



UNIVERSITAT DE BARCELONA

**CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN
DE UN PRINCIPIO ACTIVO DE ORIGEN BACTERIANO
CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

Memoria presentada por
Beatriz Montaner Ramoneda
para optar al grado de
Doctora en Farmacia



Dr. Ricardo Pérez-Tomás
Divisió de Ciències de la Salut
Campus de Bellvitge
Departament de Biologia Cel·lular
i Anatomia Patològica

Pavelló Central
C./Feixa Llarga s/n
08907 L'Hospitalet de Llobregat
Phone: (34) (93) 402 4288
Fax: (34) (93) 402 4213

RICARDO PÉREZ TOMÁS

Profesor titular del Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica de la Universidad de Barcelona

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral "Caracterización y purificación de un principio activo de origen bacteriano con actividad antitumoral" que ha dirigido y de la que es autora BEATRIZ MONTANER RAMONEDA está en condiciones de ser presentada y defendida ante el Tribunal correspondiente.

Lo que hace constar a los efectos oportunos a 19 de diciembre de 2000

Dr. Ricardo Pérez Tomás



Dr. Ricardo Pérez-Tomás
Divisió de Ciències de la Salut
Campus de Bellvitge
Departament de Biologia Cel·lular
i Anatomia Patològica

Pavelló Central
C./Feixa Llarga s/n
08907 L'Hospitalet de Llobregat
Phone: (34) (93) 402 4288
Fax: (34) (93) 402 4213

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Ricardo Pérez Tomás en la Unidad de Proliferación y Diferenciación Celular del Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica (Campus de Bellvitge) de la Universidad de Barcelona

Barcelona, diciembre de 2000

A mi familia y muy especialmente

a Elena Suárez Díaz y

a José M^a Montaner Puig

El hacer esta Tesis me ha dado la oportunidad de descubrir un mundo lleno de sensaciones intraducibles. También me ha permitido conocer a mucha gente y a hacer todo tipo de amigos, así que ¿qué más se puede pedir?.

Vaya por delante que sois muchos los que me habéis ayudado de alguna forma u otra durante estos años y que este trabajo no hubiese podido hacerse sin vosotros, por lo que aprovecho este espacio para mostraros mi agradecimiento. De forma especial quiero dar las gracias a todos los a continuación citados ¡con el ánimo de no dejarme a nadie!

Al Dr. Ricardo Pérez, por dejarme formar parte de tu grupo, por darme la oportunidad de hacer esta Tesis, por ser el mejor jefe del mundo: entusiasta, que contagia pasiones, serio en el trabajo, luchador y con el que siempre se puede contar, por tu apoyo constante, por tu paciencia... y por las tertulias anti-estrés, los consejos literarios, etc.

A Ricard Canadell, por acordarte de mí hace unos años e introducirme en este mundillo. Lamento enormemente el que no hayamos podido trabajar juntos, aunque todavía no hemos tirado la toalla...

A Carmen Díaz, gracias por todo. De ti he aprendido mucho y lo mejor es que aún me queda mucho más por aprender. Te debo el que me contagiara la pasión por este trabajo, el orden, etc. A Mónica Asbert, por tus lecciones de paciencia, tu tolerancia frente a mi desorden, y por haberme enseñado junto con Carmen todo lo que sé del laboratorio... ¡lástima que en las clases de 'como ser ordenado' hiciese campana!

A Sira. De una forma muy especial quiero darte las gracias no sólo por tu importantísima e indispensable contribución a este trabajo sino también por tu vitalidad, simpatía y alegría contagiosa que todos los que te conocemos y hemos tenido la suerte de trabajar contigo sin duda echamos de menos.

A Marta Benet, por tu simpatía, ayuda, apoyo, interés y amistad, a M^a Antonia, por tu simpatía, alegría ¡y tu paciencia! y a Rupert, por el ejemplo que nos diste con tu buena disposición y por tu amistad; el poco tiempo que he podido trabajar con vosotros ha sido muy especial.

A todo el Departamento de Biología Celular y Anat. Pat. y especialmente al Dr. Jordi Domingo, pels teus consells no sempre seguits però sí escoltats, a Carlota, Eva, Ana Cascante, Ana Rubert (¡Doctora en breve!), Nuria, e Yvonne, por haberme apoyado y sufrir mis nervios sin quejaros. A Marta García, por tu amistad. A los que estáis en el Cínico: Eulalia, Xus, Rosa, Neus, Oriol, Carles, Nuria, Josep Maria, etc., por vuestra ayuda en las primeras clases y en general porque siempre nos dais un golpe de mano cuando nos hace falta y a los nuevos Raquel y Manolo por esa buena conexión que va muy bien en los momentos bajos. A los de la cuarta planta: al Dr. Carles Solsona, por tu interés, al Dr. Jordi Aleu, por tu buen humor y por tus consejos informáticos, a Esteban, Judith, Rosa, Berta, Gemma P., Ashraf y Alex por vuestra simpatía y buena predisposición.

Agradecimientos

A todos los que en otro tiempo fuisteis vecinos allá por la segunda planta: a Pep y Bam, Xesc y Carles, Fernando, Ester y Francis, por los numerosos buenos momentos y por todo lo que me enseñasteis, y a Joan, Elena, Inma, Eulalia, Judith y Gloria, por todas las veces que me habeis ayudado.

Al Dr. Miguel Viñas, por habernos introducido en el mundo de *Serratia marcescens*, por su inestimable ayuda desinteresada y por la paciencia mostrada ante las numerosas 'invasiones' que ha tenido que sufrir por ser vecino de laboratorio; gracias por todo esto y por supuesto ¡por el 'Bar del 5º'!

A Merche, Pilar, Neus, Natalia, Marc, Dani y Pili B, por vuestra ayuda y por tantos buenos ratos, y a Noe, Blanca y a todos los nuevos por el poco tiempo que hemos compartido y el que nos queda.

Al Dr. Barastegui, por preocuparse y cuidarme tan bien durante este tiempo.

A Toni y a Sol, por vuestro apoyo.

A los clásicos de la cuarta, con los que siempre he podido contar ya desde la segunda planta, entre ellos a la Dra. Ana Manzano, por tu simpatía, entusiasmo y tu ayuda durante todos estos años, al Dr. Xavi Pérez, por tu sentido del humor y acordarte de nosotros, a la Dra. Ester Castaño, imagino que todo un nervio aunque a mí me has transmitido tranquilidad, a Ester Adanero, porque siempre has estado cuando te hemos necesitado, por tu confianza y por tu alegría.

Al Dr. Ramón Bartrons, por ser como un padre para los suyos y para los que no lo somos tanto, al Dr. Jordi Bermúdez, con quien he compartido algún que otro metro, al Dr. Santi Ambrosio, siempre disponible, a los Dres. Francesc Ventura y José Luís Rosa, por todas las veces que les he pedido y me han dado consejo, a la Dra. Teresa Roig, una persona muy especial, a la Dra. Julia Reiriz, siempre pendiente de los demás, a Blanca C, por tener ideas tan buenas como la del yoga y a Ana S., Eli, Cris, Tere, Puri, Raquel, Francesc, Mónica E., Jordi, Áurea, María y Jose Carlos, por hacer que el ambiente de la cuarta sea tan especial, por vuestra ayuda y vuestro apoyo.

Al Dr. Joan Gil, por toda la ayuda que nos ha dado, ideas, propuestas, consejos científicos y el material que hemos ido necesitando y al Dr. Gabriel Pons y a todo su grupo por estar siempre disponibles, entre ellos Clara, Dani y Jose Manuel, por tu paciencia y consejos.

A Montse, porque siempre tienes una sonrisa y una mano que ofrecer y porque junto con la Dra. María Piqué me habeis introducido en el mundo de la apoptosis, me habeis resuelto las dudas que van apareciendo, etc. Gracias por ser tan especiales.

A Eduardo, por tus consejos, tu interés y por saber escuchar. Dentro de un par de añitos espero estar a la altura y poderte devolver todo el apoyo que me has dado cuando más se necesita.

A Lluís Riera, Mireia Dalmau, Marc Martinell y Marta Vilaseca, pues vuestra colaboración ha sido, además de un placer, fundamental para esta Tesis.

Al Dr. E Giralt, por su buena disposición y por su colaboración en este trabajo y en otros relacionados con nuestro grupo que han servido también a la hora de hacer la discusión.

A Jesús Ureña, por enseñarme a utilizar el correo electrónico, contagiarme tu entusiasmo por el lab (sobre todo durante el sabático de mi jefe) y por presentarme a las MAPKs y compañía.

A los que habéis estado cerca, Fabián, Jose M Vidal, Víctor Nacher, Jordi Morral, Ana Cascante y muchos otros, por vuestro interés, consejos y ejemplo.

A la Marató de TV3, que por dos veces ha confiado en mi grupo.

A Jordi Capella, por la ayuda inestimable que nos has prestado durante todos estos años, por los 'milagros' que de vez en cuando nos has hecho y también por las cualidades que compartes con gente tan especial como Víctor Bacardí, por vuestra simpatía, los buenos ratos y ante todo por vuestra paciencia. ¡Viva la *troupe* de 'Les enfants terribles'!

Al Sr. Isidro, colega de cortometrajes, por su buen humor y por lo bien que me cuida.

A Eugenio, José, Juan, Manuel y Raúl, por lo bien que me habéis tratado, por vuestra simpatía y por vuestro interés.

A todo el equipo de la Farmacia Vilar quiero agradecerlos tantos fines de semana y fiestas de guardar de buena compañía. Susana, gracias por entenderme y tolerarme esos horarios tan 'originales' para otros. En tu compañía y en la de Dunia, Carol, M^a José, Ana, Carme, Pati, M^a Carmen, Loli (cuidándonos siempre), Raquel, Rosa y Pepe (las mujeres primero), pasé tres cortísimos pero fantásticos años durante los que tuve cuatro casas: el lab, la farmacia, el metro y la de mis padres. Os aseguro que me costó mucho dejaros y que aunque va pasando el tiempo no me olvido de vosotros.

A los fantásticos de Farmacia: Ana, Carme, Judith, Marta, Pilar, Pili, Sofía, David y por supuesto Ángel, Enric, Enrique y Xavi, por esas fabulosas cenas anti-estrés, por vuestro apoyo y por entenderme.

A toda la gente de Logikard: Andrea, Gemma, M^a Carmen, Mari, Miriam, Fernando, Nacho, al Sr. Espinalt y a Rosend, por la excelente acogida que me habéis dado y por vuestra colaboración desinteresada en este trabajo.

Al Sr. Turbau y a todo su equipo y al Sr. Gené por su ayuda y por el buen trato que me han dado.

Agradecimientos

A la peña de Torredembarra-BCN (o BCN-Torredembarra), os agradezco que cuidarais tan bien de Javi durante los fines de semana... Lamento comunicaros que el próximo verano habrá un nuevo ganador en las partidas de pocha, y es que *Petarda* ataca de nuevo...

A Gloria y a Javier por vuestro apoyo e interés y a mis cuñaditas y cuñaditos. ¡Gracias por cuidarme tan bien!.

A mis padres. Os agradezco entre otras cosas el que seáis como sois, la confianza que siempre habéis tenido en mí y vuestro apoyo incondicional. A Helena, Marc, Andrea y Alex, mis hermanos favoritos, tengo que agradeceros el que hayáis aguantado estoicamente mis ataques de mal genio de los últimos años (bueno, creo que los he tenido siempre) y el que me hayáis librado de algún que otro trabajo casero, aunque tampoco han sido tantos ¿eh?.

A Javi, porque siempre me has entendido, apoyado y ayudado y por creer en mí.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Índice | i |
| Abreviaturas | ix |
| Presentación | 1 |
| Introducción | 5 |
| 1. El equilibrio entre la vida y la muerte | 7 |
| 1.1. La muerte celular | 7 |
| 1.2. La necrosis | 8 |
| 1.2.1. Características morfológicas de la necrosis | 8 |
| 1.3. La apoptosis | 9 |
| 1.3.1. Características morfológicas de la apoptosis | 9 |
| 1.3.2. Características bioquímicas de la apoptosis | 10 |
| 1.3.3. Etapas de la apoptosis | 11 |
| 1.3.4. La maquinaria de la apoptosis | 12 |
| 1.3.4.1. Los receptores de muerte | 12 |
| 1.3.4.2. El citocromo C | 14 |
| 1.3.4.3. La familia de Bcl2 | 16 |
| 1.3.4.4. Las caspasas | 19 |
| 1.3.4.5. La proteólisis de la PARP como indicador de la muerte celular por apoptosis | 21 |
| 1.3.4.6. La actina | 22 |
| 1.3.4.7. Las MAPKs | 23 |
| 1.3.4.8. c-Jun, c-Fos y el complejo AP1 | 24 |
| 1.3.4.9. La proteína-quinasa C (PKC) | 25 |
| 1.3.4.10. El factor de transcripción NFκB | 27 |
| 1.3.4.11. La p53 | 27 |
| 1.3.5. Modelo de integración de la apoptosis | 28 |
| 1.3.6. Apoptosis y enfermedad | 30 |
| 1.3.7. La apoptosis y la terapia anticancerosa | 30 |
| 1.3.7.8. La toxina de Coley | 32 |
| 2. <i>Serratia marcescens</i> | 34 |

| | |
|--|----|
| 2.1. Características de la familia las <i>Enterobacteriaceae</i> | 34 |
| 2.2. Historia de <i>Serratia marcescens</i> | 34 |
| 2.3. El pigmento prodigiosina | 35 |
| 2.3.1. Estructura de la prodigiosina | 36 |
| 2.3.2. Síntesis de la prodigiosina | 36 |
| 2.3.3. Condiciones de crecimiento de <i>Serratia marcescens</i> para favorecer la producción de la prodigiosina | 38 |
| 2.3.3.1. El medio de cultivo | 38 |
| 2.3.3.2. El entorno | 39 |
| 2.3.4. Localización intracelular de la prodigiosina en <i>Serratia marcescens</i> | 40 |
| 2.3.5. Función de la prodigiosina en <i>Serratia marcescens</i> | 40 |
| 2.4. La membrana externa de las bacterias gram-negativas | 40 |
| 2.4.1. El lipopolisacárido (LPS) | 41 |
| 2.5. Otros productos extracelulares de <i>Serratia marcescens</i> | 42 |
| 2.6. El prodigiosano | 42 |
| 2.7. La cápsula de <i>Serratia marcescens</i> | 43 |
| | |
| 3. El cáncer | 44 |
| 3.1. La terapia actual contra el cáncer | 46 |
| 3.1.1. La cirugía | 46 |
| 3.1.2. La radioterapia | 46 |
| 3.1.3. La terapia antihormonal | 47 |
| 3.1.4. La quimioterapia | 47 |
| 3.1.5. La terapia fotodinámica del cáncer | 50 |
| 3.2. Etapas para el desarrollo de un fármaco | 51 |
| | |
| Objetivos | 53 |
| | |
| Resultados | 57 |
| 1. Antecedentes | 59 |
| | |
| 2. Estudios previos | 60 |
| 2.1. Primeras evidencias | 60 |

| | |
|---|----|
| 2.2. Ensayos realizados con el sobrenadante de varias cepas | |
| de <i>Serratia marcescens</i> | 61 |
| 2.2.1. Obtención de las muestras | 61 |
| 2.2.2. Estudios de la viabilidad y de la fragmentación del ADN en la línea celular Jurkat al ser tratada con las muestras procedentes de <i>Serratia marcescens</i> 2170 y ATCC 274 | 61 |
| 2.2.3. Estudio del patrón proteico del extracto de <i>Serratia marcescens</i> 2170 y ATCC 274 | 63 |
| 2.2.4. Estudio comparativo del efecto de la muestra CS-2170 en las líneas celulares Jurkat y NRK | 66 |
| 3. Caracterización del principio activo con actividad apoptótica | 66 |
| 3.1. Separación en columna por Gel-filtración de una muestra CS-2170 | 69 |
| 3.2. Tratamientos para desnaturalizar e hidrolizar las muestras con naturaleza peptídica | 72 |
| 3.3. Implicación del LPS bacteriano en la apoptosis | 73 |
| 3.4. Fracciones pigmentadas de rojo | 73 |
| 3.5. Nueva hipótesis: el pigmento de <i>Serratia marcescens</i> , molécula inductora de la apoptosis | 73 |
| 3.6. Estudios realizados con los extractos procedentes del cultivo de cepas de <i>Serratia marcescens</i> mutantes en la síntesis de la prodigiosina | 74 |
| 3.7. Obtención de las muestras SV | 75 |
| 3.8. Correlación de los resultados obtenidos con CS-2170 y SV-2170 | 76 |
| 3.9. Purificación y caracterización del pigmento prodigiosina | 77 |
| 3.9.1. Espectrometría de masas | 78 |
| 3.9.2. Cromatografía líquida a presión atmosférica en fase normal | 78 |
| 3.9.3. Cromatografía líquida a alta presión en fase reversa (HPLC) | 79 |
| 3.9.4. Análisis/purificación por HPLC/ESI-MS | 79 |
| 3.9.5. Análisis por RMN- H^1 | 80 |
| 4. Efecto de la prodigiosina en líneas celulares cancerosas y no cancerosas | 82 |
| 4.1. Estudios realizados en líneas cancerosas de origen hematopoyético | 82 |
| 4.2. Estudios realizados en líneas derivadas de cáncer de colon y de estómago | 84 |

| | |
|---|-----|
| 4.3. Estudios realizados en una línea de cáncer de mama | 85 |
| 4.4. Estudios realizados en una línea de cáncer de piel | 86 |
| 4.5. Estudios realizados en líneas celulares no cancerosas | 87 |
| 4.6. Estudio de la reversibilidad del efecto de la prodigiosina | 88 |
| 4.7. Ensayos realizados con la prodigiosina pura | 89 |
| 5. Estudio parcial del mecanismo de acción de la prodigiosina | 91 |
| 5.1. Mecanismo independiente de p53 | 91 |
| 5.2. Implicación de las caspasas en la apoptosis inducida por la prodigiosina | 91 |
| 5.2.1. Liberación del citocromo C | 92 |
| 5.2.2. Fragmentación de la PARP | 93 |
| 5.2.3. Efecto del inhibidor de las caspasas Z-VAD.fmk | 94 |
| 5.3. Mecanismo independiente de la acción protectora de Bcl-2 | 95 |
| 5.4. Relación de la PKC en la regulación de la apoptosis inducida por la prodigiosina | 96 |
| 5.5. Efecto de la prodigiosina sobre la expresión de c-Jun y c-Fos | 101 |
| Discusión | 103 |
| Conclusiones | 133 |
| Materiales y métodos | 137 |
| Bibliografía | 159 |
| Apéndice | 183 |
| Publicaciones: | |
| <u>Montaner B</u> Navarro S, Piqué M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E, Gil J, Pérez-Tomás R. Prodigiosin from the supernatant of <i>Serratia marcescens</i> induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. <i>Br J Pharmacol.</i> 2000; 131: 585-593. | 185 |

