreover,
34 p62/SQSTM1 degradation was examined after the different treatments both in the absence (Fig.
35 2A) and in the presence of BafA1 (Fig. 2B). 2-DG alone produced clear p62/SQSTM1
36 degradation. This degradation was lower when BafA1 was present as it blocked the fusion
37 between autophagosomes and lysosomes (Fig. 2B). Nevertheless, a decline in p62 levels was
38 observed upon treatments with WP631. Given that p62 function is not limited solely to
39 autophagy, we consider it could tentatively indicate a stress response of drug-treated cells that
40 resulted in its partial degradation. Altogether, our results denoted that autophagy was involved in
41 an early response of PC-3 cells to WP631, and that the combination of 2-DG plus WP631
42 attained the highest levels of autophagy.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Changes in cell cycle distribution after treatments with 2-DG, WP631, or the combined
4 treatment with 2-DG plus WP631, were time-dependent (Fig. 3A). Both adherent and detached
5 cells were pooled together for cytometric analysis. A quantification of the percentage of cells
6 found in the different phases of the cell cycle, detected by flow cytometry, is shown in Table 2.
7
8 Both untreated cells and those treated with 2-DG accumulated in G1 phase, yet the percentage of
9 cells decreased upon treatment. On the other hand, cells treated with WP631 alone, or co-treated
10 with 2-DG, mainly accumulated in G2/M phase (Fig. 3A and Table 2). After halting in G2/M
11 phase, cells accumulated in what, at first glance, could be considered an S phase peak. However,
12 we observed that those cells were not synthesizing DNA, as they did not incorporate BrdU (Fig.
13 3B). These results indicated that the cytometric S-like peak corresponded to cells dying from
14 G2/M rather than to cells accumulating in S phase (seemingly, cells dying from G2/M phase
15 underwent DNA degradation and registered as S-like phase). Moreover, the presence of the
16 mitotic Histone H3pS10 variant (ser-10-phosphorylated Histone H3) was evaluated in cells
17 treated either with WP631 or with 2-DG plus WP631 to distinguish whether cells arrested in
18 G2/M where in G2 or entering mitosis before they were committed to dying. Treated cells did not
19 show any increase in their mitotic index compared to untreated cells (Fig. 3C), thus they were not
20 in mitosis. It could still be the case that some cells entered a faulty mitosis and, after a swift
21 slippage, they became a fraction of the S-like peak.

22 **WP631 changes the expression of genes involved in autophagy and apoptosis**

23 Given that WP631 is a potent agent acting on transcription (see Introduction), we sought to
24 disclose whether the rising of autophagy in PC-3 cells may correlate with changes in gene
25 expression, and if those changes affected the expression of genes involved in apoptosis. To this
26 end, we selected a set of ten genes involved in the control of apoptosis, autophagy, or/and they
27 are known targets of WP631. Namely: *Sp1*, *c-Myc*, *Beclin 1*, *ATG3*, *BCL2 (Bcl-2)*, *LC3*, *ATG4B*,
28 *BAX*, *CASP3 (caspase-3)* and *NF-kB1*.

29 Gene expression was quantified by qRT-PCR after 24-h treatments. Table 3 presents a
30 complete data set for all the genes analyzed after treatments with 5 mM 2-DG, 165 nM WP631,
31 or co-treatment with 5 mM 2-DG plus 165 nM WP631. Table 3 includes the normalized
32 experimental Ct-values and it reports the statistical pairwise analysis of the differences in gene
33 expression between untreated cells and cells undergoing any of the three treatments. A
34 comparison of the relative expression profiles for the whole set of genes is shown in Fig. 4.
35 Changes in gene expression depended on the treatment, and both up- and down-regulated genes
36 were observed. In general, differences in the relative gene expression were statistically significant
37 (details are reported in Table 3 and legend to Fig. 4).

1
2
3 While WP631 mainly induced gene repression, treatment of PC-3 cells with 5mM 2-DG
4 augmented significantly the expression of seven genes, and only *NF-kB1* was down-regulated
5 (Fig. 4 and Table 3). The glucose analog 2-DG up-regulated the expression of the early-response
6 genes *Sp1* and *c-Myc*, and the inductor of autophagy *Beclin 1*, which suggests that those changes
7 in gene expression were a response to metabolic/cellular stress induced by 2-DG. Indeed, *Beclin*
8 *1* was up-regulated by every treatment, although the differences in the degree of up-regulation
9 induced by any treatment were barely significant. Therefore, we used Western blot to confirm the
10 concomitant enhancement of Beclin 1 protein levels upon treatments (see below).

11
12 WP631 changed the expression of eight genes significantly (Table 3 and Fig. 4), of which
13 seven were down-regulated. *Beclin 1*, which is a key player in the autophagic response, was up-
14 regulated by WP631 (1.2-fold, $p = 0.18$). Changes in the expression of the anti-apoptotic *Bcl-2*
15 and the pro-apoptotic *BAX* were observed in the different treatments (Table 3 and Fig. 4). *Bcl-2*
16 was significantly down-regulated in co-treatment experiments ($p < 0.01$), while either 2-DG ($p <$
17 0.01) or WP631 ($p = 0.7$) enhanced its expression, while *BAX* was down-regulated by both
18 WP631 and the co-treatments.

19
20 Combined treatment with 5 mM 2-DG plus 165 nM WP631 inhibited the expression of eight
21 genes significantly (Table 3 and Fig. 4). As in treatments with WP631 alone, *LC3* expression was
22 up-regulated ($p < 0.05$). Unlike in PC-3 cells treated with 2-DG, in which *Sp1* and *c-Myc* were
23 up-regulated, the treatments with WP631 alone, or in its combination with 2-DG, resulted in a
24 strong inhibition of the Sp1-dependent genes *c-Myc* and *Sp1*, in agreement with the great effects
25 of WP631 on gene transcription [4,20]. This occurred together with the reduced transcription by
26 WP631 of the autophagy-related genes *ATG3* and *ATG4B*, which are involved in the processing
27 of LC3 and the autophagosome biogenesis [29]. The down-regulation of those genes that
28 participate in LC3 lipidation did not appear to affect the rise in the LC3-II levels after 24-h
29 treatments (Fig. 2), thus indicating that the remaining levels of transcription were enough for
30 autophagy to occur, or that other pathways could be involved in the formation of LC3-II upon
31 treatments with WP631. *NF-kB1* expression was down-regulated by every treatment, which
32 suggest that both WP631 and 2-DG can abrogate the pro-survival *NF-kB* pathway. The
33 expression of *CASP3* (*caspase-3*) was slightly up-regulated by 2-DG. An intriguing aspect of the
34 qRT-PCR results was the down-regulation of *CASP3* by the other treatments, with significant
35 superior repression by the co-treatments ($p < 0.05$; Fig. 4). Given that changes in the expression
36 of caspase-3 may preclude the final fate of PC-3 cells, we performed experiments aimed at
37 understanding the routes that may commit cells to dying and the role played by caspase-3, which
38 are described below. In general, the patterns of gene expression in PC-3 human prostate
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 carcinoma cells treated with WP631 or co-treated with 2-DG plus WP631 were equivalent (see
4 legend to Fig. 4), although, as described above, down-regulation of *Bcl-2* was observed after the
5 co-treatments.
6