-
- Montaner B, Pérez-Tomás R. Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sci.* 2001; 68: 2025-2036. 195
- Díaz-Ruiz C, Montaner B, Pérez-Tomás R. Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1. *Histol Histopathol.* 2001; 16: 415-421. 207
- Montaner B, Pérez-Tomás. Activation of protein kinase C for protection of cells against apoptosis induced by the immunosuppressor prodigiosin. *Biochem Pharmacol.* 2002 (en prensa). 215
- Montaner B, Pérez-Tomás. The cytotoxic prodigiosin induces phosphorylation of p38-MAPK but not of SAPK/ JNK. *Toxicol Lett.* 2002 (en prensa). 222
- Montaner B, Pérez-Tomás. The prodigiosins: a new family of anticancer drugs. *Current Cancer Drug Targets.* 2002 (en prensa). 228
- Montaner B, Pérez-Tomás R. Prodigiosin induces caspase 9 and caspase 8 activation and cytochrome c release. *Enviado para su publicación.* 243

ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$: potencial de membrana mitocondrial

A: Anexina V-FITC

Anexina V-FITC: anexina conjugada con isotiocianato de fluoresceína

Apaf-1: *apoptosis protease-activating factor-1*

ATCC: *American Type Culture Collection*

Bad: *Bcl-X_L/ Bcl-2-associated death promoter homologue*

Bak: *Bcl-2 homologous antagonist killer*

Bax: *Bcl-2-associated X protein*

BB: *binding buffer*

Bcl-2: *B cell leukemia/lymphoma-2*

Bcl-X_S y Bcl-X_L: *Bcl-2 homologue splice variants derived from the same gene*

BH: dominios Bcl-2 de homología

BrEt: bromuro de etidio

CARD: dominios de reclutamiento de caspasas (*caspase recruitment domain*)

Caspasa: *cysteine-aspartate-protease*

CDK: ciclina dependiente de quinasas

cit C: citocromo C

cPrG-HCl: cicloprodigiosina hidrócloride

CS: muestra concentrada (*concentrated sample*)

DAG: diacilglicerol

DD: dominio de muerte (*death domain*)

DED: dominio efector de muerte (*death effector domain*)

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxiribonucleico

ERK: *extracellular-signal-regulated kinase*

ESI-MS: *electrospray mass spectrometry*

FAK: *focal adhesion kinase*

Fas-L: ligando de Fas

FCS: suero de ternero fetal (*fetal calf serum*)

HBC: 4-hidroxi-2,2'-bipirrol-5-carboxaldehído

HPLC: *high pressure liquid chromatography*

IC₅₀: concentración de fármaco que reduce la viabilidad celular al 50%

ICE: *interleukin-1 β -converting enzyme*

I κ B: *inhibitor of κ B*

Abreviaturas

IMS: *mitochondrial intermembrane space*

IP: yoduro de propidio

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

kDa: kiloDalton

l: litro

LPS: lipopolisacárido

µg: microgramos

MADD: *mitogen-activated kinase activating death domain protein*

MAP: 2-metil-3-n-amilpirrol

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

MBC: 4-metoxi-2,2'-bipirrol-5-carboxaldehído

MTT: metil-tiazol-tetrazolio

m/z: relación entre masa y carga

NFκB: *nuclear factor-κB*

nM: nanoMolar

PAK-2: *p21-activated kinase 2*

PARP: Poli(ADP-ribosil) polimerasa

PBS: *phosphate buffer saline*

PD: PD98059

PDT: terapia fotodinámica del cáncer

PG: peptona-glicerol

PKC: proteína quinasa C

PMSF: *phenylmethylsulfonyl fluoride*

Poros PT: poros de permeabilidad transitoria (*permeability-transition pore*)

PrG: prodigiosina 25-C

Prod: prodigiosina

PS: fosfatidilserina

RE: retículo endoplasmático

Rf: factor de retención

RIP: *receptor-interacting protein*

RMN-H⁺: resonancia magnética nuclear de protón

RNA: ácido ribonucleico

SDS: dodecil sulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*

SV: *speed-vacuum*

TBE: tampón Tris-Borato-EDTA

TLC: cromatografía en capa fina

TNF: *tumor necrosis factor*

TNFR: *TNF receptor*

TPA: 12-O-tetradecanoil forbol 13-acetato

TRAF2: *tumour necrosis factor-receptor-associated factor*

UP: Undecilprodigiosina

UV: Ultravioleta

Z-VAD.fmk: benciloxicarbonil-valina-alanina-aspartato-fluorometilcetona

PRESENTACIÓN

Cuando se produce una lesión en la célula lo suficientemente grande o grave, el resultado que se obtiene son una serie de cambios irreparables en su estructura y función que la conducirán a la muerte. La muerte celular tiene una importancia primordial en muchos procesos tan esenciales como son la regulación del crecimiento de los tejidos normales, así como en algunos procesos patológicos. La muerte celular puede seguir principalmente dos mecanismos, necrosis o apoptosis; la necrosis es un proceso degenerativo asociado a una lesión irreversible de la célula cuyo resultado final es la lisis celular, con la consecuente inflamación del tejido adyacente; por el contrario, la apoptosis es un proceso en el que la célula participa de su propia destrucción, la cual termina con la formación de pequeños cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por macrófagos o por células vecinas sin que se produzca alteración alguna del tejido que la rodea.

El interés que tiene hoy en día la apoptosis viene dado en parte por ser un proceso fisiológico que tiene lugar normalmente durante el desarrollo y en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. La alteración de este proceso está relacionado con muchos procesos patológicos, entre ellos el cáncer. La búsqueda de nuevos agentes anticancerosos que sean capaces de modular la apoptosis constituye uno de los principales retos para muchos grupos de investigación que trabajan en el estudio de esta enfermedad.

El trabajo que aquí se presenta recoge la identificación y purificación de la prodigiosina a partir de un extracto de *Serratia marcescens* 2170, así como la descripción de su actividad como sustancia inductora de la apoptosis y de su toxicidad en líneas celulares cancerosas y no cancerosas. Para ello ha sido estudiada la viabilidad de varias líneas celulares de distinta naturaleza y origen al ser tratadas con dicho extracto de origen bacteriano y también se ha analizado el mecanismo de muerte inducido mediante la tinción de la cromatina con Hoechst 33342 y el análisis del fraccionamiento del DNA; por último, la purificación de la prodigiosina nos ha permitido revalidar los resultados obtenidos con el extracto.

INTRODUCCIÓN

1. EL EQUILIBRIO ENTRE LA VIDA Y LA MUERTE

La vida y la muerte son partes esenciales del ciclo natural de los seres vivos. En los organismos pluricelulares, las células se reproducen normalmente siguiendo el proceso de división celular conocido como mitosis; durante el crecimiento se produce un incremento en el número de células, al tiempo que en el desarrollo o morfogénesis de los tejidos determinadas células son eliminadas a través de un proceso de muerte celular programada conocida como apoptosis. Así, en un hombre adulto se forman cerca de cien mil nuevas células cada segundo, mientras un número similar desaparece por apoptosis (Vaux & Korsmeyer, 1999). A este equilibrio dinámico entre proliferación y muerte celular se le conoce como homeostasis y si se rompe se pueden producir distintos procesos patológicos, entre ellos la formación de tumores.

Resulta paradójico que la muerte celular programada sea un fenómeno necesario para el desarrollo y vida normales de los organismos. Hay tejidos que se renuevan constantemente a partir de las células madre (médula ósea, tejido epitelial, gónadas, etc.), otros siguen un proceso menos dinámico pero cuando es necesario entran rápidamente en proliferación (p.e. piel, hígado) y también los hay formados por células que una vez diferenciadas nunca volverán a dividirse (p.e. las células nerviosas). La apoptosis es un proceso que tiene lugar sobre todo en los tejidos que son mitóticamente muy activos. A lo largo de nuestra vida, alrededor del 99.9% de nuestras células seguirán esta misma suerte.

1.1. LA MUERTE CELULAR

Los dos tipos de muerte celular reconocidos son la *necrosis* y la *apoptosis*. La primera tiene un carácter patológico, pues se produce tras un daño celular extremo. Por el contrario, la apoptosis es un proceso fisiológico que ocurre de forma habitual en los eucariotas pluricelulares, tanto en el desarrollo embrionario como en la etapa adulta.

1.2. LA NECROSIS

La necrosis es un proceso de muerte celular que se produce ante un daño en la célula grave. El término necrosis deriva del griego *nekrosis*, muerte, y para algunos autores describe los cambios secundarios que se derivan de la muerte celular y no al proceso en sí, al que ellos llaman *oncosis* (Majno & Joris, 1995); dado que los estímulos que la originan son del tipo hipoxia, isquemia, infecciones virales o bacterianas y la exposición a determinados agentes corrosivos, otros especialistas prefieren llamarla muerte celular accidental.

La necrosis es un proceso pasivo, que no requiere de la participación activa de la célula y puede afectar a una zona más o menos amplia de tejido; se caracteriza principalmente por la ruptura osmótica de la célula debida a la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, que permite la entrada masiva de Ca^{2+} y consecuentemente la entrada pasiva de agua, acompañada de un flujo anormal de iones. También se distingue por la respuesta inflamatoria que se desencadena a consecuencia de esta citolisis.

1.2.1. Características morfológicas de la necrosis

En respuesta a determinados estímulos se producen una serie de cambios morfológicos característicos de la necrosis: a) la dilatación de la célula y la hinchazón de la mitocondria, b) seguidos de la vacuolización y dilatación del retículo endoplasmático (RE), el aumento de la permeabilidad y la condensación del núcleo (picnosis), c) coagulación y cariólisis; d) y finalmente, la liberación del contenido celular activa una respuesta inflamatoria que induce un fenómeno necrótico en las células vecinas (Cameron & Feuer, 2000a) (fig.1).

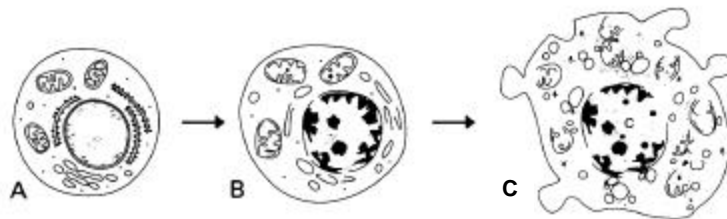


Fig.1. Etapas de la muerte celular por necrosis. A) Célula normal. B) Se produce la dilatación de la célula, la hinchazón de la mitocondria y del RE y la condensación del núcleo. D) Rotura de la membrana plasmática y lisis de la célula.

1.3. LA APOPTOSIS

El término *apoptosis* deriva del griego y significa pérdida, en el sentido de la caída de los pétalos de una flor o las hojas de un árbol. En la actualidad, apoptosis se utiliza como sinónimo de muerte celular programada (PCD, *programed cell death*), entendiéndose que la célula tiene la capacidad en cualquier momento de poner en marcha un programa suicida en respuesta a determinados estímulos. Debido a que todas las células que mueren por apoptosis están programadas "desde siempre" a morir en un momento preciso, el término PCD suele reservarse para cuando se habla de embriogénesis.

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular en el que la célula participa de forma activa en su propio proceso destructivo en beneficio del resto del organismo. Este proceso está regulado a nivel genético y forma parte del desarrollo embrionario, del mantenimiento de la homeostasis de los tejidos y del envejecimiento celular; se trata también de un mecanismo de defensa por el cual son eliminadas del organismo aquellas células infectadas, mutadas o dañadas o en respuesta a diferentes agentes externos como las radiaciones ionizantes o agentes quimioterápicos.

Una característica muy importante de la apoptosis es que la célula es eliminada sin que se origine una respuesta inflamatoria, evitando con ello que se dañe el tejido.

1.3.1. Características morfológicas de la apoptosis

El programa apoptótico se caracteriza por la sucesión de una serie de signos concretos como son: a) la pérdida de asimetría de la membrana plasmática que conlleva la pérdida de contacto con las células vecinas y la adquisición de una forma redondeada; b) la condensación y fragmentación de la cromatina nuclear sin que se pierda la envoltura nuclear; c) la disgregación del núcleo en masas pequeñas de cromatina; paralelamente se produce una disminución del volumen citoplasmático debido a la pérdida de agua y la condensación de las proteínas, aunque la mayoría de los orgánulos celulares permanecen intactos y d) la rotura de la célula en vesículas rodeadas de membrana llamadas cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por los macrófagos o por células vecinas (fig.2).

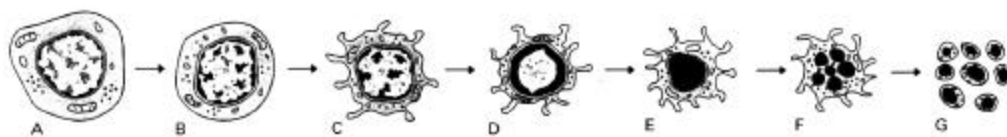


Fig.2. Fases del proceso apoptótico. A) Célula normal. B) Disminución del volumen celular. La cromatina se empieza a condensar. C) Aparecen repliegues en la membrana plasmática a consecuencia de sus deformaciones. D) La cromatina se dispone en la periferia del núcleo mientras que el volumen celular sigue disminuyendo. E) Fragmentación de la cromatina. La membrana nuclear mantiene su integridad. F) Fragmentación del núcleo. G) Fragmentación celular. Se forman los cuerpos apoptóticos compuestos por membrana plasmática que engloba material nuclear y citoplasmático.

A la vez que se van produciendo los cambios morfológicos mencionados se dan una serie de cambios histológicos como son la reorganización de los microfilamentos de actina (que altera la arquitectura de la célula) y el desenganche de la célula en cultivo de la base de la placa de cultivo.

1.3.2. Características bioquímicas de la apoptosis

Paralelamente a los cambios morfológicos se producen una serie de procesos bioquímicos, como es la activación de unas endonucleasas dependientes de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} que cortan el DNA genómico por los espacios internucleosomales, generándose fragmentos de unos 180 pares de bases o múltiplos de esta medida. Al hacer una electroforesis del DNA extraído de las células apoptóticas, estos fragmentos formarán una escalera típica.

Otros cambios bioquímicos que tienen lugar durante la apoptosis son la pérdida del potencial mitocondrial y cambios en la membrana plasmática; los residuos de fosfatidilserina, normalmente presentes en la cara interna de la membrana celular, aparecerán también en la cara externa, lo que permite el reconocimiento de estas células apoptóticas por los macrófagos y su fagocitosis (Kerr *et al.*, 1994).

1.3.3. Etapas de la apoptosis

El proceso apoptótico se desarrolla en cuatro fases. La primera fase es la capacidad de regulación a nivel genético (es decir, la existencia de ciertos genes que la regulan). La segunda es la recepción del estímulo desencadenante; según sea su naturaleza, el proceso que determine será el de prevenir o demorar la apoptosis o el de inducirla. La tercera etapa es la expresión de unos genes concretos que conlleva a determinadas alteraciones estructurales como son los cambios del citoesqueleto, el encogimiento de la célula, la picnosis nuclear, los cambios en la cromatina y la fragmentación del DNA. La cuarta y última fase es la muerte y fagocitosis de los restos de la célula apoptótica (revisado en Cameron & Feuer, 2000a). Las distintas vías de transmisión de señales que se activan durante la apoptosis se expresan en la mayoría de las células, si no en todas.

En resumen, la apoptosis es un proceso regulado a nivel genético que se produce siguiendo una serie de pasos; diferentes estímulos fisiológicos o señales de estrés pueden inducirla a través de una o más rutas de señales en función de la célula y del tipo de señal recibida y finalmente, estas vías específicas convergerán en un mismo mecanismo efector final que desintegrará a la célula (Krammer *et al.*, 1994) (fig.3).

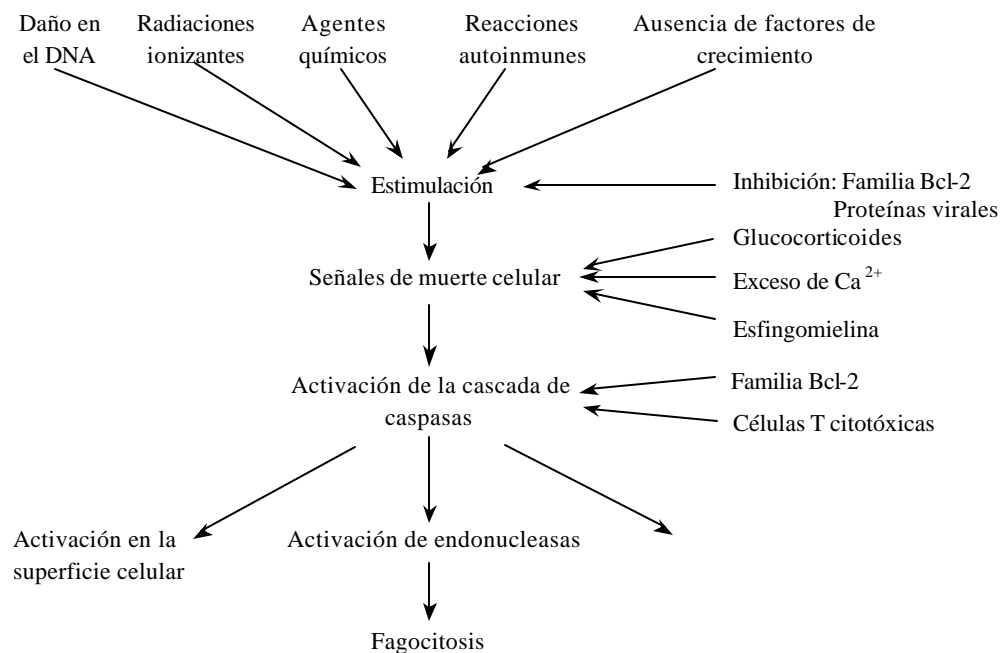


Fig. 3. Varias fases de la apoptosis. Diferentes estímulos afectan a la cascada de caspasas a través de la llegada de agentes señal.

1.3.4. La maquinaria de la apoptosis

La señal desencadenante de la apoptosis puede ser de distinta naturaleza. Muchas de estas señales son originadas por la propia célula, ya sea porque se producen alteraciones en el ciclo celular o como consecuencia de lesiones en el DNA; otras le llegan del exterior, como por ejemplo la presencia o ausencia de determinadas citoquinas, tipo TNF o factores de crecimiento. La apoptosis también puede producirse en respuesta a determinadas infecciones víricas, drogas y toxinas.

Durante el proceso apoptótico participan una gran variedad de moléculas de la superficie celular, del citosol, mitocondriales y del núcleo; no se conoce bien el papel de todas ellas en la apoptosis y otras muchas están aun por descubrirse.

1.3.4.1. Los receptores de muerte

Los receptores de muerte celular forman parte de la superfamilia del TNF-R (*tumor necrosis factor-receptor*), cuyos miembros participan en procesos como la proliferación, diferenciación, regulación de la respuesta inmunológica, expresión de genes y también en la supervivencia y muerte celular; de hecho, algunos de ellos como el TNFR-1 y Fas (CD95/APO-1) están directamente relacionados con la inducción de la apoptosis a través de unas vías de señal muy similares (Chinnaiyan *et al.*, 1996).

Los receptores de muerte tienen en común un lugar de unión al ligando en la cara externa de la membrana celular y un dominio de muerte o DD (*death domain*) en la cara citoplasmática. El ligando es una proteína de transmembrana que también existe en forma soluble; está formado por tres subunidades idénticas que al unirse al receptor le inducen su oligomerización y unión a nivel citoplasmático a una proteína adaptadora que a su vez se unirá y activará a una pro-caspasa, maquinaria efectora de la apoptosis. Sin embargo, no siempre es necesaria la unión del ligando para que se produzca la oligomerización del receptor y una respuesta apoptótica, tal es el caso de las radiaciones UV (Carswell *et al.*, 1975).

El miembro más representativo de esta familia es Fas, que desempeña un importante papel en la regulación de la respuesta inmunitaria; se caracteriza por tener tres dominios

extracelulares ricos en cisteína, una región de transmembrana y el dominio citoplasmático DD. La unión del ligando de Fas (Fas-L) al receptor provoca su asociación con la proteína adaptadora FADD (MORT-1) que a su vez se asocia por su dominio efector de muerte, DED, con la pro-caspasa8 activándola (Chinnaiyan *et al.*, 1996). Otra ruta de inducción de la apoptosis común a Fas y TNF-R1 es a través de la molécula adaptadora RAIDD, que posee un dominio de reclutamiento de caspasas CARD por el que se une y activa a la pro-caspasa 2 (Duan & Dixit, 1997; Ahmad *et al.*, 1997) (fig. 4).

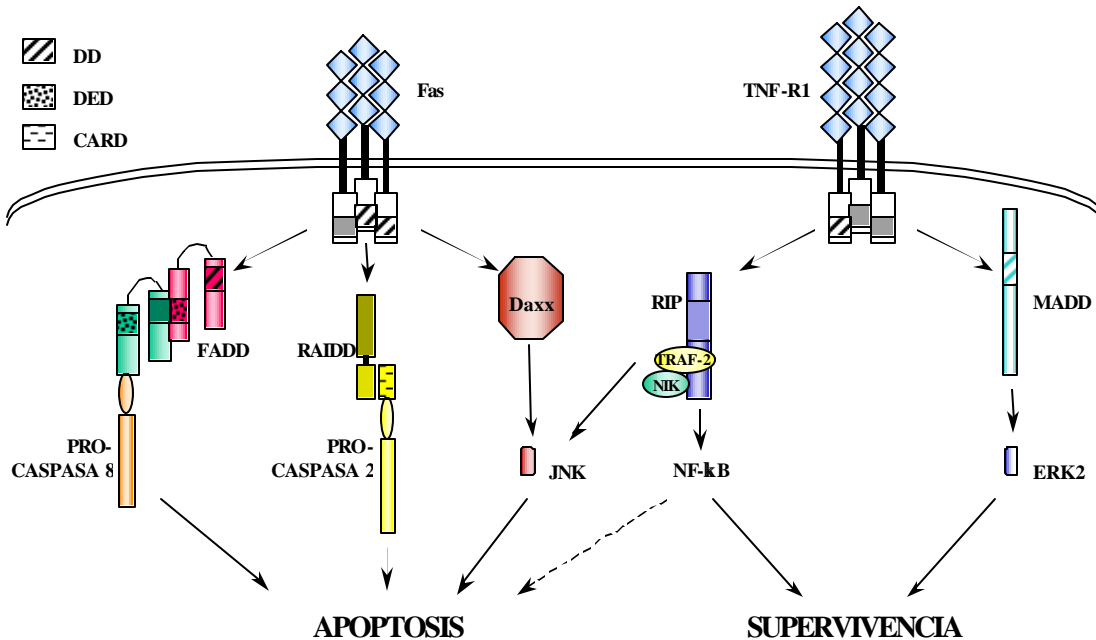


Fig.4. Rutas de transmisión de señal de los receptores de muerte Fas y TNF-R1.

Los receptores de muerte también participan en vías independientes a la ruta de las caspasas. Así pues, TNF-R1 puede intervenir en la activación de ERK2 a través de MADD (*mitogen-activated kinase activating death domain protein*) (Schievella *et al.*, 1997) y Fas se puede unir a Daxx e inducir la activación de las quinasas JNKs, activando o reforzando las señales de apoptosis (Yang *et al.*, 1997) (fig. 4).

TRADD (*TNF-receptor associated death domain*) y RIP (*receptor-interacting protein*) son otros adaptadores con DD capaces además de activar a NF-κB (Hsu *et al.*, 1995; Stanger *et al.*, 1995; Ting *et al.*, 1996). TRADD se une a TNF-R1, a FADD y a RIP, mientras que RIP necesita ser reclutada por otra proteína adaptadora, como TRAF2 (*TNF-receptor-associated factor*), porque no puede unirse directamente a TNF-R1 (Hsu *et al.*, 1996) (fig. 4).

La activación de los receptores de muerte puede ser una diana en la terapia anticancerosa; de hecho se ha visto que algunas drogas utilizadas en el tratamiento del cáncer inducen la síntesis de Fas-L (Friesen *et al.*, 1996; Muller *et a.*, 1997; Fulda *et al.*, 1997).

1.3.4.2. El citocromo C

Existe una vía de activación de la apoptosis dependiente de la salida de la mitocondria del citocromo C; durante el desarrollo, el proceso apoptótico está mediado principalmente por esta vía.

La mitocondria está formada por una doble membrana que limita la matriz y el espacio intermembranoso, siendo en la membrana interna donde está localizada la cadena respiratoria. La transferencia de electrones se produce a lo largo de la cadena respiratoria y está asociada con el bombeo de protones de la matriz al espacio intermembranoso, de forma que se crea un potencial de membrana mitocondrial ($A\Psi_m$) a través de la membrana interna que es necesario para la síntesis de ATP. La cadena respiratoria contiene numerosos transportadores de electrones entre los que se encuentran los citocromos, proteínas transportadoras de electrones que contienen un grupo *hemo*.

La liberación del citocromo C mitocondrial está relacionada con la activación de la apoptosis ya que una vez en el citosol se puede asociar a Apaf-1 y de esta forma unirse y activar a la pro-caspasa 9 a través de sus dominios CARD con la consecuente activación de la cascada de caspasas. Existe una segunda región en Apaf-1 que permite la asociación de varias moléculas Apaf-1, provocando indirectamente la agregación y activación de la caspasa 9 (Srinivasula *et al.*, 1998). La salida de la mitocondria del citocromo C puede producirse como consecuencia de ciertos estímulos apoptóticos que provocarán el colapso de la membrana interna mitocondrial y/o a una caída del potencial de membrana debido a la apertura transitoria de poros permeables en la membrana mitocondrial (Green & Reed, 1998). Bcl-2, Bcl-X_L y Bax comparten la capacidad de formar canales a través de las membranas intracelulares, de esta forma controlan la permeabilidad de estas membranas y en el caso de la mitocondria la salida del citocromo C; mientras que Bcl2 y Bcl-X_L inhiben la formación de dichos canales, la unión de Bax a la mitocondria puede tener el efecto opuesto.

Los receptores de muerte también pueden inducir indirectamente la liberación de citocromo C a través de la activación de la caspasa 8 y de la fragmentación de Bid, amplificándose así la señal apoptótica (Gross *et al.*, 1999) (fig.5).

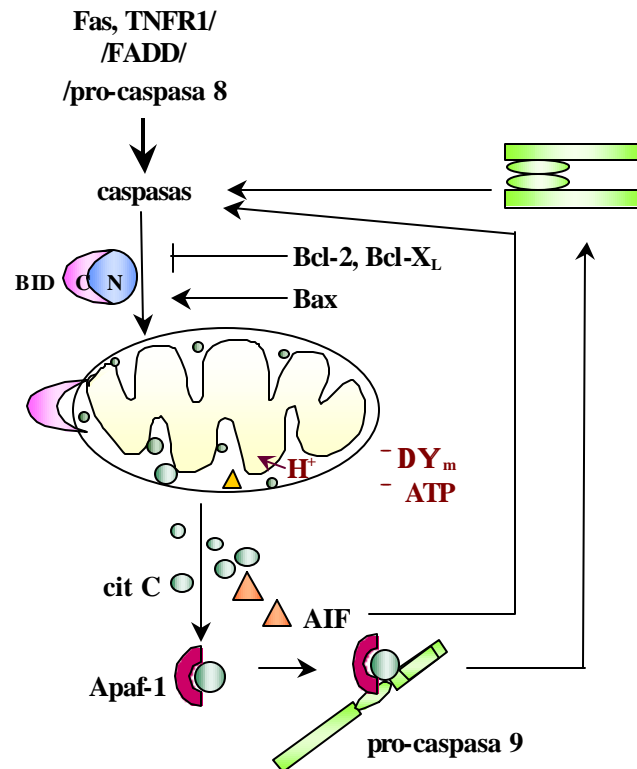


Fig.5. Mediación de la salida del citocromo C (cit C) de la mitocondria por los receptores de muerte y por la familia de Bcl-2. La caspasa 8 fragmenta a BID lo que permite que su fragmento C-terminal se transloque a la membrana mitocondrial y la permeabilize. Bax tiene un efecto similar a BID mientras que Bcl-2 y Bcl-X_L protegen la integridad mitocondrial. La ruptura de la membrana mitocondrial externa permite la liberación de AIF de los activadores de caspasas (*apoptosis inducing factor*) y del cit C, produciéndose un bucle de amplificación mitocondrial. La apertura de poros en la membrana interna también contribuye a la desestabilización al permitir la entrada de H⁺ en la matriz mitocondrial y provocando de esta forma la caída del $\Delta\Psi_m$ y de la síntesis de ATP.

El mantenimiento de la integridad mitocondrial es indispensable para el buen funcionamiento de la célula; así pues, mientras que la inhibición de las caspasas protege totalmente de la apoptosis inducida por la vía de los receptores de muerte no ocurre lo mismo

con la señal que va a través de la vía mitocondrial, ya que la célula morirá igualmente *a posteriori* debido a la disfunción mitocondrial y de la cadena respiratoria (Cecconi *et al.*, 1998).

1.3.4.3. La familia de Bcl-2

El proto-oncogén *bcl-2* (*B-cell leukemia/lymphoma-2*) fue detectado por primera vez en linfomas foliculares de células B, viéndose que en un 85 % de los casos estaba sobreexpresado como consecuencia de una translocación entre los cromosomas 14 y 18 (Tsujimoto *et al.*, 1985 y 1984); desde entonces se ha estudiado su relación con el cáncer.

Bcl-2 da el nombre a toda una familia de proteínas homólogas que están repartidas en dos grupos, el de los miembros anti-apoptóticos o factores de supervivencia, que inhiben la muerte celular por apoptosis como el propio Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, etc. y el formado por los miembros pro-apoptóticos o promotores de la apoptosis, siendo Bax el miembro mejor estudiado además de Bcl-X_S, Bak, Bad, Bik, Bid, etc. En cada grupo, todos sus miembros parecen tener las mismas funciones aunque hay células que tienen preferencia por emplear a un determinado factor de supervivencia (O'Connor *et al.*, 1998). El ratio entre ambos grupos contribuye a la susceptibilidad de las células frente las señales de muerte.

Todas estas proteínas poseen entre uno y cuatro dominios α -hélice BH conservados (dominios Bcl-2 de homología) llamados BH4, BH3, BH1 y BH2, según el orden en el que aparecen desde el extremo N-terminal y también poseen en la mayoría de los casos una región de transmembrana (TM) en el extremo C-terminal que les permite emplazarse en las membranas del RE, núcleo, y en la membrana mitocondrial externa; las que no poseen esta región de TM (como A1 y Bad) o la tienen mutada se han visto en los mismos lugares, se supone que debido a su interacción con los miembros de la familia que sí la tienen (revisado en Bowen *et al.*, 1998) (fig. 6).

La localización subcelular de los dos grupos es diferente en ausencia de señales de muerte; los miembros anti-apoptóticos son integrales de membrana (membrana nuclear, mitocondrial y del RE), mientras que la mayoría de los miembros pro-apoptóticos se localizan en el citosol o el citoesqueleto. La llegada de la señal de muerte provoca cambios

conformacionales en los miembros pro-apoptóticos que permiten su integración en las membranas, especialmente la membrana mitocondrial externa y su homodimerización (revisado en Gross *et al.*, 1999).

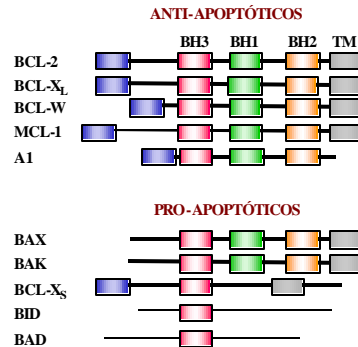


Fig. 6. Dominios BH de algunos miembros de la familia de Bcl-2.

Los miembros de la familia de Bcl-2 ejercen su función al dimerizarse a través de los dominios BH, pudiendo formar homodímeros (Bcl-2/Bcl-2, Bax/Bax, Bcl-X_L/Bcl-X_L y Bcl-X_S/Bcl-X_S) o heterodímeros (p.e. los formados por Bcl-2 con Bax, Bcl-X_S, A1 y Bad, también Bax con Bcl-X_L, Mcl-1 y A1 y además Bcl-X_L con Bcl-X_S). El efecto de muerte o de supervivencia dependerá de cómo se combinen, así, los homodímeros Bax/Bax promueven la apoptosis mientras que sus heterodímeros con miembros anti-apoptóticos tienen el efecto contrario (fig. 7).

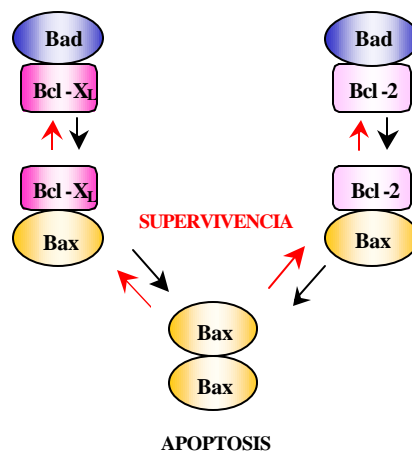


Fig. 7. La consecuencia de la homo o heterodimerización de determinados miembros de la familia de Bcl-2 será la supervivencia o la muerte por apoptosis de la célula. Los dímeros Bax/Bax promueven la apoptosis mientras que las combinaciones Bcl-X_L/Bax y Bcl-2/Bax protegen a la célula de la apoptosis. Los dímeros Bad/Bcl-X_L y Bad/Bcl-2 favorecen la formación de homodímeros Bax/Bax y de esta forma la muerte celular.

Estudios *in vitro* han demostrado que el mecanismo por el que Bcl-2 regula la apoptosis es por su capacidad de formar canales a través de las membranas intracelulares, mecanismo que comparte con Bcl-X_L y Bax. A nivel mitocondrial, Bcl-2 controlaría la permeabilidad de la membrana evitando la abertura de canales que permitiesen la formación de radicales libres y la salida al citosol, entre otros componentes, del Ca²⁺ y del citocromo C (revisado en Antonsson & Martinou, 2000 y Vander Heiden & Thompson, 1999).

Como hemos visto antes, la inducción de la apoptosis a través de los receptores de muerte también puede seguir una ruta que implique a los miembros de la familia de Bcl-2, a través de Bid, un sustrato de la caspasa 8 (Gross *et al.*, 1999) (fig. 5).

Bcl-2 está ampliamente expresada durante el desarrollo embrionario. Se sabe que favorece la supervivencia de la célula frente a determinados estímulos apoptóticos como tratamientos con UV, radiaciones-γ, shock térmico, la ausencia de factores de crecimiento (TGF-β y TNF-α), citoquinas, algunas interleuquinas, infecciones virales, agentes promotores de la formación de radicales libres, etc. (Reed, 1994; Bowen *et al.*, 1998).

Bcl-2 también puede actuar como proteína adaptadora, interaccionando con otras proteínas que no comparten ninguna homología con los miembros de su familia, como Raf-1 y la calcineurina, una fosfatasa que regula la actividad de la familia de los factores de transcripción de NF-AT (Srivastava *et al.*, 1999). Ensayos *in vitro* han demostrado que Bcl-2 se trimeriza con Apaf-1 y caspasa-9 de forma que este complejo quedaría secuestrado en la membrana mitocondrial (Pan *et al.*, 1997); asimismo, en estudios realizados en *Caenorhabditis elegans* se ha visto que Ced-9 se une a Ced-4 y este a su vez activa a Ced-3, homólogos de Bcl-2, Apaf-1 y caspasa 3 respectivamente (Chinnaiyan *et al.*, 1997).

El incremento de la expresión de Bcl-2 (o Bcl-X_L) o la baja expresión de Bax favorecen la carcinogénesis al prolongar la vida de las células y facilitar así la acumulación de mutaciones; los niveles de estos factores se han relacionado con la progresión tumoral y con una mala prognosis de distintos cánceres como los neuroblastomas, gliomas, linfomas, adenocarcinomas de colon y próstata, melanomas, etc. (Reed, 1996). La sobreexpresión de Bcl-2 es capaz de inhibir la apoptosis inducida por determinados agentes quimioterapéuticos e inducir resistencia a estos tratamientos anticancerosos; también es capaz de hacer que

determinados agentes citotóxicos pasen a ser citostáticos al promover el arresto del ciclo celular. (Reed, 1998).

La expresión del gen *bcl-2* está regulada de forma negativa por la proteína p53 mientras que *bax* lo está de forma positiva. La delección o mutación de *p53* puede llevar a un aumento de la expresión de *bcl-2* y a una disminución de la de *bax*, bloqueándose la apoptosis de poblaciones celulares que experimentarán un crecimiento inadecuado. Las células tumorales que tienen niveles elevados de los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 suelen ser seleccionadas porque aseguran el correcto funcionamiento de la mitocondria a la vez que inhiben determinados procesos apoptóticos, manteniendo la viabilidad celular.

La familia de Bcl-2 también interviene en el control del ciclo celular pues la sobreexpresión de Bcl-2 conduce a la parada del ciclo y a que las células se vayan a quiescencia (O'Connor *et al.*, 2000).