7 **WP631 induces early changes in the permeability of cell membranes and caspase-3** 8 **independent apoptosis in PC-3 cells**

9
10 Double staining with Annexin-V-Fluos and PI was used to determine the fate of cells dying after
11 the different treatments. Based on the staining pattern, cells were classified as: apoptotic (high
12 levels of Annexin-V-Fluos, which detects the presence of cell-surface phosphatidylserine, and
13 low PI staining), necrotic (high levels of PI staining, caused by changes in membrane
14 permeabilization, and low staining of Annexin-V-Fluos), and secondary apoptosis/necrosis (high
15 levels of staining with both Annexin-V-Fluos and PI). Flow cytometry showed that untreated,
16 control, cells were mostly viable throughout the period analyzed, while a time-dependent increase
17 of cell death was observed for all the treatments (Fig. 5A). PC-3 cells treated with 5 mM 2-DG
18 mainly died through apoptosis. Treatment with 165 nM WP631 produced early small change in
19 membrane permeability in PC-3 cells, characterized by a slight increase in PI staining, which was
20 followed by massive apoptosis (Fig. 5A).
21
22

23
24 Co-treatments with 2-DG plus WP631 induced higher levels of apoptosis (17.9% Annexin-
25 V-Fluos positive cells after 72 h) compared to 2-DG (9.1%) or WP631 (15.7%) (Fig. 5A and
26 Table 4). A quantification of the percentages of necrosis, apoptosis, and secondary
27 apoptotic/necrotic cell death after the different treatments is summarized in Table 4. Having
28 established that apoptosis was induced by the different treatments, we examined whether caspase-
29 3 was involved. PC-3 cells treated with 2-DG, WP631 or 2-DG plus WP631 up to three days
30 displayed both Annexin-V-Fluos staining and caspase-3 activity (i.e. cleavage of the Phiphilux
31 substrate) (Fig. 5B). However, the highest enzymatic activity was observed in treatments with 2-
32 DG. The presence of little caspase-3 activity after treatments with WP631 alone was in
33 agreement with the inhibition of its gene expression by the drug (see above).
34
35

36
37 To gain further insights into the pathways and mechanisms involved in cell death, we also
38 examined by immunoblotting the DNA-damage response protein poly [ADP-ribose] polymerase
39 (PARP) [30]. Fig. 5C shows Western blot analyses of PARP cleavage and Beclin 1 levels. A
40 slight cleavage of PARP was observed in the presence of WP631 and 2-DG plus WP631
41 consistent with emerging apoptotic cell death, whereas it was almost undetectable in treatments
42 with 2-DG, even though this treatment was accompanied by a higher caspase-3 activity (cf.
43 panels C and B in Fig. 5). The levels of the autophagy-related Beclin 1 increased after all the
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 treatments, in line with the qRT-PCR results (cf. Fig. 5C and Fig. 4) and, in turn, with the rise of
4 autophagy (Fig. 2).
5
6
7

8 **Discussion**

9
10 The experiments described here were designed to answer the question as to whether DNA-
11 binding drugs can be effective inducers of cell death in the presence of high levels of autophagy,
12 because autophagy may play a key role in regulating cell death induced by anticancer agents
13 [1,6,7,11,13]. Taking into consideration the complex relationship between cell death and the
14 autophagic pathways, we have explored the potential interactions and problems that may arise
15 when p53-deficient cells are treated with DNA-binding agents while autophagy is taking place.
16 To this end, we have examined PC-3 human prostate carcinoma cells, in which autophagy
17 (augmented by the glucose analog 2-DG) was active during the treatment with bis-anthracycline
18 WP631, and analyzed changes in gene expression and in the cell death routes followed by cells
19 undergoing autophagy.
20
21
22
23
24
25
26

27 Co-treatment of PC-3 human prostate carcinoma cells with WP631 plus 2-DG reveals
28 combined antiproliferative effects (Fig. 5A) that are in keeping with that conventional
29 chemotherapeutic agents (WP631 is an anthracycline that binds to DNA [17,18]) may be used
30 together with pathway-targeted agents (the pro-autophagic 2-DG compound targets glycolysis
31 [8]) to reach synergistic anticancer effects. In the context of the therapeutic targeting of the
32 cancer cell metabolism and autophagy [22,31], our results may be used to design new strategies
33 based on strong inhibitors of transcription like WP631. Remarkably, we have observed that
34 WP631 alone can induce some time-dependent autophagy (Fig. 2), which seems to enhance its
35 cytotoxicity rather than to disrupt it.
36
37
38
39
40
41

42 Chiefly, there was no significant difference between the gene expression profiles in cells
43 treated with WP631 or co-treated with WP631 plus 2-DG (Fig. 4). It is noteworthy that WP631
44 was superior to 2-DG in enhancing the expression of the autophagy-related *LC3* gene. Besides,
45 LC3-II, the active form of the *LC3* gene product, was augmented after treatment (Fig. 2). The
46 comparison of LC3-II levels in PC-3 cells upon the different treatments is considered an
47 accurate indicator of autophagy [32]. WP631 can compete with Sp1 transcription factor for
48 binding to their consensus sites in gene promoters [2,19], and it circumvents a type of multidrug
49 resistance by both its “anti-transcriptional effect” and via its direct interaction with the efflux
50 pump [33]. Whilst the changes observed in the transcription of several genes (Fig. 4) are coherent
51 with direct gene targeting by WP631, it cannot be ruled out we were also observing some effects
52 that are not directly related to WP631 binding to DNA. Indirect effects may arise after the
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 transcriptional up-regulation of several genes (Fig. 4 and Table 3), owing to the response of cells
4 to general stress generated by the exposure to WP631 and/or 2-DG.