1.3.4.4. Las caspasas

Las caspasas (*cysteine-aspartate-proteases*) son las moléculas efectoras de la apoptosis en mamíferos. Forman una familia de cisteína-proteasas que fragmentan sus substratos a continuación de los residuos aspártico de la que se conocen catorce miembros con una alta homología entre ellos (fig.9), aunque las caspasas 11 y 12 sólo han sido identificadas en ratones. Están presentes en el citosol como pro-enzimas de 30-50 kDa, formados por un pro-dominio y dos subunidades (una grande de 20 y otra pequeña de 10 kDa), separadas en la mayoría de las pro-caspasas por una región que será eliminada al activarse, bien por autoproteólisis o a través de otros miembros de la familia.

El prototipo de las caspasas es la caspasa-1 o ICE (*interleukin-1 β -converting enzyme*), activador de la interleuquina-1 β . La mayoría intervienen en la apoptosis, mientras que las caspasas 1, 4 y 5 juegan un importante papel en la maduración de las citoquinas y en la inflamación (fig.8).

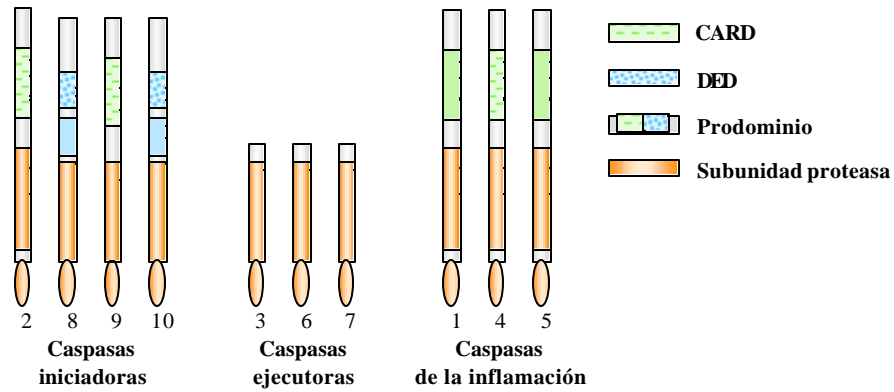


Fig. 8. Homología y función de las caspasas.

Existen dos tipos de caspasas: las iniciadoras y las efectoras o ejecutoras; las iniciadoras (caspasa 2, 8, 9 y 10) poseen grandes pro-dominios y regiones de interacción proteica; se encuentran al inicio de las cascadas de activación de la proteólisis, activándose en respuesta a señales de estrés, daño celular, o de muerte para entonces proteolizar y activar a las caspasas efectoras; las caspasas efectoras (3, 6 y 7) poseen pro-dominios cortos y son activadas predominantemente por otras caspasas para entonces proteolizar diferentes substratos que conducirán finalmente a la muerte de la célula por apoptosis (Nuñez *et al.*, 1998; Thornberry & Lazebnik, 1998).

Las pro-caspasas 8 y 10 presentan dominios DED, y las pro-caspasas 1, 2, 4, 5 y 9 presentan dominios CARD (fig. 9); todas ellas se unirán a moléculas adaptadoras con su mismo dominio para que se produzca su activación y la formación de un heterodímero con las dos subunidades; finalmente, la asociación de dos heterodímeros dará un tetrámero con dos centros catalíticos independientes (Walker *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1994; Rotonda *et al.*, 1996) (fig. 9).

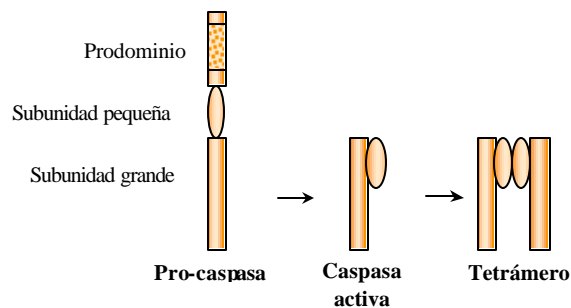


Fig. 9. Proceso de activación de las caspasas.

Se conocen dos vías principales de activación de las caspasas: la vía inducida tras la activación de los receptores de muerte y la vía de la mitocondria (a través de la salida al citosol del citocromo C). Una vez activadas, las caspasas inactivarán rápidamente a una serie de proteínas que protegen a las células de la apoptosis como la I^{CAD}/DFF45, que inhibe a la nucleasa responsable de la fragmentación del DNA (Liu *et al.*, 1998) y la PARP, evitando con ello la reparación del DNA fragmentado y asegurando la irreversibilidad de la apoptosis (Konopleva *et al.*, 1999). Las caspasas intervienen directamente en la desestabilización de las estructuras celulares cortando las lamininas que forman la lámina nuclear, estructura rígida que envuelve a la membrana nuclear, provocando así el colapso de la lámina nuclear y contribuyendo a la condensación de la cromatina (Takahashi *et al.*, 1996). También participan indirectamente en la reorganización de las estructuras celulares al degradar diversas proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto, tal es el caso de la gelsolina (Kothakota *et al.*, 1997), la FAK (*focal adhesion kinase*) (Wen *et al.*, 1997) y la PAK-2 (*p21-activated kinase 2*) (Rudel & Bokoch, 1997). La membrana celular sufre también cambios morfológicos relacionados con la actividad caspasa sin perder su integridad, como la polimerización de la actina, necesaria para la formación de los cuerpos apoptóticos (Martins & Earnshaw, 1997). Otra marca de la actividad de las caspasas es la disociación de los mecanismos reguladores y efectores de la célula debido a la inactivación de enzimas tales como la DNA-proteína quinasa (DNA-PK), implicada en la reparación del DNA, el factor de replicación C, que participa en la replicación del DNA y la U1-70K, implicada en el procesamiento de los mRNA (Cryns & Yuan, 1998), aunque no se conoce bien la relación entre estos fenómenos de proteólisis con la muerte celular.

1.3.4.5. La proteólisis de la PARP como indicador de la muerte celular por apoptosis

La PARP (*poly-(ADP-ribose)-polymerase*) es una enzima nuclear de 116 kDa implicada en la reparación del DNA cuya síntesis se activa cuando se produce la fragmentación del DNA y en presencia de proteínas nucleares poli ADP-ribosiladas. En una fase temprana de la apoptosis las caspasas fragmentan la PARP por proteólisis, obteniéndose un fragmento de 89kDa y otro de 24 kDa responsable de su actividad pues al quedar libre, esta pequeña fracción se une de forma irreversible a los extremos del DNA fragmentado impidiendo el acceso de los enzimas reparadores del DNA, de forma que la proteólisis de la PARP facilita la desorganización nuclear y asegura la irreversibilidad del proceso apoptótico (Oliver *et al.*,

1999). La fragmentación de la PARP también puede producirse durante la necrosis pero de forma diferente, obteniéndose fragmentos de distinto tamaño a los producidos durante la apoptosis (Guillouf *et al.*, 1999).

1.3.4.6. La actina

La actina es una proteína monomérica (actina G) presente en el citoesqueleto que polimeriza formando los filamentos de actina (actina F), esta polimerización es algo compleja, pues se trata de un no-equilibrio dinámico muy importante para cumplir con las funciones que desempeña en la célula, como por ejemplo durante el desarrollo, en la mitosis, en la movilidad y en la señalización celular (Theriot, 1997).

En la fase de ejecución de la apoptosis las células sufren una serie de alteraciones estructurales que conducen a su muerte como son la disminución de la adhesión celular y los contactos intercelulares, cambios en la superficie de la célula con aparición de protusiones que causan un aumento en la movilidad y la reducción del volumen celular. Durante este proceso, se produce la fragmentación de la actina asociada a membrana que une los polímeros de actina con la membrana plasmática; esta rotura tiene lugar en una región diana para las caspasas, aunque no se produce de forma directa por ellas.

La relación entre polímeros de actina y actina soluble se rompe a favor de esta última en etapas muy iniciales de la transformación celular debido a ciertos cambios en las proteínas reguladoras asociadas a los filamentos de actina; estas modificaciones en el citoesqueleto de actina guardan relación con el crecimiento anormal de las células transformadas, su incrementada habilidad de metastatizar y de adhesión a los tejidos (Stourmaras *et al.*, 1996). Por todo ello resulta muy interesante lograr una quimioterapia selectiva para estos filamentos (Janmey, 1995; Zigmond, 1996; Tapon & Hall, 1997; Assoian & Zhu, 1997). De hecho, la actina es actualmente diana de un gran número de drogas con potencial antitumoral; en los últimos años se han descubierto varias sustancias derivadas de productos naturales que modulan la polimerización de la actina, muchas veces como único mecanismo. Estas drogas también han servido para el estudio de su dinamismo y función en la célula porque son inhibidores de la proliferación. Otras dianas para la quimioterapia anticancerosa son todas las proteínas accesorias que regulan la organización y función de la actina como la gelsolina y

análogos, un regulador de la actina que funciona como supresor tumoral que se encuentra desregulada negativamente en muchas células tumorales (Asch *et al.*, 1999; Koya *et al.*, 2000) o inhibidores de la farnesil-transferasa, enzima que cataliza la unión de Ras a la cara interna de la membrana celular (Jordan & Wilson, 1998; Muñoz, 1997).

1.3.4.7. Las MAP quinasas (MAPKs)

Con el nombre genérico de MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) se conocen a un grupo de proteínas citoplasmáticas con actividad quinasa encargadas de la transmisión de señales que llegan del exterior y que activarán finalmente determinados procesos en el núcleo. La principal diana de la señal vía MAP quinasa es la regulación de la expresión génica, promoviendo procesos como la proliferación, la diferenciación, el desarrollo e incluso la apoptosis. Los estímulos que activan a estos mediadores intracelulares son múltiples, incluyendo los ésteres de forbol, ionóforos y situaciones de estrés ambiental como las producidas por las radiaciones ionizantes, el choque osmótico, el estrés oxidativo, las citoquinas pro-inflamatorias, el LPS o por la activación de ciertos receptores de membrana.

Tras la llegada del estímulo la señal puede seguir distintas vías MAP quinasas independientes o con pequeñas conexiones entre ellas, de manera que mientras que algunos estímulos son específicos para una sola vía otros son comunes para dos o más, por lo que la coordinación entre estas rutas paralelas es muy importante; en mamíferos se conocen tres vías MAPKs: la de la subfamilia de las ERKs (*extracellular-signal-regulated kinases*), la de las p38 MAP quinasas y la de las JNKs (*Jun N-terminal kinases*). En todos los casos se activan por la doble fosforilación de sus miembros (fig.10).

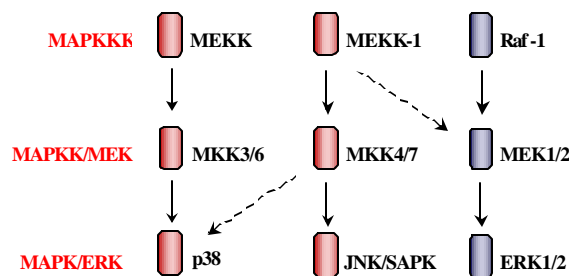


Fig. 10. Vías de transducción de señal de las MAP quinasas.

El grupo de las JNKs está formado por unas 12 isoformas y al igual que las p38 MAPKs se activan en situaciones de estrés ambiental como las mencionadas anteriormente, siendo muy poco sensibles a los estímulos mitogénicos que llegan vía Ras que suelen ir vía ERKs. Se cree que la forma en la que el estrés celular induce la activación de las JNKs es mediante la activación de los receptores de muerte como el TNF-R1 (a través de la proteína adaptadora TRAF2 y de la proteína quinasa RIP) o Fas (por medio del adaptador Daxx) (fig. 4).

La fosforilación de las JNKs conlleva a la fosforilación de c-Jun y está mediada por MKK4 y MKK7, cuya abundancia relativa difiere según el tejido; además, MKK4 también puede fosforilar *in vitro* a p38. Por su parte, p38 también pueden fosforilar a ATF2 y de esta forma regular también la activación del complejo AP-1 (revisado en: Hunter, 2000; Davis, 1999 y Kyriakis, 1999).

1.3.4.8. c-Jun, c-Fos y el complejo AP-1

c-Jun es un factor de transcripción que dimeriza formando homodímeros o heterodímeros con c-Fos o con miembros de la familia de ATF (como ATF2, el factor de transcripción activante-2). Estos dímeros constituyen el complejo AP-1, regulador de múltiples genes implicados en el crecimiento celular como oncogenes (entre ellos, los propios *c-jun* y *c-fos*), genes supresores de tumores, genes de proteasas implicadas en la invasividad y en la respuesta inflamatoria y genes de factores angiogénicos (VEGF), citoquinas y otros factores reguladores del sistema inmune.

La expresión de c-Fos está mediada por la activación del elemento de respuesta al suero presente en el promotor de c-Fos, mientras que el aumento de la expresión de c-Jun está regulado por dos vías: en primer lugar, JNK produce un incremento en la actividad de AP-1 que activa la expresión de c-Jun a través de las regiones *AP-1-like* en el promotor de *c-jun*, en segundo lugar, la fosforilación de c-Jun provoca una disminución en su degradación mediada por la ubiquitina, aumentando su vida media (revisado en Davis, 1999 y Kyriakis, 1999).

1.3.4.9. La proteína-quinasa C (PKC)

Las proteína-quinasa C (PKCs) son unas serina/treonina-quinasa que actúan como mediadoras en la transducción de señal de múltiples vías. Se activan por la hidrólisis de fosfolípidos, siendo su principal activador el diacilglicerol (DAG). Los miembros de esta familia desempeñan un importante papel en la regulación de numerosas funciones como son el crecimiento y la diferenciación celular, la homeostasis, la activación de los linfocitos B y también en la apoptosis inducida por diferentes estímulos como determinadas drogas antitumorales, $\text{TNF}\alpha$, radiaciones ionizantes, etc. (McCubrey *et al.*, 2000).

Se conocen unas doce isoformas (la expresión de las cuales depende del tejido), que han sido clasificadas en tres subclases:

- las isoformas convencionales (cPKC): α , βI , βII y γ . Son moduladas por DAG, fosfatidilserina (PS) y Ca^{2+}
- las isoformas nuevas (nPKC): δ , ϵ , η y θ . Están reguladas por DAG y PS
- las isoformas atípicas (aPKC): ζ , ι y λ . Se activan con la PS

Las PKCs contienen un dominio catalítico en el extremo C-terminal y otro regulador en el extremo amino-terminal que consta de un dominio de autoinhibición, una secuencia rica en cisteínas de unión al DAG (y a los ésteres de forbol) y un dominio en forma de β -hoja plegada de unión a fosfolípidos ácidos con un bolsillo de unión al Ca^{2+} .

Las PKCs están reguladas por la unión de mensajeros secundarios, por fosforilación, por su localización subcelular y por la interacción con proteínas específicas. El ciclo completo de activación de las PKCs va desde su asociación al citoesqueleto cuando son recién sintetizadas, la fosforilación por una PKC quinasa, la autofosforilación y liberación al citosol, el anclaje a isoenzimas específicos de unión a la membrana, la unión del DAG, PS y Ca^{2+} (que incrementa su afinidad por los residuos PS), y por la interacción de la forma activa con proteínas diana que guían al enzima hasta su sustrato.

Las PKCs desempeñan distintos papeles en los balances proliferación/apoptosis/supervivencia. Se ha asociado una baja actividad de la PKC con la apoptosis (Sánchez *et al.*, 1992) y también a la PKC ι con la resistencia a muchos agentes apoptóticos (Murray & Fields,

1997). Hay sustancias inductoras de la apoptosis que lo que hacen es inhibir la PKC; otras sustancias lo que hacen es activar a la PKCs, promoviendo así la supervivencia celular (McCubrey *et al.*, 2000; Lavin *et al.*, 1996) (fig. 11).

La vía PKC también regula parcialmente el proceso de la fosforilación/desfosforilación de Bcl2 y de esta forma, a través de la fosforilación de Bcl2 previene la apoptosis (Murata *et al.*, 1997).

Los ésteres de forbol (promotores tumorales análogos al DAG) activan las isoformas de PKCs sensibles y esto conduce a su agotamiento o disminución porque al activarse, se pone en marcha el proceso de degradación de las PKCs vía ubiquitina (Lu *et al.*, 1998).

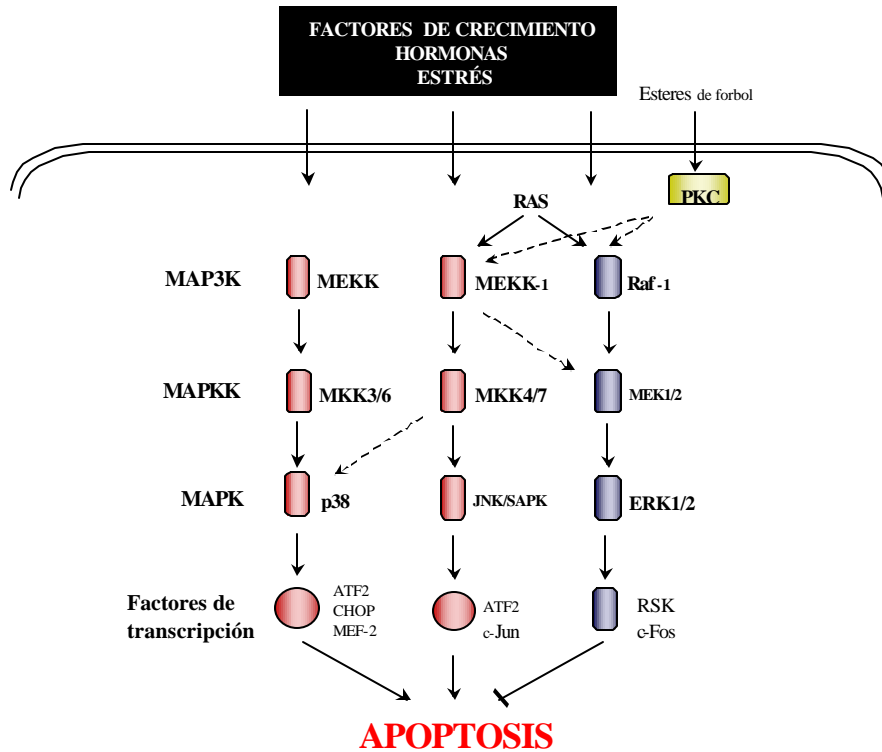


Fig. 11. Procesos de control de la apoptosis regulados a través de la PKC.