5
6 2-DG up-regulates several genes involved in autophagy in PC-3 cells (Fig. 4) in agreement
7 with its pro-autophagic role. Moreover, other genes that can be involved in proliferation, like *c-*
8 *Myc*, were also up-regulated by this compound. Meanwhile, WP631 inhibited *c-Myc*
9 transcription, which is likely to occur by competition with the Sp1 transcription factor for their
10 consensus binding sites in the *c-Myc* promoters. Those changes in gene expression can reflect the
11 response of PC-3 cells to stress. Although *c-Myc* can be necessary for apoptosis under certain
12 conditions and it can induce apoptosis by p53-independent mechanisms [34], its down-regulation
13 by WP631 indicates that it plays a marginal role in the apoptotic cell death observed under our
14 experimental conditions. The rise of apoptosis in PC-3 cells while autophagy is operative
15 suggests a role for *Bcl-2* and *Beclin 1* in the cellular response. Both genes were up-regulated by
16 2-DG or WP631, whereas co-treatments reduced *Bcl-2* expression. Although the *Bcl-2* family of
17 proteins was initially characterized as cell death regulators, they might also control autophagy
18 [35], in line with our results. Furthermore, *Beclin 1* network regulates autophagy, and it can be
19 considered a measure of autophagy competence [6,36]. For each treatment, our results speak for
20 the occurrence of a co-regulation of the pathways that bring PC-3 cells to both autophagy and
21 apoptosis. On the other hand, because the *Bcl-2* family regulates 2-DG toxicity [37] the down-
22 regulation of *Bcl-2* by the co-treatments could augment toxicity. The relatively high levels of
23 *Beclin 1* expression and of the protein it encodes (Figs. 4 and 5C), as well as p62/SQSTM1
24 degradation, are consistent with the rise of autophagy with LC3 being responsible for recruiting
25 p62 into autophagosomes [38]. Nevertheless, p62 degradation also occurred in WP631-treated
26 cells in the presence of autophagic flux inhibitors (Fig. 2B). This would indicate that p62 function
27 was not limited solely to autophagy in those cells, but it is associated to other processes such as
28 stress response of drug-treated cells, which could result in its partial degradation. Down-
29 regulation of *NFκB1* after treatments with WP631 (Fig. 4) suggests this compound may prevent
30 the role of p62 as activator of NFκB [39].

31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48 PC-3 human prostate carcinoma cells treated with WP631 or 2-DG, as well as co-treated
49 ones, were committed to dying (Figs. 1C and 5A). Changes in gene expression, including those in
50 genes that play key roles in autophagy and apoptosis, failed to prevent cell death. Under some
51 experimental conditions, those changes encompass the down-regulation of the pro-apoptotic *BAX*
52 (Fig. 4). Death occurred after the rise of autophagy, but early necrosis and, fundamentally,
53 apoptosis were observed, consistent with that autophagy would constitute a futile attempt to adapt
54 to stress rather than a cell death mechanism [12].

1
2
3 Cells dying from G2/M phase showed some features of necrosis, as early changes in
4 membrane permeability, and ensuing apoptosis occurred in the presence of little caspase-3
5 activity (Fig. 5B). Given the low levels of caspase-3 after the different treatments, it may be
6 argued that other caspases were involved in the apoptotic response. WP631 seems to activate the
7 cleavage of PARP, which is at variance with the concept that PARP inhibition may represent a
8 way of targeting p53-deficient cells [30] as WP631 targets these cells efficiently. The presence of
9 some activation (cleavage) of PARP and the augmented expression of Beclin 1 (Fig. 5C) could
10 promote caspase-8 degradation [40], thus caspase-8 seems an unlikely candidate to trigger
11 apoptosis.
12

13
14
15
16
17
18 Autophagy stimulators such as 2-DG induce metabolic stress that can be useful not only for
19 cancer prevention and treatment [8], but also as advantageous modulators of anticancer
20 chemotherapy [7,41]. While previous reports have mainly indicated the combined effect of
21 inhibiting apoptosis and autophagy can increase the cytotoxicity of certain compounds [24], our
22 results highlight that enhancing autophagy during treatment with DNA-binding drugs might reach
23 a complementary effect, at least in p53-deficient cells, in line with that autophagy would become
24 the main death inducing pathway in apoptosis-deficient cells [7]. In summary, death with
25 autophagy in the p53-deficient PC-3 human prostate carcinoma cells agrees with that dual
26 enhancement of autophagy and apoptosis presents potential therapeutic interest. Activation of
27 autophagy may be used to enhance the anticancer effects of WP631 and other potent transcription
28 inhibitors.
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **Acknowledgements**

39 Supported by grant BFU2010-15518 from the Spanish Ministry of Science and Innovation and
40 the FEDER program of the European Community. This work was performed within the
41 framework of the 'Xarxa de Referencia en Biotecnologia' of the Generalitat de Catalunya. C.V. is
42 recipient of a JAE-Predoc2010 fellowship (CSIC), co-financed by the European Social Fund. The
43 sponsors had no involvement in the study design, in the collection, analysis and interpretation of
44 data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for
45 publication. SM, CV, and MR-S performed the research, WP contributed essential reagents, SM,
46 CV, MR-S and JP analyzed the data, SM and JP designed the research study and wrote the
47 manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.
48
49
50
51
52
53
54

55 **Conflict of interests**

56 The authors confirm that there are no conflicts of interest.
57
58
59
60

References

1. **Mansilla S, Llovera L, Portugal J.** Chemotherapeutic targeting of cell death pathways. *Anticancer Agents Med Chem.* 2012; 12: 226-38.
2. **Mansilla S, Priebe W, Portugal J.** Sp1-targeted inhibition of gene transcription by WP631 in transfected lymphocytes. *Biochemistry.* 2004; 43: 7584-92.
3. **Hekmatnejad B, Gauthier C, St-Arnaud R.** Control of Fiat (factor inhibiting ATF4-mediated transcription) expression by Sp family transcription factors in osteoblasts. *J Cell Biochem.* 2013; 114: 1863-70.
4. **Mansilla S, Priebe W, Portugal J.** Transcriptional changes facilitate mitotic catastrophe in tumour cells that contain functional p53. *Eur J Pharmacol.* 2006; 540: 34-45.
5. **Kroemer G, Mariño G, Levine B.** Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell.* 2010; 40: 280-93.
6. **Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, et al.** Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res.* 2011; 17: 654-66.
7. **Notte A, Leclere L, Michiels C.** Autophagy as a mediator of chemotherapy-induced cell death in cancer. *Biochem Pharmacol.* 2011; 82: 427-34.
8. **White E, DiPaola RS.** The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 5308-16.
9. **Kroemer G, Levine B.** Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 1004-10.
10. **Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G.** Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15: 81-94.
11. **Gewirtz DA.** The four faces of autophagy: implications for cancer therapy. *Cancer Res.* 2014; 74: 647-51.
12. **Shen S, Kepp O, Kroemer G.** The end of autophagic cell death? *Autophagy.* 2012; 8: 1-3.
13. **Platini F, Pérez-Tomás R, Ambrosio S, Tessitore L.** Understanding autophagy in cell death control. *Curr Pharm Des.* 2010; 16: 101-13.
14. **Bincoletto C, Bechara A, Pereira GJ, et al.** Interplay between apoptosis and autophagy, a challenging puzzle: New perspectives on antitumor chemotherapies. *Chem Biol Interact.* 2013; 206: 279-88.
15. **Kreuzaler P, Watson CJ.** Killing a cancer: what are the alternatives? *Nat Rev Cancer.* 2012; 12: 411-24.
16. **Surova O, Zhivotovsky B.** Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene* 2013; 32: 3789-97.

17. **Chaires JB, Leng FF, Przewloka T, et al.** Structure-based design of a new bisintercalating anthracycline antibiotic. *J Med Chem.* 1997; 40: 261-6.
18. **Leng F, Priebe W, Chaires JB.** Ultratight DNA binding of a new bisintercalating anthracycline antibiotic. *Biochemistry.* 1998; 37: 1743-53.
19. **Martín B, Vaquero A, Priebe W, Portugal J.** Bisanthracycline WP631 inhibits basal and Sp1-activated transcription initiation *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27: 3402-9.
20. **Villamarín S, Ferrer-Miralles N, Mansilla S, et al.** Induction of G2/M arrest and inhibition of *c-myc* and *p53* transcription by WP631 in Jurkat T cells. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63: 1251-8.
21. **Mansilla S, Priebe W, Portugal J.** Mitotic catastrophe results in cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Cell Cycle.* 2006; 5: 53-60.
22. **Maschek G, Savaraj N, Priebe W, et al.** 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers *in vivo*. *Cancer Res.* 2004; 64: 31-4.
23. **DiPaola RS, Dvorzhinski D, Thalasila A, et al.** Therapeutic starvation and autophagy in prostate cancer: a new paradigm for targeting metabolism in cancer therapy. *Prostate.* 2008; 68: 1743-52.
24. **Saleem A, Dvorzhinski D, Santanam U, et al.** Effect of dual inhibition of apoptosis and autophagy in prostate cancer. *Prostate.* 2012; 72: 1374-81.
25. **Sasaki K, Tsuno NH, Sunami E, et al.** Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC Cancer.* 2010; 10: 370.
26. **Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al.** The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009; 55: 611-22.
27. **Pfaffl MW.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: e45.
28. **Mizushima N, Yoshimori T, Levine B.** Methods in mammalian autophagy research. *Cell.* 2010; 140: 313-26.
29. **Fujita N, Itoh T, Omori H, et al.** The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell.* 2008; 19: 2092-100.
30. **Muñoz-Gámez JA, Martín-Oliva D, Aguilar-Quesada R, et al.** PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Biochem J.* 2005; 386: 119-25.
31. **Cheong H, Lu C, Lindsten T, Thompson CB.** Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat Biotechnol.* 2012; 30: 671-8.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
32. **Mizushima N, Yoshimori T.** How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 2007; 3: 542-5.
33. **Mansilla S, Rojas M, Bataller M, et al.** Circumvention of the multidrug-resistance protein (MRP-1) by an antitumor drug through specific inhibition of gene transcription in breast tumor cells. *Biochem Pharmacol.* 2007; 73: 934-42.
34. **Sheen JH, Woo JK, Dickson RB.** c-Myc alters the DNA damage-induced G2/M arrest in human mammary epithelial cells. *Br J Cancer.* 2003; 89: 1479-85.
35. **Levine B, Sinha S, Kroemer G.** Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 2008; 4: 600-6.
36. **Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D.** The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011; 18: 571-80.
37. **Zagorodna O, Martin SM, Rutkowski DT, et al.** 2-Deoxyglucose-induced toxicity is regulated by Bcl-2 family members and is enhanced by antagonizing Bcl-2 in lymphoma cell lines. *Oncogene.* 2012; 31: 2738-49.
38. **Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, et al.** p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* 2007; 282: 24131-45
39. **Moscat J, Diaz-Meco MT.** p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends Biochem Sci.* 2012; 37: 230-6
40. **Hou W, Han J, Lu C, et al.** Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy.* 2010; 6: 891-900.
41. **Levy JM, Thorburn A.** Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes. *Pharmacol Ther.* 2011; 131: 130-41.

Table 1 Primers used for qRT-PCR

Gene ^a	Primers
<i>SP1</i>	for: 5'-CAGCTTCAGGCTGTTCCAAACT-3' rev: 5'-CTGCCAACTGACCTGTCCATT-3'
<i>MYC</i>	for: 5'-GGGATCGCGCTGAGTATAAAA-3' rev: 5'-CGAGTTAGATAAAGCCCCGA-3'
<i>Beclin1</i>	for: 5'-TCCACAGAAAGTGCCAACAGC-3' rev: 5'-TGTCAAAAAGGTCCCCAGTGA-3'
<i>ATG3</i>	for: 5'- ACCACTGTCCAACATGGCAA-3' rev: 5'-GCACGGCACATTTTTGGTTAC-3'
<i>ATG4B</i>	for: 5'- ATGATCTTTGCCCAAGCCCT-3' rev: 5'- CCTCCAATCTCGGCCTAGGT-3'
<i>CASP3</i>	for: 5'- GCATACTCCACAGCACCTGGT-3' rev: 5'- GAGCCATCCTTTGAATTCGC-3'
<i>NFKB1</i>	for: 5'- GCAGCTCTTCTCAAAGCAGCA-3' rev: 5'- GCTCAAAGTTCTCCACCAGGG-3'
<i>LC3</i>	for: 5'- ACCAGCACCCCAGCAAAT-3' rev: 5'- GCTTCTCACCCCTGTAGCGCT-3'
<i>BCL2</i>	for: 5'- AATTCCTGCATCTCATGCCA-3' rev: 5'- TCACGCGGAACACTTGATTCT-3'
<i>BAX</i>	for: 5'- GTCTTTTTCCGAGTGGCAGC-3' rev: 5'- CCAGTTGAAGTTGCCGTCAGA-3'
<i>GAPDH</i>	for: 5'-TCTGCCCCCTCTGCTGAT-3' rev: 5'-TTCTCATGGTTCACACCCATG-3'

^aThe *GAPDH* housekeeping gene was used for data normalization.

Table 2 Time-dependent changes in cell cycle distribution (%) of PC-3 cells treated with 2-DG, WP631 or 2-DG plus WP631.

Treatment	Phase	Time (days)			
		0.2	1	2	3
Untreated	SubG1	0.79	0.10	1.01	0.56
	G1	38.69	52.54	54.01	52.77
	S	23.48	17.50	18.97	21.37
	G2/M	36.57	29.72	27.33	25.98
5 mM 2-DG	SubG1	1.65	0.33	2.62	0.93
	G1	39.95	57.65	46.45	46.34
	S	24.97	14.18	19.4	18.14
	G2/M	32.73	28.1	34.32	35.19
165 nM WP631	SubG1	3.27	0.26	2.33	6.82
	G1	41.66	37.40	25.59	27.92
	S	29.55	18.42	35.16	32.87
	G2/M	25.07	44.70	34.78	30.69
5 mM 2-DG + 165 nM WP631	SubG1	1.76	0.77	2.40	3.56
	G1	44.51	42.72	35.71	37.19
	S	32.92	20.66	21.95	19.53
	G2/M	19.92	36.56	39.10	38.83

Table 3 Relative expression of genes analyzed by qRT-PCR in PC-3 prostate carcinoma cells after treatment with 2dG, WP631 or 2dG plus WP631. Housekeeping *GAPDH* gene was used for data normalization.