1.3.4.10. El factor de transcripción NF- κ B

NF- κ B es un factor de transcripción que forma parte de una vía de transducción de señal dependiente de PKC. Se sabe que puede actuar como inhibidor de la apoptosis, siendo capaz de bloquear la activación de caspasa-8 a través de la regulación de ciertos genes que codifican para IAPs (factores inhibidores de la apoptosis) y para TRAF1/2; también se ha visto que inhibe la liberación del citocromo C mitocondrial induciendo la expresión de miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2 (Park & Levitt, 1993; Khwaja, 1999; Wang *et al.*, 1999). También puede inducir la transcripción de genes de respuesta inflamatoria como citoquinas y receptores de citoquinas (Philpott *et al.*, 2000) y más recientemente se ha descrito una actividad pro-apoptótica a través de genes inductores de la apoptosis (Sohur *et al.*, 2000; Israel, 2000; Lin *et al.*, 1999).

NF- κ B está presente en el citosol en estado inactivo, formando parte de un complejo con el inhibidor I κ B; su activación se produce cuando I κ B es fosforilado en respuesta a diferentes estímulos y entonces tiene lugar la separación del complejo y la eliminación de I κ B vía ubiquitina. La forma NF- κ B libre es entonces translocada al núcleo donde activará la transcripción de diferentes genes diana, entre ellos algunos implicados en la respuesta inmune (fig.12).

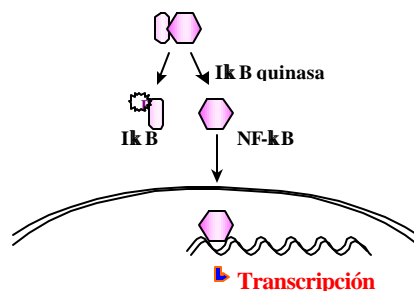


Fig. 12. Activación del factor de transcripción NF- κ B.

1.3.4.11. La p53

El gen supresor *p53* se encuentra mutado aproximadamente en la mitad de los tumores humanos; la mayoría de estas mutaciones son puntuales pero provocan una alteración tal en la

molécula que lleva a la pérdida de su función, pasando de suprimir la aparición de tumores a promoverlos. Se trata de una proteína multifuncional, con un dominio de activación transcripcional, otro de unión a secuencias específicas de DNA que hacen de ella un factor de transcripción, un dominio de oligomerización responsable de su tetramerización y otro carboxi-terminal que modula la actividad transcripcional y de unión inespecífica al DNA y RNA.

p53 es básicamente un regulador de la expresión génica, capaz de activar y reprimir genes específicos. Interviene en el control del ciclo celular, de la replicación y de la reparación del DNA, mantiene la estabilidad genómica, activa la apoptosis y participa en la respuesta celular a agentes externos nocivos. En respuesta a determinadas señales de estrés, como serían el daño en el DNA, hipoxia o la activación de oncogenes, sus niveles aumentan debido a una prolongación de su vida media, que conduce al incremento la expresión de las proteínas p21 y Gadd45 encargadas de producir el arresto celular hasta que se produzca la reparación del daño; si el daño es excesivo o irreparable, p53 inducirá la expresión de *bax* y la represión de *bcl-2*, aunque también puede inducir la expresión de Fas; en cualquier caso, la consecuencia será la activación de la apoptosis. p53 también reprime la transcripción de otros genes cuyos promotores no contienen elementos respondedores a p53 conocidos, como *c-fos*, *c-jun*, *IL-6* y *Rb* (revisado en Lohrum & Vousden, 2000 y en Thiede *et al.*, 2000).

Recientemente se ha visto que p53 pertenece a una familia de proteínas, junto con p63 y p73, con quienes comparte una gran homología y la actividad transcripcional, el control de la parada del ciclo celular y su participación en la apoptosis, aunque al parecer no comparten el papel de p53 como supresor tumoral y además tienen una importante participación durante el desarrollo. *p73* se encuentra mutado en una gran variedad de tumores pero en el caso de *p63*, sus mutaciones son menos frecuentes; se ha observado que formas mutantes de p53 inactivan a p73 (revisado en Lohrum & Vousden, 2000).

1.3.5. Modelo de integración de la apoptosis

A modo de resumen hemos editado un esquema con las conexiones existentes entre las distintas vías de transmisión de la señal apoptótica aquí comentadas (fig. 13).

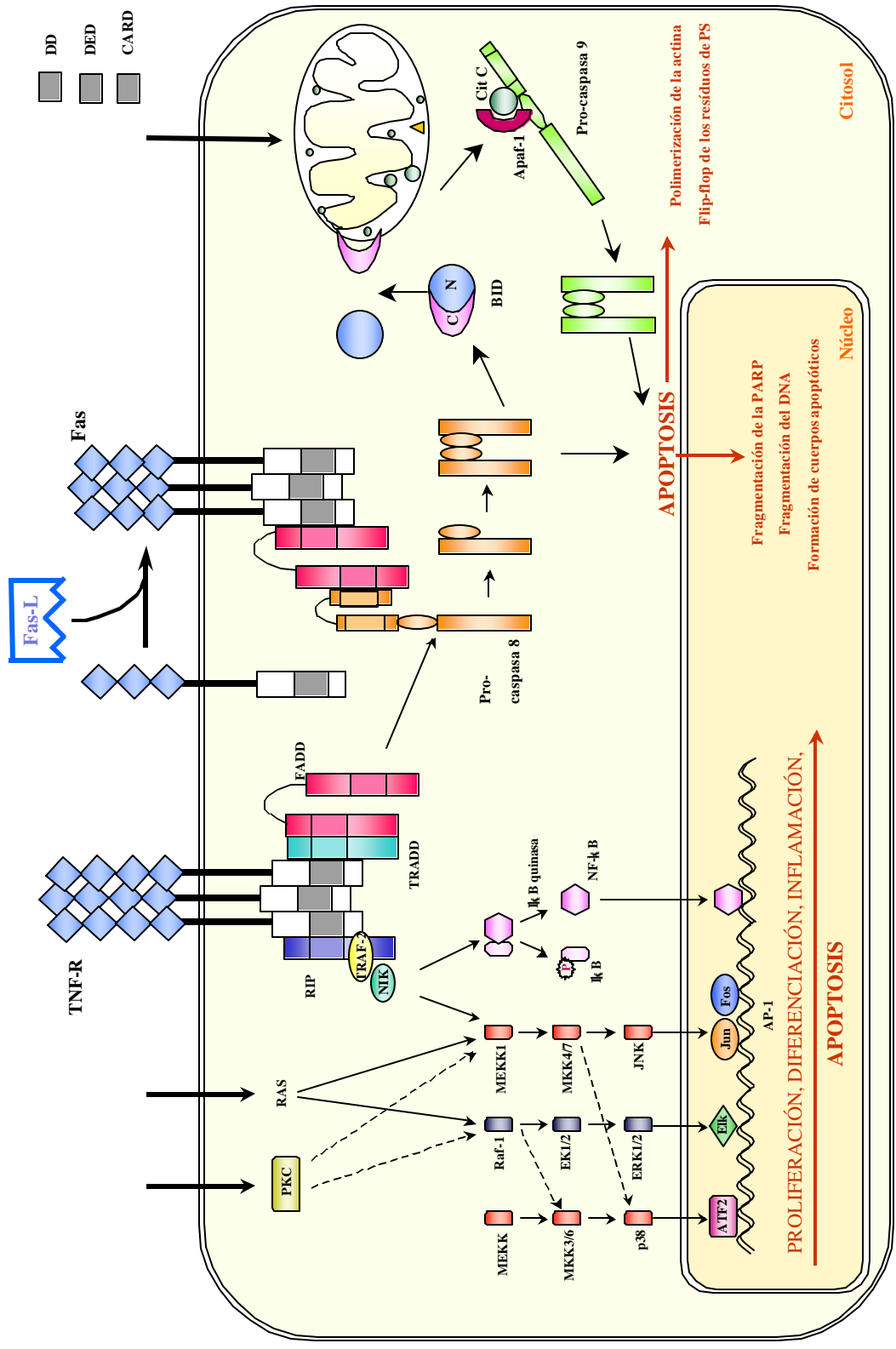


Fig. 13. Esquema global de integración de la apoptosis.

1.3.6. Apoptosis y enfermedad

La apoptosis es un proceso de muerte celular que normalmente se produce en beneficio del organismo; alteraciones en este mecanismo pueden causar distintas patologías; así pues, dado que la apoptosis juega un papel muy importante en el funcionamiento del sistema inmunológico, su carencia puede ser causa de inmunodeficiencias o de enfermedades autoinmunes, siendo responsable por tanto de infecciones virales, SIDA, hepatitis agudas o crónicas, cirrosis, o del rechazo de transplantes.

Como consecuencia de una isquemia, tal es el caso de un infarto o de un derrame cerebral, se produce la muerte de las células afectadas por necrosis pero en las zonas más periféricas también habrá apoptosis.

También se ha sugerido que la apoptosis es el mecanismo subyacente de diversos procesos neurodegenerativos como el Parkinson, el Alzheimer, la atrofia muscular espinal, la retinitis pigmentosa, la esclerosis amiotrófica lateral, y diversas formas de degeneración cerebelar.

La hematopoyesis también puede verse afectada por alteraciones en la apoptosis produciendo cuadros como el de la anemia aplásica, la neutropenia crónica, síndromes mielodisplásicos, etc.

Por último, es bien sabido que fallos en el proceso apoptótico pueden llevar al desarrollo de un cáncer (revisado por Cameron & Feuer, 2000b).

1.3.7. La apoptosis y la terapia anticancerosa

A la vista de la gran importancia del proceso de muerte celular por apoptosis en la aparición espontánea de cánceres y en la respuesta de la células tumorales al tratamiento con quimioterapia y radioterapia, pueden ser de enorme utilidad los agentes que sean capaces de inducir la apoptosis en estas células, y más si actúan de forma independiente de p53, por ser una diana preferente de mutaciones en células cancerosas.

La microbiota terrestre constituye un potencial de bioactivos con gran interés biotecnológico, cuya búsqueda es actualmente una prioridad para numerosos laboratorios de investigación. Cerca de un 50% de los fármacos comercializados hoy día, entre los que se encuentran los agentes anticancerosos, tienen su origen en seres vivos y la otra mitad está formado por productos sintéticos diseñados a semejanza de productos naturales (Brinkmann, 1996).

Han sido identificadas ciertas bacterias patógenas como inductoras de apoptosis (Zychlinsky & Santonetti, 1997; Arab *et al.*, 1999); algunas de ellas han desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir dentro del animal infectado, reduciendo sus defensas y causándole la enfermedad. La muerte de células del sistema inmunológico puede representar una gran ventaja para las bacterias, ya que para ellas son las células del huésped más peligrosas; en este sentido se sabe que *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induce la apoptosis de neutrófilos polimorfonucleares, y que patógenos del género *Shigella* sp. y *Salmonella* sp. inducen la apoptosis en macrófagos.

Se conocen algunas toxinas de origen bacteriano como la leucotoxina, la α -toxina y la hemolisina capaces de formar poros en la membrana de células eucariotas, provocando la hinchazón de la célula y así su muerte; otras toxinas como la toxina diftérica y la exotoxina-A inhiben la síntesis proteica, causando profundos cambios fisiológicos que conllevan a la muerte por apoptosis de las células infectadas (Chen & Zychlinsky, 1994). Actualmente se está estudiando la aplicación de moléculas de origen bacteriano en el tratamiento del cáncer como la verotoxina 1, componente activo de un preparado de bacteriocina de *Escherichia coli* que actúa induciendo la apoptosis en las células tumorales de animales xenotransplantados (Arab *et al.*, 1998 & 1999); otros ejemplos serían un amplio grupo de antibióticos antitumorales como bleomicina, neocarzinostatina, esperamicina/calicheamicina, leinamicina, etc. que producen daños en el DNA por diferentes mecanismos; otra familia recientemente aislada y caracterizada de antibióticos antitumorales son los llamados kapurimicinas, producidos por *Streptomyces* sp. DO-115 y sapurimicina producido por la cepa DO-116.

Uno de los primeros estudios en los que utilizó extractos de origen bacteriano para el tratamiento del cáncer fue en el caso de la llamada 'toxina de Coley'.

1.3.7.1. La toxina de Coley

A principios del siglo XVIII, médicos de la época se dieron cuenta de que determinados enfermos de cáncer mostraban una mejoría al desarrollar infecciones bacterianas. Un siglo más tarde, el cirujano William B. Coley halló una serie de estudios que relacionaban los sarcomas con la infección de erisipelas (infección superficial de la piel debida a *Streptococcus* sp.) y quiso sacarle provecho a estas observaciones en beneficio de sus pacientes.

Coley intentó inducir estas mismas infecciones con *Streptococcus* sp. en sus pacientes, pero se encontró con varios problemas como fue el no poder controlar la infección (los antibióticos no se descubrieron hasta un siglo después) o incluso pacientes que no llegaron a infectarse. En 1892 empezó a utilizar *Streptococcus* sp. muertos por calor consiguiendo únicamente ligeras mejorías, de forma que decidió incorporar en su terapia al entonces denominado *Bacillus prodigiosus*, hoy *Serratia marcescens*, con la idea de que al hacer un crecimiento mixto, *Streptococcus* incrementara su virulencia. Con estas modificaciones se lograron importantes mejoras en los pacientes y, tras comprobar que éstas no eran debidas al cultivo mixto de ambas bacterias, Coley pasó a obtener los cultivos por separado y a juntarlos después; el tratamiento era aplicado a los pacientes por inyección diaria o cada dos días durante semanas o incluso meses, y mostró una gran eficacia en pacientes con sarcoma. De hecho, el 90% de los resultados favorables se produjeron en tumores de origen mesodérmico como sarcomas, linfosarcomas y linfomas, mientras que en pacientes con carcinomas los resultados fueron prácticamente nulos (tabla 1).

| PACIENTES TRATADOS CON LA TOXINA DE COLEY ANTES DE 1940 | | | | | | |
|---|-------|----|----|----|----|----|
| Tipo de cáncer | Total | A | B | C | D | E |
| Sarcomas de tejido blando | 104 | 38 | 12 | 17 | 15 | 22 |
| Linfosarcomas (linfomas) | 50 | 24 | 7 | 4 | 7 | 8 |
| Osteosarcomas | 3 | 2 | 1 | - | - | - |
| Carcinoma de ovario | 4 | 1 | 2 | - | - | 1 |
| Carcinoma de cérvix | 2 | - | 1 | - | - | 1 |
| Testicular | 18 | 10 | 2 | 3 | 2 | 1 |
| Renal | 6 | 3 | - | 1 | 1 | 1 |
| Mieloma múltiple | 1 | - | - | 1 | - | - |
| Carcinoma colorrectal | 2 | 1 | 1 | - | - | - |
| Carcinoma de mama | 14 | 8 | 4 | 2 | - | - |
| Melanoma | 6 | 2 | 3 | - | 1 | - |

Tabla 1. Resultados obtenidos al tratar con la vacuna de Coley a pacientes considerados inoperables. Clasificación hecha en función de la respuesta al tratamiento: A) no hubo respuesta; B) presentaron una respuesta inicial pero recayeron en 5 años; C) superaron la enfermedad pero sufrieron recaídas en 5-10 años; D) superaron la enfermedad pero presentaron recaídas en 10-20 años; E) vencieron la enfermedad y no mostraron signos de recaída en un mínimo de 20 años.

Tras la muerte de Coley en 1936, el interés clínico por su vacuna fue cediendo al uso de la quimioterapia y la radioterapia. En los años 60 se aplicó de nuevo su tratamiento pero sin éxito, debido a que no se hizo una selección de los pacientes a tratar (menos del 10% presentaban sarcomas) ni se aplicó correctamente (la mayoría de los enfermos habían recibido o estaban recibiendo quimioterapia, radioterapia o ambas).

Hoy día, a la combinación de estas dos bacterias muertas por calor, el gram-positivo *Streptococcus* y el gram-negativo *S. marcescens* se la conoce como la toxina de Coley y la explicación del éxito que este tratamiento tubo en su momento se cree que fue debido a la posibilidad de que muchos de los tumores de origen mesodérmico sean inmunogénicos (Rook, 1992; Starnes, 1992).

2. *Serratia marcescens*

Serratia marcescens es un bacilo gram-negativo perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae*. Esta bacteria saprófita habita nichos ecológicos tan variados como aguas, suelos, aire, plantas y animales, siendo frecuente también en alimentos ricos en almidones (Grimont & Grimont, 1993); crece en condiciones extremas, inclusive en presencia de desinfectantes, antisépticos, y en agua destilada. Se trata de una patógena oportunista, responsable de numerosas infecciones nosocomiales en pacientes hospitalizados y heroinómanos, provocando cuadros infecciosos del tracto respiratorio y urinario, septicemia, meningitis, endocarditis e infección de heridas (Hejazi & Falkiner, 1997). Puede presentar flagelos o no, según esté creciendo en un medio líquido o sólido (O'Rear *et al.*, 1992; Matsuyama *et al.*, 1995). *S. marcescens* se caracteriza por la capacidad que tienen algunas cepas de producir el pigmento prodigiosina, de un color rojo característico.

2.1. CARACTERÍSTICAS DE LA FAMILIA DE LAS *Enterobacteriaceae*

La familia de las *Enterobacteriaceae* está formada bacilos gram-negativos no esporulados, no móviles o móviles por flagelos peritricos, quimiorganotrofos, anaerobios facultativos y oxidasa negativos, con necesidades nutricionales simples. Esta familia está compuesta por un grupo relativamente heterogéneo de bacterias en cuanto a su ecología, huéspedes que las albergan y por su potencial patogénico para humanos, animales, insectos y plantas. Actualmente consta de 30 géneros y se la considera responsable del 50% de las infecciones nosocomiales, principalmente causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Providencia* sp. y *Serratia marcescens* (Holt *et al.*, 1994).

2.2. HISTORIA DE *Serratia marcescens*

En 1823, Bartolomeo Bizio describió al microorganismo responsable de la pigmentación púrpura de la llamada *menta sangrante* como a un pequeño hongo al que denominó *Serratia marcescens* (Bizio, 1824) en memoria al físico italiano Serafino Serrati, inventor del buque de vapor. El término 'marcescens' procede del latín y hace referencia a descomposición y

putrefacción, fenómenos asociados a la primera descripción que se hizo de este microorganismo.

Muchas son las historias que se cuentan de esta bacteria. En el año 332 a.C. los soldados macedonios protagonizaron un largo sitio a la ciudad de Tiro; la aparición manchas de 'sangre' en el pan les asustó, pero se calmaron cuando un mago lo interpretó como señal de buen augurio; según él, como las motas rojas habían aparecido en el interior de los panes significaba que la destrucción alcanzaría a todos aquellos que estuviesen murallas adentro, así que los soldados de Alejandro Magno siguieron con el sitio hasta que finalmente cayó la ciudad, victoria que les abrió el camino a la conquista del Este. En la Edad Media en ocasiones aparecían manchas rojas en las hostias consagradas que eran confundidas con gotas de sangre; estos fenómenos eran considerados milagros, cuando en realidad probablemente se debieran a colonias pigmentadas de *Serratia* sp. (Gaughran, 1969).