Gene	Accession no.	Average Normalized Δ Ct				Fold Regulation			Up/Down Regulation			<i>p</i> -value ^a		
		Control	2dG	WP631	2dG+WP631	2dG	WP631	2dG+WP631	2dG	WP631	2dG+WP631	2dG	WP631	2dG+WP631
<i>Sp1</i>	NM_138473	-2.8	-1.9	-5.3	-6.0	1.8	0.2	0.1	1.8	-6.0	-9.8	6.3E-04	1.1E-04	8.2E-05
<i>c-Myc</i>	NM_002467	-3.3	-2.5	-6.0	-7.0	1.8	0.2	0.1	1.8	-6.8	-13.5	2.0E-03	9.3E-05	6.6E-05
<i>Beclin1</i>	NM_003766.3	-2.0	-1.4	-1.7	-1.8	1.5	1.2	1.1	1.5	1.2	1.1	1.4E-02	1.8E-01	5.4E-01
<i>ATG3</i>	NM_022488.3	-0.2	-0.3	-4.1	-3.3	1.0	0.1	0.1	1.0	-14.7	-8.4	7.2E-01	5.5E-03	6.9E-03
<i>BCL2</i>	NM_000633.2	-7.4	-6.3	-7.3	-8.6	2.1	1.2	0.5	2.1	1.1	-2.2	7.2E-04	7.0E-01	5.0E-03
<i>LC3</i>	NM_032514.3	-5.6	-5.6	-3.9	-5.3	1.0	3.8	1.3	1.0	3.8	1.3	9.0E-01	1.8E-02	3.9E-02
<i>ATG4B</i>	NM_013325.4	-1.8	-1.3	-3.4	-3.8	1.4	0.3	0.3	1.4	-3.1	-4.0	2.5E-03	4.0E-06	3.0E-06
<i>BAX</i>	NM_004324.3	-1.1	-0.3	-2.0	-2.5	1.7	0.5	0.4	1.7	-1.9	-2.7	1.4E-03	3.4E-04	8.5E-05
<i>CASP3</i>	NM_004346.3	-2.4	-2.3	-4.4	-5.9	1.1	0.3	0.1	1.1	-3.7	-10.9	2.2E-02	1.0E-06	1.0E-06
<i>NFkB1</i>	NM_001165412.1	-1.7	-2.0	-4.3	-4.8	0.8	0.2	0.1	-1.2	-5.9	-8.3	2.9E-02	5.7E-05	4.6E-05
<i>GAPDH</i>	NM_002046	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00

^aUnpaired Student's t-test (control vs. treated cells)

Table 4 Quantification of cell death in PC-3 cells treated with 2-DG, WP631 or 2-DG plus WP631 for different periods of time Percentages were quantified by double staining with Annexin-V-Fluos and propidium iodide.

Treatment	Cell death type	Time (days)			
		0.2	1	2	3
Untreated	Viable	90.72	95.15	94.50	91.31
	Apoptosis	3.82	4	1.93	4.36
	Necrosis	0.22	0.01	0.9	2.26
	Secondary apoptosis/necrosis	5.24	0.85	2.60	2.07
5 mM 2-DG	Viable	90.16	88.83	86.17	84.90
	Apoptosis	3.69	8.31	6.63	9.09
	Necrosis	0.38	0.01	0.97	0.77
	Secondary apoptosis/necrosis	5.77	2.85	6.23	5.24
165 nM WP631	Viable	89.95	83.25	80.54	60.15
	Apoptosis	4.09	8.69	8.16	15.69
	Necrosis	0.05	2.21	4.96	12.84
	Secondary apoptosis/necrosis	5.91	5.85	6.34	11.32
5 mM 2-DG + 165 nM WP631	Viable	88.86	86.07	75.38	64.49
	Apoptosis	4.75	8.93	13.23	17.90
	Necrosis	0.25	0.18	4.06	7.49
	Secondary apoptosis/necrosis	6.15	4.82	7.33	10.1

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Effects of 2-DG and WP631 on PC-3 human prostate carcinoma cells. (A) Proliferation of PC-3 cells exposed to a range of concentrations of WP631 for 72h (■) or 96 h (●). Data are mean \pm SEM from six independent experiments. (B) Accumulation of acridine orange (columns) and cell viability (lines) in PC-3 cells treated with 5 or 15 mM 2-DG for 24, 48 and 72 h, respectively. Data are expressed as relative acridine orange fluorescence ratio (treated/control cells), and the percentage of cells excluding Trypan blue dye (mean \pm SD from three independent experiments). (C) Viability of PC-3 cells, measured by Trypan blue exclusion, after treatment with 5 mM 2-DG, 165 nM WP631, or co-treatment 5 mM 2-DG plus 165 nM WP631. Untreated control cells (■), cells treated with 2-DG (▲), WP631 (●) or 2-DG plus WP631 (◆) respectively. Data are expressed as a percentage of viable cells (mean \pm SD from three independent experiments).

Fig. 2. Western blot analyses of the time-dependent effects of 2-DG, WP631 or co-treated with 2-DG plus WP631 on p62/SQSTM1, LC3-I and LC3-II levels in PC-3 cells. (A) Immunoblots of total protein extracted from untreated cells, and from cells treated with 5mM 2-DG, 165 nM WP631 or co-treated with 5mM 2-DG plus 165 nM WP631 for 5 h and 24h, in which tubulin blot represents a protein loading control. The LC3-II/tubulin ratio was calculated to compare the normalized amount of LC3-II among samples as indicator of autophagy. Protein p62/SQsSTM1 degradation was also examined to detect autophagic flux. This figure shows a representative experiment of experiments performed in duplicate with similar results. (B) Immunoblots of total protein extracted from untreated cells, and from cells treated with 5mM 2-DG, 165 nM WP631 or co-treated with 2-DG plus WP631 in the presence of 100 nM bafilomycin A1 (Baf A1), which blocks the fusion between autophagosomes and lysosomes, for 5 h and 24h. Other details as in panel A.