Durante muchos años, a estos microorganismos productores se les llamó *Bacillus prodigiosus*, la bacteria de los milagros, al relacionarla seguramente con los fenómenos religiosos antes descritos; DeToni y Trevisan (1889) fueron los que la clasificaron como bacteria y fue por sus propiedades bioquímicas por lo que finalmente pasaron a ser consideradas enterobacterias y clasificadas como *Serratia* (Breed & Breed 1927; Buchanan, 1918).

Desde un principio, han sido muchos los organismos clasificados dentro del género *Serratia*; la primera edición del "Bergey's Manual" (Bergey *et al.*, 1923), incluía 23 especies, 27 especies la cuarta edición, y solamente una en la octava edición, denominada *S. marcescens* (Sakazaki, 1974). Actualmente, Grimont & Grimont (1993) describen 10 especies, de las cuales sólo tres son capaces de producir el pigmento prodigiosina: *S. plymuthica*, *S. rubidaea* y algunos biogrupos de *S. marcescens*.

2.3. EL PIGMENTO PRODIGIOSINA

Prodigiosina es un pigmento rojo con estructura de tripirrol lineal y con un peso de 323,44 dalton (fórmula molecular $C_{20}H_{25}N_3O$). No es difusible, es sensible a la luz (Yu, 1979)

y es insoluble en agua, moderadamente soluble en alcohol y éter y soluble en cloroformo, bromoformo y benceno (Index Merck).

E. Kraft le dio el nombre a la prodigiosina, designando con él al pigmento formado por *Bacillus prodigiosus* (Kraft, 1902); posteriormente fueron apareciendo nuevos pigmentos con la misma estructura química básica que la prodigiosina y con ellos se formó la familia de las prodigiosinas.

A *S. marcescens* se le pueden atribuir la síntesis de unas 1000 proteínas, un 1% de las cuales son enzimas implicadas en la síntesis de la prodigiosina; se trata de una maquinaria muy importante para la síntesis de una sustancia que no parece desempeñar ninguna función esencial para la bacteria (McQuillen, 1965), pues a la prodigiosina se la considera un metabolito secundario, compuesto innecesario para el metabolismo de la célula producido mayoritariamente una vez alcanzado el crecimiento estacionario del organismo (fase de senescencia del cultivo).

2.3.1. Estructura de la prodigiosina

La estructura de la prodigiosina se corresponde con el 2-metil-3-pentil-6-metoxiprodigioseno o 2-metil-3-pentilprodiginina, según se considere al esqueleto como prodigioseno (Hearn *et al.*, 1970) o prodiginina (Gerber, 1969), que se diferencian únicamente por el grupo metoxi del segundo pirrol (Fig.1. a y b).

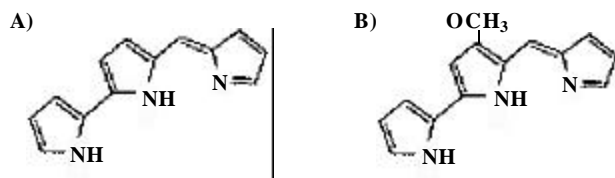


Fig.1. A) Núcleo del prodigioseno. B) Núcleo de la prodiginina.

2.3.2. Síntesis de la prodigiosina

En la síntesis de la prodigiosina se forman primero una serie de intermediarios por dos rutas independientes que finalmente convergen para dar el pigmento. Existen numerosos

mutantes de *S. marcescens* que interrumpen la síntesis en algún precursor; entre ellos está el mutante 933, que forma el biperol MBC (4-metoxi-2,2'-biperol-5-carboxaldehído), el mutante WF, que sintetiza el monopirrol MAP (2-metil-3-amilpirrol), y el mutante OF, que forma la norprodigosina (2-metil-3-pentil-6-hidroxiprodigoseno) (Morrison, 1966; Mody *et al.*, 1990) (fig. 2).

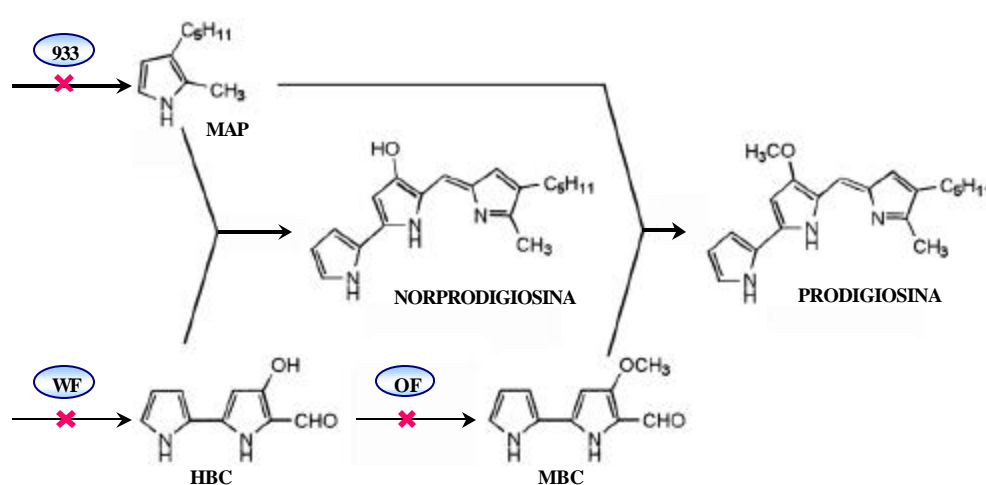


Fig.2. Esquema de la biosíntesis de prodigosina por *S. marcescens*.

Sólo los biogrupos altamente ubicuos de *S. marcescens* sintetizan prodigosina; los que no la producen acostumburan a ser deficientes en el enzima de condensación (Ding & Williams, 1983). Otros géneros bacterianos sintetizan pigmentos de la familia de las prodigosinas, como *Streptomyces coelicolor* (undecilprodigosina, UP) *Streptomyces hirosheimensis* (prodigosina 25-C, PrG), y *Pseudoalteromonas denitrificans* (cicloprodigosina·HCl, cPrG-HCl).

Se ha estudiado la relación entre la producción de prodigosina y la movilidad de *Serratia* sp. Una variación en la composición de los flagelos, ya sea por la adición, delección o sustitución de aminoácidos, cambia la antigenicidad del flagelo; este cambio producido en la superficie de un microorganismo está asociado con su patogénesis, pues es una forma de escapar del sistema inmunológico del huésped (Paruchury & Harshey, 1987). Kobayashi & Ichikawa (1990) han sugerido que la formación del flagelo es inversamente proporcional a la biosíntesis de prodigosina en cultivo líquido, hecho que explicaría por qué la mayoría de los aislamientos obtenidos de la clínica son muestras no productoras de pigmento (Aucken, HM, 1998).

La síntesis química de prodigiosina ha sido llevada a cabo por distintos autores, algunos de los cuales han utilizado para ello los precursores biológicos (Rapoport & Holden, 1960 & 1962; Rokem & Weitzman, 1987; Boger & Patel 1988; Wasserman *et al.*, 1999).

2.3.3. Condiciones de crecimiento de *Serratia marcescens* para favorecer la producción de la prodigiosina

2.3.3.1. El medio de cultivo

Los requerimientos mínimos que necesita un medio de cultivo para que *S. marcescens* sintetice la prodigiosina son: sales inorgánicas, glicerol como fuente de carbono y sales de amonio como fuente de nitrógeno (Bunting 1940). Un medio de cultivo que contenga glucosa como fuente de carbono y energía no permitirá la síntesis de prodigiosina. Para favorecer al máximo la formación de pigmento, el crecimiento ha de ser en medios con glicerol (Rjazantseva *et al.*, 1994). El empleo de un medio que contenga solamente peptona y glicerol en agua destilada es nutricionalmente suficiente para obtener prodigiosina en abundancia (Goldschmidt & Williams, 1968; Bunting, 1949) (fig. 3).

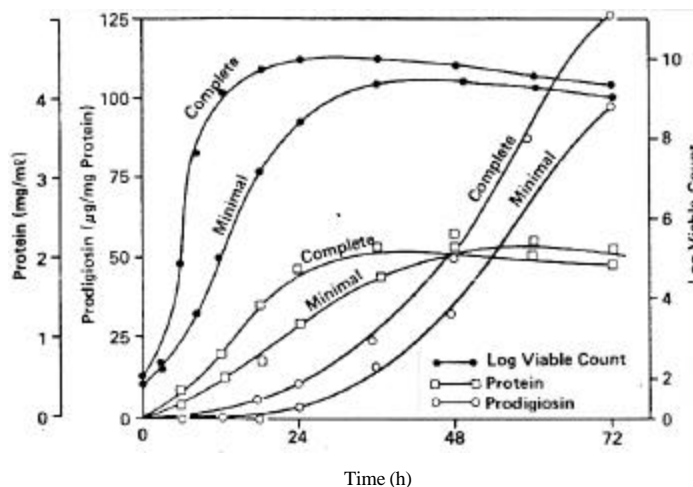


Fig. 3. Cinética de crecimiento y biosíntesis de prodigiosina (Quadri & Williams, 1972).

El pH, los iones y los detergentes también son factores limitantes para la obtención de la prodigiosina (CaCl₂, sales de hierro, fosfatos, etc.) (Sole *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 1982; Silverman & Muñoz, 1973); un ejemplo sería a nivel de NaCl: mientras que un 4% es la concentración idónea para obtener un buen rendimiento, con un 8% de NaCl se impide la síntesis de la prodigiosina (Rjazantseva *et al.*, 1994). De todas formas, hay que tener en cuenta que estos resultados pueden variar según sea la cepa estudiada.

2.3.3.2. El entorno

La síntesis de la prodigiosina requiere condiciones aeróbicas, siendo buenas las condiciones de crecimiento que favorezcan la oxigenación del cultivo (p.e., aplicando una agitación fuerte) (Heinemann *et al.*, 1970).

El tiempo de incubación necesario para obtener una buena síntesis del pigmento dependerá del medio de crecimiento y de las condiciones del cultivo (temperatura), pero en general se considera que a las 48 horas el rendimiento es bueno (fig.3).

La temperatura de crecimiento óptima para *S. marcescens* es de 30-37°C, y la requerida para obtener una buena pigmentación es de 27-30°C (Williams *et al.*, 1971).

La producción de la prodigiosina está directamente relacionada con la presencia o ausencia de luz durante el cultivo; así pues, la máxima obtención del pigmento en un cultivo con luz se produce a los 2-3 días, mientras que a oscuras, el tiempo necesario es de 3-4 días; curiosamente, el mayor rendimiento se obtiene en los cultivos sin luz (Rjazantseva *et al.*, 1994). Por otra parte, la luz es responsable a su vez de la fototransformación de prodigiosina (Yu, 1979; Rjazantseva *et al.*, 1994).

Las condiciones de crecimiento idóneas de los mutantes en la vía de la síntesis de la prodigiosina y para la obtención de los pigmentos son las mismas que las que se acaban de describir (Williams, 1967).

2.3.4. Localización intracelular de la prodigiosina en *Serratia marcescens*

La localización de la prodigiosina en *S. marcescens* es bastante controvertida; así, ha sido descrita a nivel de la pared celular (Tsang & Feng, 1971), ubicada en el periplasma o en la cara externa de la membrana citoplasmática (Viñas *et al.*, 1983) y también se ha descrito su presencia en unas vesículas citoplasmáticas de secreción que contienen a su vez proteasas, nucleasas y una proteína de 100 kDa a la que se asocia la prodigiosina (Matsuyama *et al.*, 1986; Kobayashi & Ihikawa, 1989; Kobayashi & Ihikawa, 1991).

2.3.5. Función de la prodigiosina en *Serratia marcescens*

No se conoce cual el papel que desempeña la prodigiosina para *S. marcescens*, aunque se realizaron numerosos estudios unas décadas atrás que han permitido hacer algunas suposiciones. Se sabe que muchos pigmentos actúan como antibióticos, entre ellos la prodigiosina, siendo más eficaz frente a gram-positivos (Gerber, 1975); también actúa como fungistático y como fungicida y frente a protozoos, habiéndose ensayado incluso en ratones infectados con malaria (Castro, 1967; Gerber, 1975; Melo *et al.*, 2000). Se ha visto que funciona como fotosensibilizador, produciendo la muerte de otras bacterias y permitiendo así que *S. marcescens* colonice el medio (Roth, 1967; Bartlett *et al.*, 1970), por lo que se cree que pueda ejercer un papel protector en condiciones desfavorables en las que el crecimiento está comprometido (Akimenko & Trukto, 1991).

24. LA MEMBRANA EXTERNA DE LAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS

La membrana externa de los gram-negativos está situada por encima de la capa de peptidoglicano, que en su caso es bastante pobre en grosor y con un bajo grado de entrecruzamientos entre las cadenas de glicano y es responsable de la rigidez y de la resistencia de la pared (formada por la membrana externa y el peptidoglicano). La membrana externa tiene la estructura típica de una membrana unitaria, formada por una bicapa lipídica, con proteínas, algunas de ellas formadoras de canales como las porinas, que acostumbran a formar trímeros dando lugar a un canal transmembrana responsable en parte de la permeabilidad de los

nutrientes; también contiene fosfolípidos y grandes cantidades de un lípido especial, el lipopolisacárido (LPS) (fig. 4).

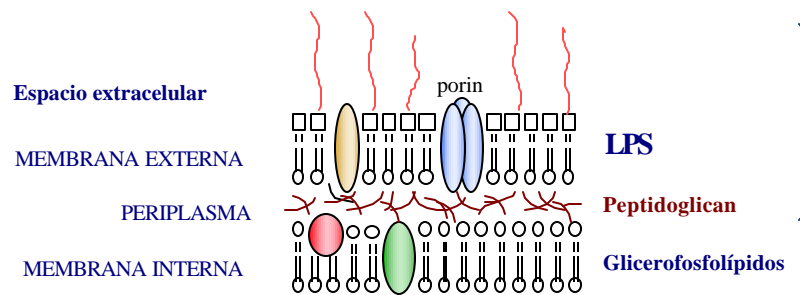


Fig. 4. Envuelta de las bacterias gram-negativas.

2.4.1. El lipopolisacárido (LPS)

El LPS se encuentra exclusivamente en la cara externa de la membrana, en lugar de los fosfolípidos. Desde un punto de vista químico es muy diferente a estos fosfolípidos de membrana, pero físicamente tiene propiedades similares, pues posee un extremo hidrófobo que se inserta en la zona hidrófoba de la membrana y otro hidrófilo situado en la parte externa; la composición química de este heteropolisacárido fosforilado varía según los grupos de bacterias y presenta un peso molecular medio de 10 kDa. Se trata de una molécula compleja, formada por tres regiones distintas:

- El lípido A, que es la región hidrófoba de anclaje a la membrana; está formada por seis o siete ácidos grasos, todos ellos saturados, unidos a un dímero fosforilado de glucosamina.
- La región central R, llamada también núcleo o 'corazón', está formada por una cadena corta de azúcares (oligosacárido) unida a un resto de la glucosamina del lípido A y a la cadena lateral O.
- La cadena lateral hidrófila O, conocida también como antígeno O, es responsable de la inmunogenicidad de los gram-negativos; está formada por muchas unidades repetidas de tetra- o pentasacáridos y varía de una cepa a otra; localizada en la parte más externa de la porción polisacárida, actúa como barrera entre el medio y el interior de la célula;

su fuerte carácter hidrofílico proporciona a la bacteria una gran resistencia frente a determinados mecanismos de defensa del huésped, como serían la fagocitosis leucocitaria y la actividad bactericida del complemento (Taylor, 1983); además, debido a su impermeabilidad, protege a la bacteria de la acción de varios agentes como la lisozima, la betalisisina y la proteína leucocitaria, muy tóxicos para los gram-positivos y también frente a las sales biliares y enzimas propios del tracto digestivo de los mamíferos, a los antibióticos hidrofóbicos como macrólidos, rifamicinas y actinomicina D y a los colorantes como eosina, azul de metileno y verde brillante.

El LPS es responsable de los fenómenos asociados a las infecciones de los gram-negativos cuando es liberado al medio (en pequeñas cantidades cuando están creciendo y en grandes cantidades cuando mueren), jugando un papel principal en la patogenicidad y virulencia de muchos gram-negativos, entre ellos *S. marcescens* (Palomar *et al.*, 1993) y también se ha visto que es capaz de inducir apoptosis en macrófagos (Valledor *et al.*, 2000).

2.5. OTROS PRODUCTOS EXTRACELULARES DE *Serratia marcescens*

S. marcescens es productora también de numerosas sustancias, algunas de las cuales pueden ser consideradas como factores de virulencia. Entre estos productos están la *serrawettina*, un biosurfactante que le ayuda en la colonización de superficies (Matsuyama, *et al.* 1986; Hines *et al.*, 1988), enzimas como las quitinasas, lipasas y las cloroperoxidasas (Hejazy & Falkiner, 1997), la HasA, proteína de unión a grupos *hemo* (Letoffe *et al.*, 1999) y la benzonasa, una endonucleasa comercializada (Meiss *et al.*, 1995; Johannes & Obe, 1994).

2.6. EL PRODIGIOSANO

Con el nombre de prodigiosano se ha descrito en la literatura rusa a un polisacárido obtenido de *S. marcescens*, probablemente un lipopolisacárido, al que le han atribuido cierta actividad antitumoral (Tishchenko & Guseva, 1987; Shevchenko, 1987; Guseva & Tishchenko 1989) y que ha sido utilizado también en el tratamiento de varias infecciones. Este compuesto no debe confundirse con la prodigiosina, con la que sólo comparte la raíz del nombre.

2.7. LA CÁPSULA DE *Serratia marcescens*

Curiosamente, en los años 60 le atribuyeron a *S. marcescens* propiedades antitumorales y se responsabilizó de este efecto a la cápsula, cuya producción se considera muy poco frecuente en el caso del género *Serratia* (Adams & Young, 1966).

3. EL CÁNCER

Bajo el término cáncer se agrupan un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una proliferación excesiva y descontrolada de las células que invaden y dañan tejidos y órganos, provocando finalmente la muerte del individuo. Actualmente es la segunda causa de muerte en el mundo desarrollado, donde una de cada cinco personas fallece como consecuencia de esta enfermedad (fig. 1). Las estadísticas muestran que esta enfermedad afecta cada año en España, uno de los países de Europa con menor incidencia de cáncer, a unas 150.000 personas de las cuales sólo una tercera parte sobrevivirá a la enfermedad.

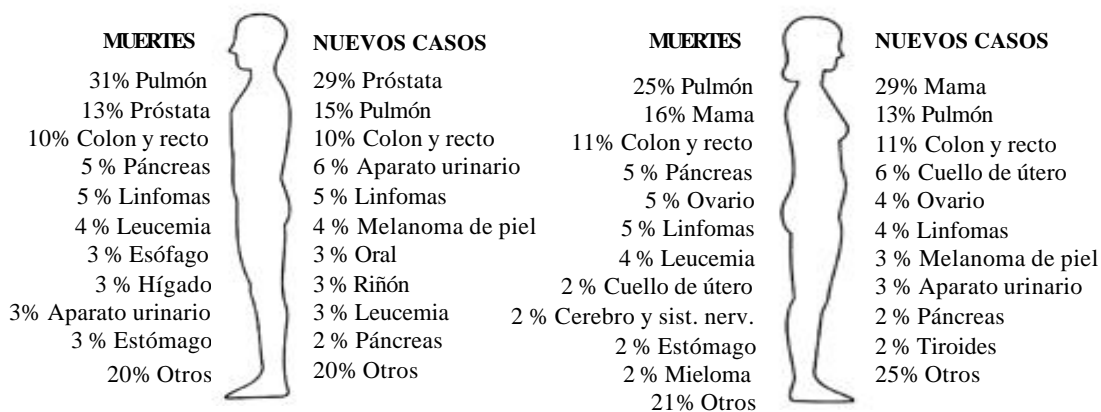


Fig. 1. Datos estadísticos de la *American Cancer Society* que reflejan la incidencia de nuevos casos de cáncer y la mortalidad producida por esta enfermedad en el año 1998 (Landis *et al.*, 1999).

El origen de los tumores se encuentra en la pérdida del control de una célula que adquiere mayor capacidad de proliferación e incluso pierde la capacidad de diferenciarse, como consecuencia de una mutación iniciadora o de la acumulación de varias mutaciones en proto-oncogenes, genes supresores de tumores, o en genes de reparación del DNA; a partir de aquí, la célula puede volverse más agresiva cada vez al seguir adquiriendo nuevas alteraciones. Estas mutaciones pueden deberse a múltiples causas, entre las que se encuentran las debidas a los carcinógenos, agentes externos que causan mutaciones en los genes responsables del control de la proliferación y de *no invasión* de la célula. El proceso acumulativo y secuencial que acompaña al desarrollo de las neoplasias guarda relación con un incremento no lineal de la incidencia de cáncer con la edad.

Un tumor *benigno* es aquel que está formado por un conjunto de células cancerosas sin capacidad invasora, permaneciendo por tanto en el lugar anatómico donde se han originado, mientras que un tumor *maligno* es el que está constituido por células cancerosas con capacidad invasiva y de dispersión a otros tejidos. La gravedad de esta enfermedad radica principalmente en la posible existencia de metástasis, tumor secundario originado por la diseminación de células cancerosas procedentes de un tumor primario, el formado en el tejido original.

En el ser humano se han reconocido y clasificado más de 100 tipos distintos de cánceres según su origen (cuadro 1). El 90% de los tumores son generados por células epiteliales de origen ectodérmico y endodérmico, denominados carcinomas; los de origen mesodérmico derivan de células del tejido conectivo o muscular y se llaman sarcomas; por último están los originados por células del torrente sanguíneo como las leucemias, linfomas y mielomas. La falta de tratamientos eficaces para los carcinomas radica en la gravedad de alguno de ellos, como los melanomas, que adquieren rápidamente la capacidad metastásica y son generalmente fatales.

| | ORIGEN | TUMORES REPRESENTATIVOS |
|------------------------|--|---|
| Derivados endodérmicos | Piel Glándula mamaria Neuronas Células de la glia Células de la retina Melanocitos | Carcinoma de las células basales Carcinoma de mama Neuroblastoma Glioblastoma Retinoblastoma Melanoma |
| Derivados mesodérmicos | Hueso Tejido fibroso Cartílago Músculo Vaso sanguíneo Células adiposas Eritrocitos Linfocitos | Osteosarcomas Fibrosarcomas Condrosarcomas Rabdomiosarcomas Hemangiosarcomas Liposarcomas Leucemia eritrocítica Leucemia linfocítica y linfoma |
| Derivados ectodérmicos | Vejiga urinaria Páncreas Colon Pulmón Tiroides Hígado | Carcinoma de vejiga Carcinoma de páncreas Carcinoma de colon Carcinoma de pulmón Carcinoma de tiroides Carcinoma hepático |

Cuadro 1. Ejemplos de tumores humanos según su origen.

3.1. LA TERAPIA ACTUAL CONTRA EL CÁNCER

Hasta el momento no existen tratamientos eficaces contra el cáncer. La incidencia y la mortalidad continúan aumentando a pesar de los avances logrados en las últimas décadas y de las campañas orientadas a la prevención y a la detección precoz de algunos cánceres, pues las metástasis siguen siendo las principales responsables del fracaso de los tratamientos aplicados. Son varios los motivos que explicarían este incremento constante del número de casos y la falta de tratamientos realmente curativos, como el aumento de la esperanza de vida, los malos hábitos alimenticios, factores ambientales (exposición excesiva al sol), el tabaco, etc. Por otro lado está la falta de especificidad de los agentes antitumorales; el tratamiento ideal es aquel que logra la muerte selectiva de las células tumorales y los fármacos anticancerosos de que se dispone hoy día destruyen a su vez muchas células sanas con la consiguiente aparición de efectos colaterales, lo que limita las dosis prescritas.

3.1.1. La cirugía

La cirugía tiene el objetivo de extirpar totalmente el tumor. Sigue siendo la mejor opción en la mayoría de los cánceres y se puede aplicar en combinación con la radioterapia, la quimioterapia y la hormonoterapia como tratamientos adyuvantes. Lamentablemente, su uso está limitado a unos cuantos tumores sólidos y su eficacia depende en gran parte de la existencia o no de metástasis.

3.1.2. La radioterapia

La radioterapia consiste en la irradiación con rayos X y rayos γ de las células malignas. Con su uso se pretende impedir la proliferación de las células y suele ir asociada a la cirugía. Es una terapia localizada que se fundamenta en la inducción de daños moleculares en las células al ser irradiadas. Las lesiones directas en el DNA son las realmente responsables del éxito, aunque no deja de ser una arma de doble filo puesto que estas lesiones también pueden inducir resistencias, principal inconveniente de esta terapia junto con los efectos secundarios que provoca.

3.1.3. La terapia antihormonal

La terapia antihormonal intenta evitar el efecto promotor tumoral de ciertas hormonas como son los estrógenos o los andrógenos, que inducen la proliferación de las células tumorales. Un ejemplo de su aplicación sería para el tratamiento de algunos cánceres de mama en los que se están utilizando fármacos que actúan sobre el receptor de los estrógenos (ER), ya sean agonistas parciales tipo tamoxifeno, o antagonistas puros como el ICI 182.780 y el ICI 164.384. De momento con esta terapia sólo se han conseguido efectos transitorios, además de presentar numerosos inconvenientes como son la inducción de tumores de endometrio, osteoporosis, resistencias, etc.

3.1.4. La quimioterapia

La quimioterapia se basa en el empleo de agentes químicos citotóxicos de los que se espera que actúen de forma selectiva sobre las células cancerosas, aunque la mayoría no lo consiguen. En el día de hoy son solamente unos 50 los fármacos que se están utilizando en quimioterapia, generalmente combinándolos con otras terapias para conseguir una mayor eficacia y disminuir el desarrollo de resistencias, al tiempo que reducir las dosis de cada uno a los límites aconsejables de su toxicidad, empleando muchas veces terapias distintas de forma consecutiva.

Estos fármacos se clasifican en dos grupos: los que actúan a nivel de síntesis del DNA y los que lo hacen sobre componentes citoplasmáticos esenciales para la división celular; parece ser que estos agentes causan lesiones en el DNA desencadenando la muerte celular por apoptosis (cuadro 2). Las células que tienen mutados genes implicados en la inducción de la apoptosis suelen ser más resistentes a este tipo de tratamientos (p.e. *p53*, *bcl-2*).

| Agente quimioterápico | Grupo | Mecanismo de acción |
|-----------------------|--|---|
| 5-fluorouracilo | Análogo de pirimidina Otros: 5-azacitidina, citarabina | Inhibidores de la síntesis de DNA |
| Fludarabina | Análogo de la adenosina Otros: pentostatina | |
| Metrotexato | Antagonista del ácido fólico | |
| Carmustina | Nitrosourea Otros: lomustina, clorozotocina | Alquilantes del DNA |
| Cisplatino | Derivado del platino Otros: carboplatino | |
| Ciclofosfamida | Mostaza nitrogenada Otros: ifosfamida, melfalán, clorambucilo | Se intercala en el DNA |
| Doxorubicina | Antibiótico (antraciclina) Otros: daunomicina, epirubicina, mitoxantona | Inhibidores de la Topoisomerasa II |
| Etopósido | Alcaloide vegetal, epipodofilotoxina Otros: tenipósido | |
| Mitomicina | Antibiótico Otros: bleomicina, actinomicina D | Se une al DNA e inhibe la replicación y transcripción |
| Vinblastina | Alcaloide Otros: vincristina | |

Cuadro 2: Principales agentes citotóxicos utilizados en la quimioterapia anticancerosa.

La quimioterapia se puede aplicar como terapia primaria frente a determinados cánceres como son algunos linfomas, tumor de Wilms, carcinoma microcítico de pulmón, etc.; también se administra en pacientes en los que no es posible aplicar otra terapia por lo avanzado de la enfermedad y en combinación con la cirugía (vejiga, mama, laringe, algunos sarcomas). Aunque para algunos cánceres se puede considerar que la respuesta es bastante favorable (testículo, linfomas, leucemias), existen otros muchos que no responden a estos tratamientos (melanoma, páncreas, etc.). La curación por quimioterapia se produce únicamente en un 15% de los tumores avanzados. De la clasificación de los cánceres humanos según su sensibilidad a la quimioterapia se deduce que en la mayoría de los cánceres más importantes, los avances son pequeños y en algunos casos prácticamente nulos (cuadro 3).

| | |
|--|--|
| <p>Respuesta aceptable: aumento de la supervivencia y algunas curaciones</p> | <p>Leucemia linfocítica aguda (niños) Linfoma de Burkitt Linfoma de Hodgkin Linfoma agresivo de tipo no Hodgkin (histocítico difuso, etc.) Tumor de Wilms Rabdomiosarcoma embrionario Sarcoma de Ewing Cáncer de testículo Coriocarcinoma gestacional</p> |
| <p>Respuesta moderada: efectos paliativos y probable aumento de la supervivencia</p> | <p>Leucemias: mielogénica aguda y crónica, linfocítica crónica Linfoma menos agresivo de tipo no Hodgkin (nodular) Neuroblastoma Carcinoma de mama Mieloma múltiple Carcinoma de endometrio Carcinoma microcítico de pulmón Osteosarcoma Carcinoma de ovario</p> |
| <p>Respuesta mínima: cánceres refractarios</p> | <p>Melanoma Carcinoma de hígado Carcinoma no microcítico de pulmón Carcinoma colorrectal Carcinoma de esófago Carcinoma gástrico Carcinoma de páncreas Carcinoma de cabeza y cuello Carcinoma de cuello uterino Carcinoma de vejiga</p> |

Cuadro 3. Clasificación de los cánceres humanos según su sensibilidad a la quimioterapia.

El principal problema al que nos enfrentamos al administrar tratamientos quimioterápicos es la aparición de resistencias, fenómeno que conduce a la pérdida de eficacia de dichos tratamientos e incluso en muchas ocasiones, las células llegan a desarrollar resistencia frente a múltiples drogas; la falta de respuesta al tratamiento anticanceroso puede ser debida a las características intrínsecas del tumor (ya sea porque las células cancerosas no absorban o no metabolizan convenientemente al fármaco, lo degraden rápidamente, etc.), siendo más frecuente que ésta aparezca durante el transcurso del tratamiento; un hecho importante en la radioterapia y la quimioterapia es que cuando no llegan a matar a las células tumorales, favorecen la aparición de células resistentes debido a la inducción de nuevas mutaciones.

La toxicidad de las drogas antineoplásicas es debida a su falta de especificidad, un factor limitante para su empleo. Como hemos visto, la mayoría de estas drogas actúan en fases específicas del ciclo celular, siendo activas sólo en aquellas células que estén en proceso de división. Estos anticancerosos son muy eficaces en tumores en los que existe un alto porcentaje de células en división, pero por contra son también diana los tejidos normales con un alto índice de proliferación como la médula ósea, los folículos pilosos o el epitelio intestinal. El conocimiento de la cinética del ciclo celular resulta hoy día esencial para el correcto uso de estas drogas antineoplásicas.

3.1.5. La terapia fotodinámica del cáncer

La terapia fotodinámica del cáncer (PDT) o fotoquimioterapia consiste en la destrucción del tejido neoplásico mediante el uso de luz y un fotosensibilizador en presencia de oxígeno. Este tipo de terapia puede aplicarse para tratar tumores pequeños o como complemento a la cirugía en tumores mayores. La PDT se basa en el fenómeno de la fotosensibilización: cuando una molécula absorbe energía lumínica pasa al estado excitado, pudiendo ceder su energía de activación a otra molécula; en este caso, el oxígeno pasa del estado fundamental triplete al estado excitado singlete, que es una especie muy tóxica para las células (Foote, 1968; Foote, 1984).

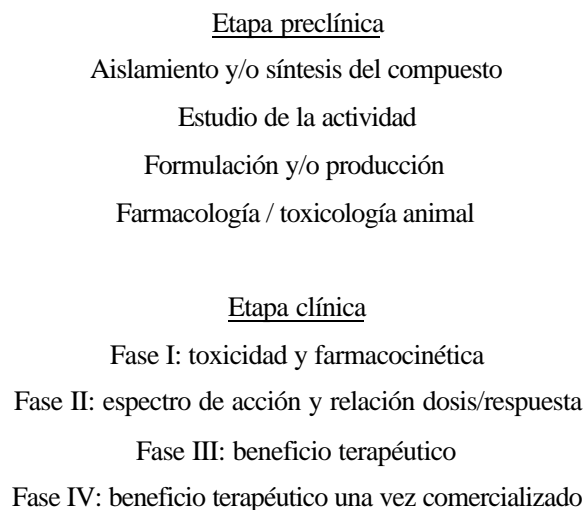
Las cualidades ideales de un fotosensibilizador son: 1) que tenga propiedades localizadoras de tumores; 2) una baja toxicidad a oscuras; 3) que absorba la luz y a ser posible en la zona roja del espectro (hacia $\lambda_{\text{max}}=600-800\text{nm}$) ya que a λ altas hay una mayor transmitancia de los tejidos biológicos, lográndose mejores resultados a igual dosis y potencia de luz a la vez que permite el tratamiento de tumores menos accesibles y/o más grandes; 4) que sea químicamente estable. La mayoría de los fotosensibilizadores utilizados hoy en día no cumplen con todas estas características, de forma que los estudios actuales van dirigidos a mejorar estas propiedades, principalmente la selectividad.

Entre los fotosensibilizadores más utilizados en la PDT están las porfirinas, las ftalocianinas y las clorinas modificadas, todas ellas tetrapirroles circulares; algunas de ellas presentan cierta selectividad por los tejidos tumorales, pero de momento ésta no es total (Dahlman *et al.*, 1983).

El modo en que se aplica esta técnica es mediante la inyección del fotosensibilizador, teniéndose que dejar al paciente un tiempo prudencial a oscuras, normalmente un par de días, para que el fármaco se concentre en el tumor y evitar así la fotosensibilización del paciente; unas horas después de irradiar el tumor con la dosis apropiada de luz se habrán causado importantes daños en el tejido tumoral que llevarán a su muerte. Como fuente de luz se puede utilizar un láser, con la ventaja de que puede aplicarse directamente sobre el tumor con la ayuda de un catéter unido a fibra óptica.

3.2. ETAPAS PARA EL DESARROLLO DE UN FÁRMACO

Cualquier posible agente terapéutico deberá pasar por una serie de pasos antes de poder determinarse su utilidad como tal. De todas las moléculas que son testadas, sólo una minoría llegará al final del estudio. Los pasos a seguir en la investigación de nuevos candidatos de origen natural o de síntesis han sido resumidos en el siguiente cuadro (cuadro 4):



Cuadro 4: Etapas del desarrollo de nuevos fármacos.

OBJETIVOS

El objetivo central de esta tesis ha sido la caracterización y purificación del principio activo con actividad apoptótica presente en el extracto de *Serratia marcescens* y la caracterización de dicha actividad apoptótica específica, responsable de su interés potencial como sustancia antitumoral.

A partir de una serie de ensayos previos comprobamos que el sobrenadante de *Serratia marcescens* obtenido tras la centrifugación de un cultivo en medio PG líquido de 48 horas tenía un efecto tóxico sobre la línea celular cancerosa Jurkat. Esta observación nos hizo plantearnos como hipótesis de trabajo que dicho extracto bacteriano debía contener por lo menos una sustancia responsable de dicha toxicidad.

Con el propósito de desarrollar este trabajo, el objetivo central antes mencionado fue dividido en tres más concretos:

1. Estudio de la viabilidad de líneas celulares normales y tumorales de diversa procedencia y origen tratadas con el sobrenadante de *S. marcescens* 2170.
2. Análisis del modelo de muerte celular inducido por dicho extracto, apoptosis y/o necrosis celular, mediante la tinción de la cromatina con los fluorocromos Hoechst 33342 y yoduro de propidio y el análisis del fraccionamiento del DNA.
3. Purificación del compuesto antitumoral a partir del extracto de *S. marcescens*.

RESULTADOS

1. ANTECEDENTES

Las razones que nos llevaron a estudiar el efecto del sobrenadante de *Serratia marcescens* en diferentes líneas celulares y a caracterizar el principio activo presente en dicho sobrenadante con una supuesta actividad antitumoral fueron las evidencias experimentales descritas por los Dres. M^a Carmen Abrahantes y Jesús Reyes del Centro de Genética Molecular y Biotecnología de la Habana (Cuba). Este grupo obtuvo, como resultado del enfrentamiento entre una cepa ambiental de *S. marcescens* y unas células tumorales implantadas en un huésped ratón (animales xenotransplantados) un mutante de *S. marcescens* que había adquirido la propiedad de producir y excretar al medio un nuevo agente, capaz de inducir la muerte de las células tumorales sin comprometer la vida del huésped; con el sobrenadante obtenido del cultivo de este mutante al que llamaron *S. marcescens* MG, ensayaron su efecto en la viabilidad de varias líneas celulares tumorales y normales así como en ratones BALB/c con tumores ascíticos inducidos; los resultados que obtuvieron evidenciaban que dicho sobrenadante bacteriano contenía alguna sustancia con actividad antitumoral. En la búsqueda del agente citotóxico, habían llegado a semipurificar una proteína de 45 kDa (a la que llamaremos p45) que creían responsable de dicha actividad y otra de 15 kDa menos efectiva; en ese proceso descartaron como candidatos, tras ser semipurificados y ensayada su actividad, un antibiótico con cierta actividad antiproliferativa pero menor que la presentada por p45 y al pigmento prodigiosina, característico de esta bacteria. Las muestras que contenían las proteínas semipurificadas p15 y p45 las llamaron respectivamente m1 y m2, y al igual que el sobrenadante tenían un efecto antitumoral, siendo m2 más efectiva que m1.