Fig. 3. Cell cycle distribution of PC-3 cells treated with 2-DG, WP631, or co-treated with 2-DG plus WP631. (A) Flow cytometry analysis of the time-dependent changes in cell cycle distribution of PC-3 cells treated with 5 mM 2-DG, 165 nM WP631, or 5 mM 2-DG plus 165 nM WP631. Both adherent (attached) and detached (floating) cell populations were analyzed and their distribution in the different phases of the cell cycle quantified (see Table 2). The figure shows a representative experiment of experiments performed in duplicate with similar results. (B) Time-course analysis of DNA synthesis in PC-3 cells treated with 165 nM WP631 or 5 mM 2-

1
2
3 DG plus 165 nM WP631. DNA synthesis (BrdU incorporation) was measured by flow cytometry
4 after 48-h or 72-h treatments. (C) Quantification of the mitotic index by bivariate staining with PI
5 and an antibody against the specific mitotic marker H3pS10.
6
7
8

9
10 **Fig. 4.** Relative gene expression in PC-3 cells. Changes in gene expression after treatments with
11 5 mM 2-DG, 165 nM WP631, or co-treatment with 5 mM 2-DG plus 165 nM WP631 for 24 h
12 were quantified by qRT-PCR, compared to gene expression in untreated cells. Data are mean
13 \pm SD from three independent experiments. For all the genes analyzed by qRT-PCR, statistical
14 analyses were performed to evaluate the differences in gene expression. Multiple group
15 comparisons of expression of every gene across different treatments were assessed by ANOVA
16 with Tukey's post-hoc test for two-sample comparisons between treatments (**p < 0.01; *p <
17 0.05). An unpaired Student's t-test that compares changes in gene expression between treated and
18 untreated cells for every treatment is documented in Table 3.
19
20
21
22
23
24
25

26 **Fig. 5.** Analysis of cell death in PC-3 human prostate carcinoma cells treated with 2-DG, WP631
27 or co-treated with 2-DG plus WP631. (A) Time-course bivariate flow cytometric analysis.
28 Adherent (attached) and detached (floating) cell populations were pooled together and stained
29 with Annexin-V-Fluos and PI. A quantification of these plots is summarized in Table 4. (B)
30 Simultaneous assessment by flow cytometry of apoptotic cells (Annexin-V-Fluos staining) and
31 caspase-3 activation (cleavage of the fluorescent substrate PhiPhilux G1D2) in cells treated
32 continuously for three days. (C) Western blot analysis of the presence of cleaved PARP protein,
33 and of changes in Beclin 1 protein levels in PC-3 cells treated for three days. This panel shows a
34 representative experiment of experiments performed in duplicate with similar results.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

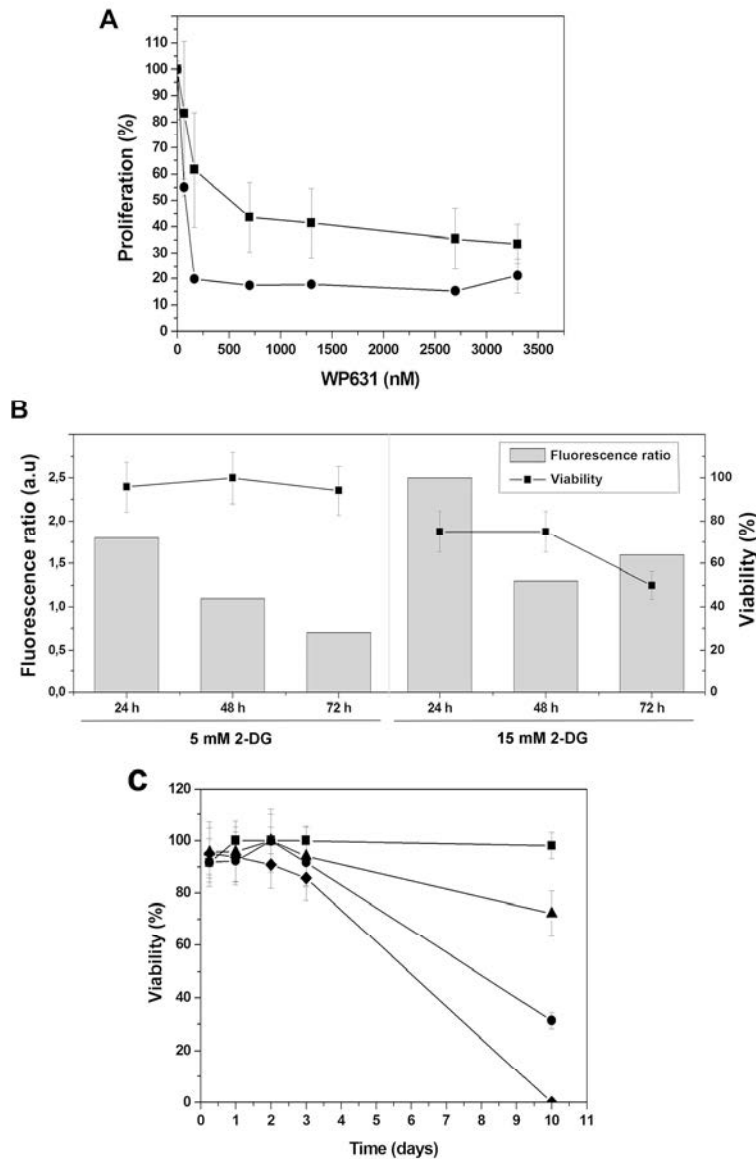


Figure 1

Effects of 2-DG and WP631 on PC-3 human prostate carcinoma cells. (A) Proliferation of PC-3 cells exposed to a range of concentrations of WP631 for 72h (●) or 96 h (■). Data are mean \pm SEM from six independent experiments. (B) Accumulation of acridine orange (columns) and cell viability (lines) in PC-3 cells treated with 5 or 15 mM 2-DG for 24, 48 and 72 h, respectively. Data are expressed as relative acridine orange fluorescence ratio (treated/control cells), and the percentage of cells excluding Trypan blue dye (mean \pm SD from three independent experiments). (C) Viability of PC-3 cells, measured by Trypan blue exclusion, after treatment with 5 mM 2-DG, 165 nM WP631, or co-treatment 5 mM 2-DG plus 165 nM WP631. Untreated control cells (v), cells treated with 2-DG (○), WP631 (□) or 2-DG plus WP631 (△) respectively. Data are expressed as a percentage of viable cells (mean \pm SD from three independent experiments).

187x292mm (300 x 300 DPI)

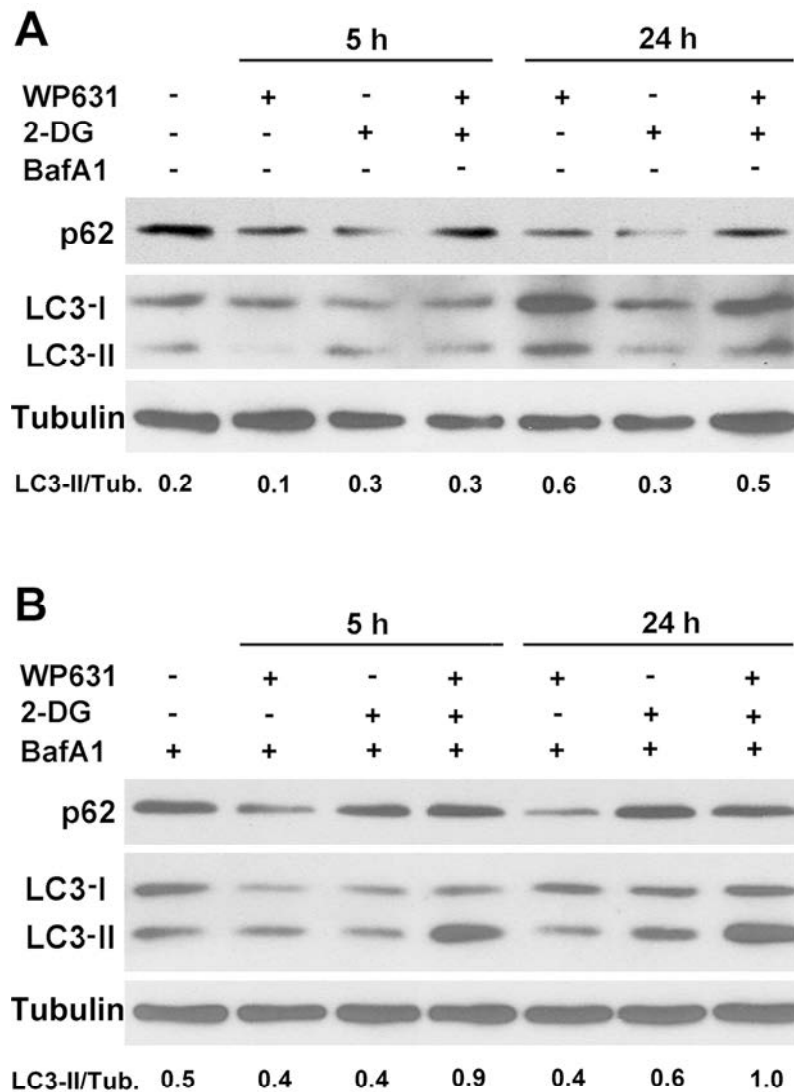


Figure 2

Western blot analyses of the time-dependent effects of 2-DG, WP631 or co-treated with 2-DG plus WP631 on p62/SQSTM1, LC3-I and LC3-II levels in PC-3 cells. (A) Immunoblots of total protein extracted from untreated cells, and from cells treated with 5mM 2-DG, 165 nM WP631 or co-treated with 5mM 2-DG plus 165 nM WP631 for 5 h and 24h, in which tubulin blot represents a protein loading control. The LC3-II/tubulin ratio was calculated to compare the normalized amount of LC3-II among samples as indicator of autophagy.

Protein p62/SQsSTM1 degradation was also examined to detect autophagic flux. This figure shows a representative experiment of experiments performed in duplicate with similar results. (B) Immunoblots of total protein extracted from untreated cells, and from cells treated with 5mM 2-DG, 165 nM WP631 or co-treated with 2-DG plus WP631 in the presence of 100 nM bafilomycin A1 (Baf A1), which blocks the fusion between autophagosomes and lysosomes, for 5 h and 24h. Other details as in panel A.

118x176mm (300 x 300 DPI)

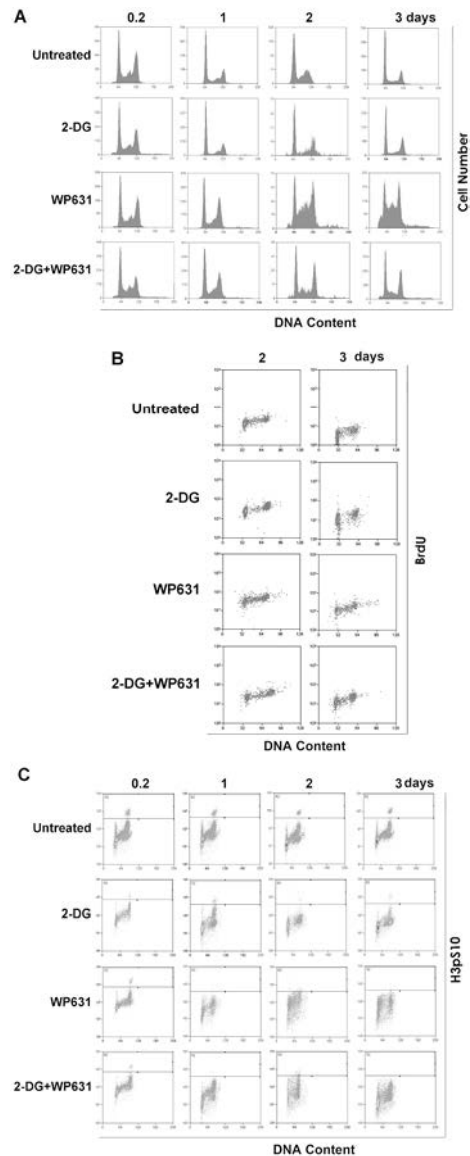


Figure 3

Cell cycle distribution of PC-3 cells treated with 2-DG, WP631, or co-treated with 2-DG plus WP631. (A) Flow cytometry analysis of the time-dependent changes in cell cycle distribution of PC-3 cells treated with 5 mM 2-DG, 165 nM WP631, or 5 mM 2-DG plus 165 nM WP631. Both adherent (attached) and detached (floating) cell populations were analyzed and their distribution in the different phases of the cell cycle quantified (see Table 2). The figure shows a representative experiment of experiments performed in duplicate with similar results. (B) Time-course analysis of DNA synthesis in PC-3 cells treated with 165 nM WP631 or 5 mM 2-DG plus 165 nM WP631. DNA synthesis (BrdU incorporation) was measured by flow cytometry after 48-h or 72-h treatments. (C) Quantification of the mitotic index by bivariate staining with PI and an antibody against the specific mitotic marker H3pS10.

232x609mm (300 x 300 DPI)

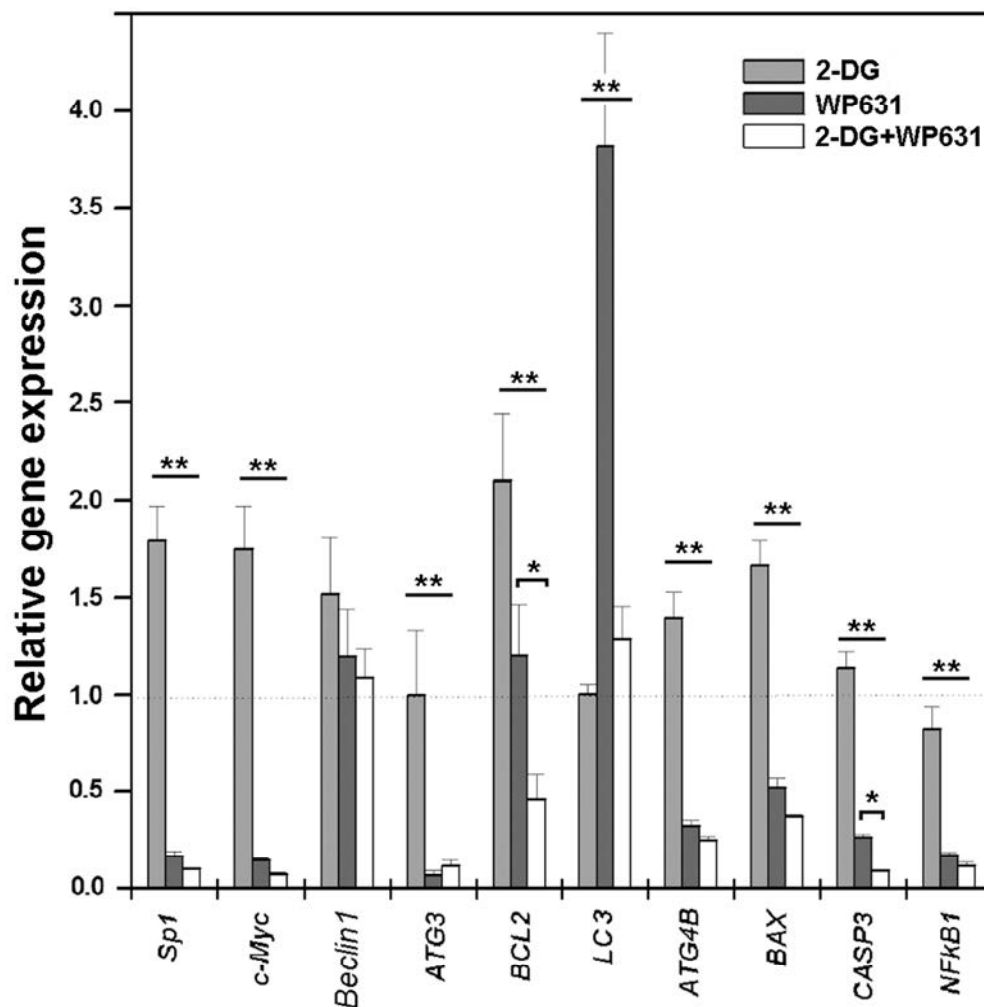


Figure 4

Relative gene expression in PC-3 cells. Changes in gene expression after treatments with 5 mM 2-DG, 165 nM WP631, or co-treatment with 5 mM 2-DG plus 165 nM WP631 for 24 h were quantified by qRT-PCR, compared to gene expression in untreated cells. Data are mean \pm SD from three independent experiments. For all the genes analyzed by qRT-PCR, statistical analyses were performed to evaluate the differences in gene expression. Multiple group comparisons of expression of every gene across different treatments were assessed by ANOVA with Tukey's post-hoc test for two-sample comparisons between treatments (**p < 0.01; *p < 0.05). An unpaired Student's t-test that compares changes in gene expression between treated and untreated cells for every treatment is documented in Table 3.

85x91mm (300 x 300 DPI)

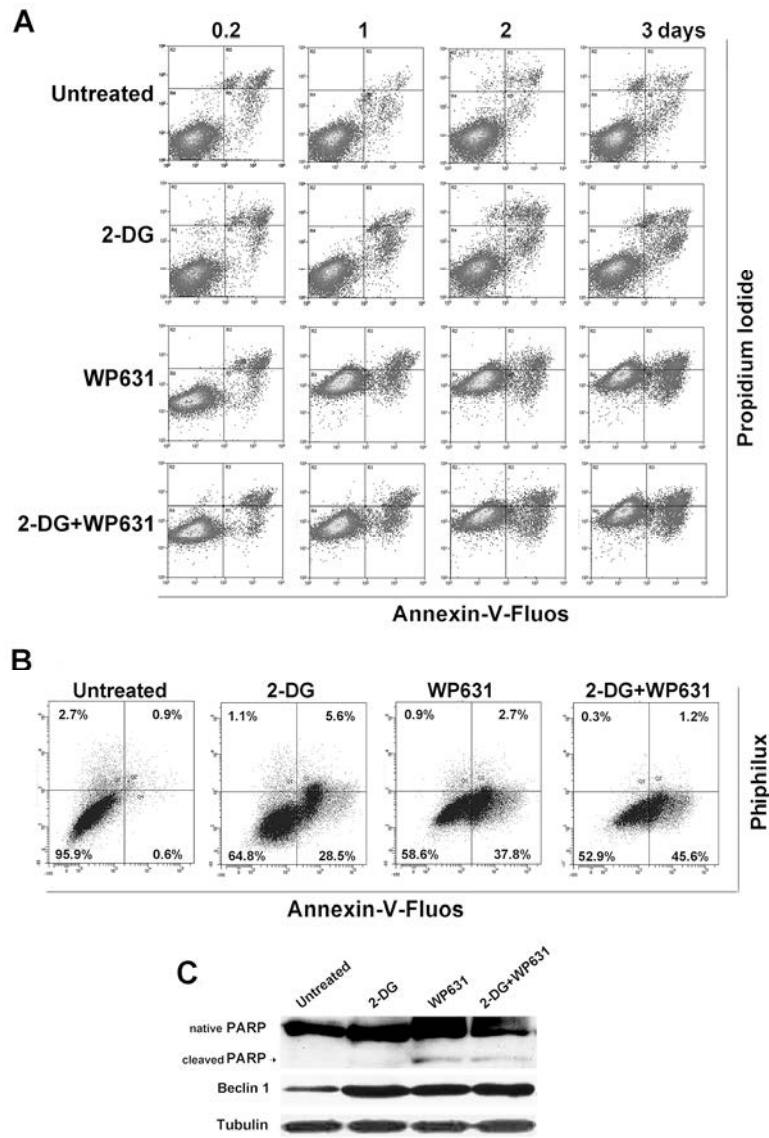


Figure 5

Analysis of cell death in PC-3 human prostate carcinoma cells treated with 2-DG, WP631 or co-treated with 2-DG plus WP631. (A) Time-course bivariate flow cytometric analysis. Adherent (attached) and detached (floating) cell populations were pooled together and stained with Annexin-V-Fluos and PI. A quantification of these plots is summarized in Table 4. (B) Simultaneous assessment by flow cytometry of apoptotic cells (Annexin-V-Fluos staining) and caspase-3 activation (cleavage of the fluorescent substrate PhiPhilux G1D2) in cells treated continuously for three days. (C) Western blot analysis of the presence of cleaved PARP protein, and of changes in Beclin 1 protein levels in PC-3 cells treated for three days. This panel shows a representative experiment of experiments performed in duplicate with similar results.

187x292mm (300 x 300 DPI)