Con este grupo colaboramos en la caracterización de la proteína de 45 kDa a partir de tres muestras que nos fueron proporcionadas:

- m1: muestra que contenía a la p15 semipurificada, conservada con albúmina de suero humano (HSA)
- m2: correspondiente a la p45 semipurificada
- m3: sobrenadante concentrado del mutante *S. marcescens* MG

2. ESTUDIOS PREVIOS

2.1. PRIMERAS EVIDENCIAS

Con el objeto de identificar la proteína de 45 kDa, en primer lugar estudiamos el patrón proteico de m1, m2 y m3. Para ello hicimos una electroforesis SDS-PAGE con las tres muestras, utilizando geles del 15% de acrilamida que posteriormente teñimos con sales de plata o con azul de Coomassie. En un primer gel pudimos ver que la muestra m1 contenía tal cantidad de albúmina que impedía la identificación de sus bandas y además interfería con los carriles adyacentes, de forma que obtamos por prescindir de esta muestra. En un segundo gel se corrieron las muestras m2 y m3 y observamos que en los carriles correspondientes a m2 habían varias proteínas, entre ellas, obviamente, una de 45 kDa que además era mayoritaria, y otras de 60, 30 y 15 kDa, aunque las dos últimas no se veían en los carriles de m3, donde sí aparecía una proteína de 45 kDa mayoritaria.

En segundo lugar comprobamos el efecto de m2 y m3 sobre la viabilidad celular de la línea Jurkat, procedente de una leucemia de linfocitos T; este estudio lo hicimos a través del ensayo del MTT, con células expuestas a dichas muestras durante 24 y 48 horas. El resultado que obtuvimos fue que ambas muestras tenían un efecto citotóxico en Jurkat, siendo la bajada en el número de células viables más acusada en las células tratadas con m3 (fig.2.1 A y B).

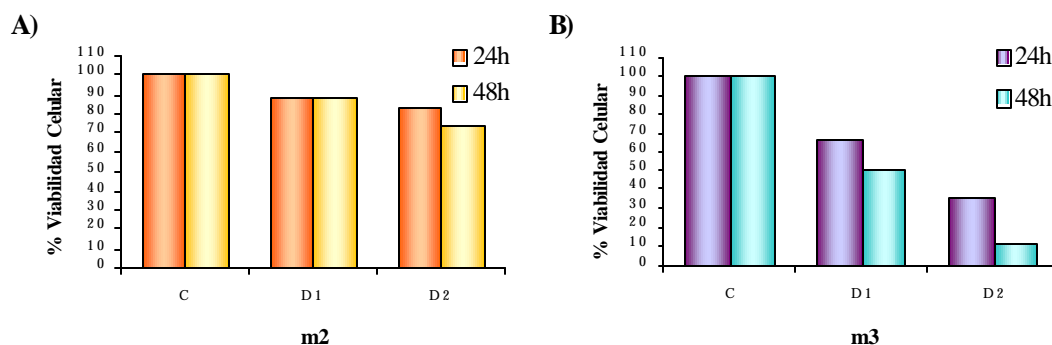


Fig.2.1. Efecto de las muestras m2 y m3 sobre la viabilidad de las células Jurkat. Para cada condición, 20.000 células fueron incubadas durante 24 y 48 horas: A) en ausencia (células control, C) o en presencia de 30 y 60 $\mu\text{g/ml}$ (D1 y D2) de m2; B) células sin droga (C) o incubadas con 20 y 60 $\mu\text{g/ml}$ (D1 y D2) de m3.

2.2. ENSAYOS REALIZADOS CON EL SOBRENADANTE DE VARIAS CEPAS DE *Serratia marcescens*

La idea inicial era que p45 era una proteína nueva, exclusiva del mutante *S. marcescens* MG. Para comprobar este hecho diferencial del mutante, quisimos comparar el efecto citotóxico del sobrenadante de MG (m3) con los producidos por los sobrenadantes obtenidos de otras cepas de *S. marcescens*, la 2170 y la ATCC 274.

2.2.1. Obtención de las muestras

Las muestras utilizadas en estos ensayos fueron obtenidas a partir de cultivos puros incubados en PG durante 48 horas: tras centrifugar el cultivo, el sobrenadante era filtrado y concentrado, obteniendo así una fracción proteica concentrada del orden de cien veces. A estas muestras las llamamos 'CS' (*concentrated sample*) (para más detalles ver la sección *Materiales y Métodos*). Dado que al principio de nuestra investigación pensábamos que la molécula responsable del efecto citotóxico era una proteína, utilizamos la concentración de proteína para cuantificar la cantidad de muestra CS empleada en los ensayos.

La muestra m3 que estábamos ensayando había sido obtenida siguiendo este mismo procedimiento, por tanto, según la nomenclatura utilizada en nuestro laboratorio, se trataría de una muestra CS-MG.

2.2.2. Estudios de la viabilidad y de la fragmentación del DNA en la línea celular Jurkat tratada con las muestras procedentes de *Serratia marcescens* 2170 y ATCC 274

Con la idea de determinar si las muestras CS-2170 y CS-274 tenían el mismo efecto que la CS-MG sobre células en cultivo estudiamos su actividad a través del ensayo del MTT en Jurkat, a distintos tiempos (de 4 a 48 horas), y de esta forma comprobamos que ambas muestras inducían una bajada en el número de células viables, efecto comparable en ambos casos al observado con la muestra CS-MG.

Al mirar al microscopio invertido las placas en las que se hacían los ensayos de viabilidad observamos que el aspecto de las células tratadas era diferente del de las células control; la mayoría de las células tratadas tenían una forma totalmente esférica y muchas presentaban el núcleo fragmentado y formaban los característicos cuerpos apoptóticos (fig.2.2).

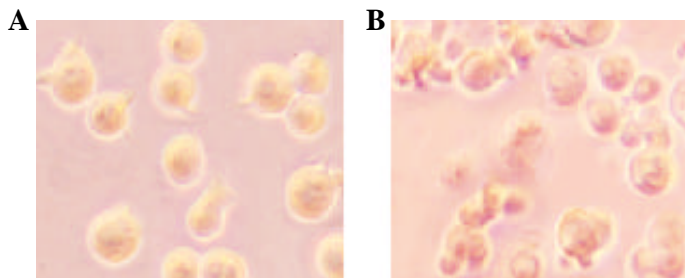


Fig.2.2. Aspecto de las células Jurkat observado al microscopio invertido con contraste de fases. A) Células control. B) Células tratadas con 5 µg/ml de CS-2170 durante 16 horas.

Con el fin de comprobar que nos encontrábamos frente a un fenómeno apoptótico hicimos el ensayo de la fragmentación del DNA con células Jurkat sin tratar (C-) o incubadas con 5 µg/ml de CS-2170 o CS-274 durante 24 horas; el DNA de bajo peso molecular obtenido fue resuelto por electroforesis en un gel de agarosa y una vez teñido con bromuro de etidio, vimos bajo la luz UV una escalera de DNA en el carril de las células tratadas, indicativo de que ambas muestras eran inductoras de la apoptosis (fig.2.3).

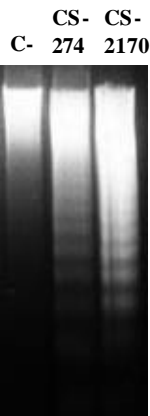


Fig.2.3. El sobrenadante de *S. marcescens* 2170 y ATCC 274 induce apoptosis en las células Jurkat. Estudio de la fragmentación del DNA realizado tras tratar las células con 5 µg/ml de CS-274 o CS-2170 durante 24 horas. El control negativo (C-) se hizo con células incubadas en las mismas condiciones, pero sin droga.

Estas observaciones evidenciaban que la citotoxicidad inducida por el extracto de *S. marcescens* MG no era exclusiva de dicho mutante, sino que incluso podría tratarse de una propiedad común a la especie *S. marcescens*.

2.2.3. Estudio del patrón proteico del extracto de *Serratia marcescens* 2170 y ATCC 274

Habiéndose observado que las muestras CS-2170 y CS-274 inducían la apoptosis, quisimos estudiar su patrón proteico, compararlo con el de m2 y m3 y buscar proteínas comunes a todos.

Para ello hicimos una electroforesis SDS-PAGE con las muestras m2 y m3 (CS-MG) y CS-2170 y CS-274, teñimos el gel con azul de Coomassie y comprobamos que la banda correspondiente a p45 aparecía lógicamente en m2 y en m3, pero también en las otras dos muestras CS (fig.2.4).

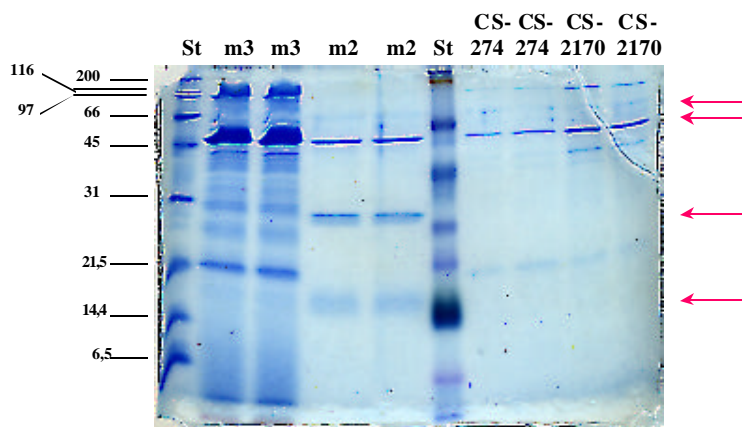


Fig. 2.4. Patrón proteico de las muestras de origen bacteriano m2, m3, CS-2170 y CS-274. Las muestras fueron resueltas por electroforesis SDS-PAGE en un gel del 15% de acrilamida que posteriormente fue teñido con azul de Coomassie. Las muestras 'St' se corresponden a los estándares de peso molecular (en el carril nº 6 se cargó un estándar preteñido).

Como las dos muestras obtenidas en nuestro laboratorio, CS-2170 y CS-274, eran igualmente activas en la inducción de la apoptosis decidimos centrarnos en el estudio de la cepa *S. marcescens* 2170.

2.2.4. Estudio comparativo del efecto de la muestra CS-2170 en las líneas celulares Jurkat y NRK

Para ver si existían diferencias en cuanto a la sensibilidad de células cancerosas y no cancerosas frente al tratamiento con el extracto de *S. marcescens* 2170 (CS-2170) estudiamos en las líneas Jurkat y NRK (fibroblastos normales de riñón de rata) los cambios en la viabilidad, la fragmentación del DNA y en la morfología de las células (con los fluorocromos Hoechst 33342 y yoduro de propidio) al ser tratadas con dicha muestra.

Con el ensayo del MTT observamos una mayor disminución del número de células viables en Jurkat; la IC₅₀ de cada una de las líneas obtenida a las 8 horas de tratamiento fue de 1,5 µg/ml en Jurkat y 5 µg/ml en NRK; esta diferencia entre ambas del orden de tres veces indicaba que la línea cancerosa Jurkat era más sensible que la línea no cancerosa NRK (fig.2.5).

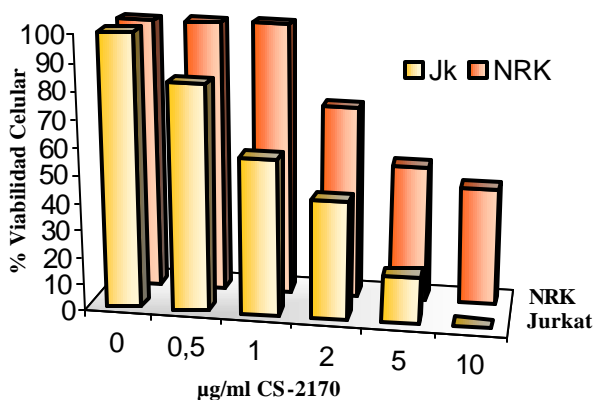


Fig.2.5. Efecto de la muestra CS-2170 en las líneas Jurkat y NRK. Estudio de la viabilidad celular por el ensayo del MTT; las células fueron tratadas con distintas cantidades de CS-2170 (de 0 a 10 µg/ml) durante 8 horas; el valor 100% de viabilidad corresponde al control negativo (células sin tratar).

También estudiamos si la muestra CS-2170 era capaz de inducir la apoptosis en ambas líneas a través del ensayo de la fragmentación del DNA genómico y el resultado fue que para poder detectar el patrón en escalera en las células NRK la cantidad de droga tenía que ser mayor que en el caso de Jurkat.

Del mismo modo observamos los cambios morfológicos entre las células control y las tratadas con el CS-2170 al ser teñidos los núcleos con el colorante Hoechst 33342, que se intercala en la cromatina. Las diferencias entre las células control y las tratadas con el extracto fueron que, mientras que en las células no tratadas los núcleos presentaban un aspecto normal en las dos líneas celulares, la morfología de los núcleos de las células Jurkat tratadas era muy diferente: se observaba condensación nuclear y en muchos casos una fragmentación en pequeños cuerpos localizados en el interior de la célula; a las mismas dosis, los cambios en NRK eran menos aparentes: veíamos también los núcleos condensados pero no fragmentación; para poder detectar esta rotura del núcleo tuvimos que tratar a estas células con concentraciones mayores de CS-2170, estando en concordancia con los resultados obtenidos en el estudio de la viabilidad y de la fragmentación del DNA. Al utilizar conjuntamente Hoechst y yoduro de propidio vimos en algún caso de apoptosis secundaria, pero la proporción de necrosis era similar en las células tratadas y en las control para las dos líneas.

3. CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO CON ACTIVIDAD APOPTÓTICA

3.1. SEPARACIÓN EN COLUMNA POR GEL-FILTRACIÓN DE UNA MUESTRA CS-2170

Con el objeto de caracterizar a la proteína sintetizada por *S. marcescens* 2170 responsable del efecto apoptótico pasamos la muestra CS-2170 por una columna Hiprep[®] Sephacryl S-200 de alta resolución y de esta forma obtuvimos 95 fracciones de interés; con estas fracciones hicimos varios estudios, como el de ensayar su efecto sobre la viabilidad celular, su capacidad de inducir la fragmentación del DNA y el estudio de su patrón proteico por electroforesis en geles de acrilamida.

Al testar el efecto de las distintas fracciones sobre la viabilidad celular vimos que sólo las comprendidas entre F27 y F38 inducían una bajada en la viabilidad celular y de ellas, las fracciones F33 y F34 eran las más activas (fig.3.1).

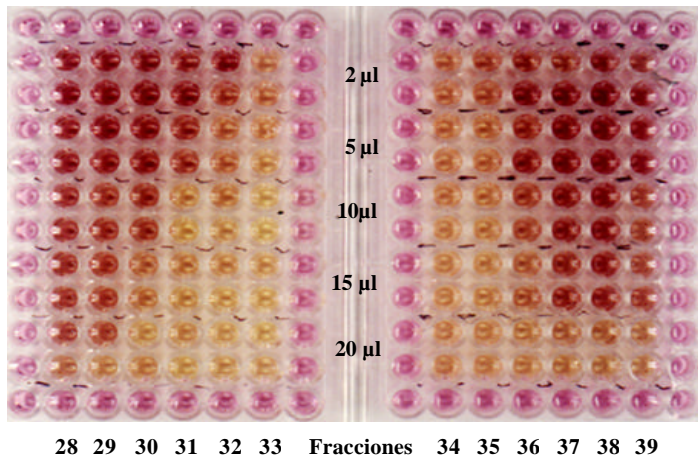


Fig.3.1. Ensayo del MTT realizado con las fracciones F27-F38 en Jurkat. En esta figura se muestran las placas de micro-títer correspondientes a un ensayo del MTT hecho tras enfrentar 20.000 células Jurkat a 2, 5, 10, 15 y 20 µl de las fracciones que se habían obtenido por separación en columna de un extracto bacteriano, durante 4 horas; cada dosis fue probada por duplicado. El color morado se corresponde al derivado de formazán que se obtiene por la acción oxidante mitocondrial sobre el MTT, siendo su intensidad proporcional a la cantidad de células viables presentes en el cultivo.

Con el estudio de la fragmentación del DNA hecho con las muestras F33 y F34 comprobamos que el efecto citotóxico de ambas fracciones se producía a través de la inducción de apoptosis (fig.3.2).

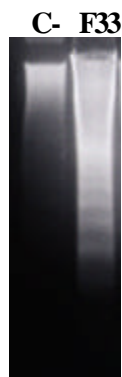
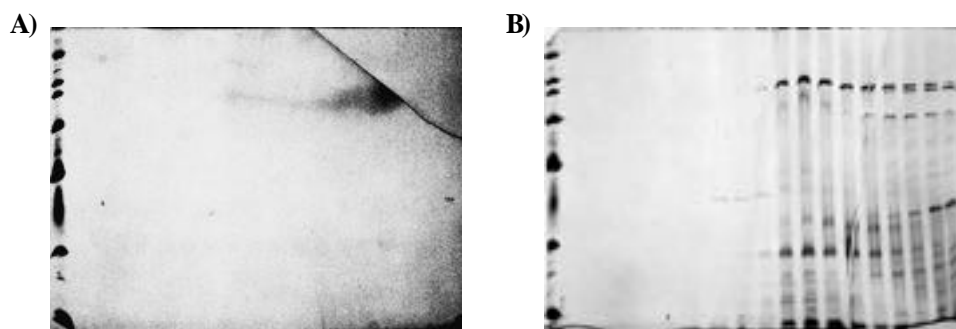


Fig.3.2. La fracción F33 obtenida a partir de un extracto bacteriano induce apoptosis en las células Jurkat. Ensayo de la fragmentación del DNA realizado con células Jurkat no tratadas (C-) o tratadas con 10 μ l/ml de F33 durante 7 horas.

A través del estudio del patrón proteico de las 95 fracciones por electroforesis en geles de acrilamida teñidos con plata observamos una serie de proteínas de 60, 30 y 15 kDa, exclusivas de las fracciones F27-F38 (con las que habíamos detectado un descenso sobre la viabilidad celular) que además eran mayoritarias en las muestras F33 y F34, las que habían mostrado tener una mayor actividad citotóxica (fig.3.3 A-G).



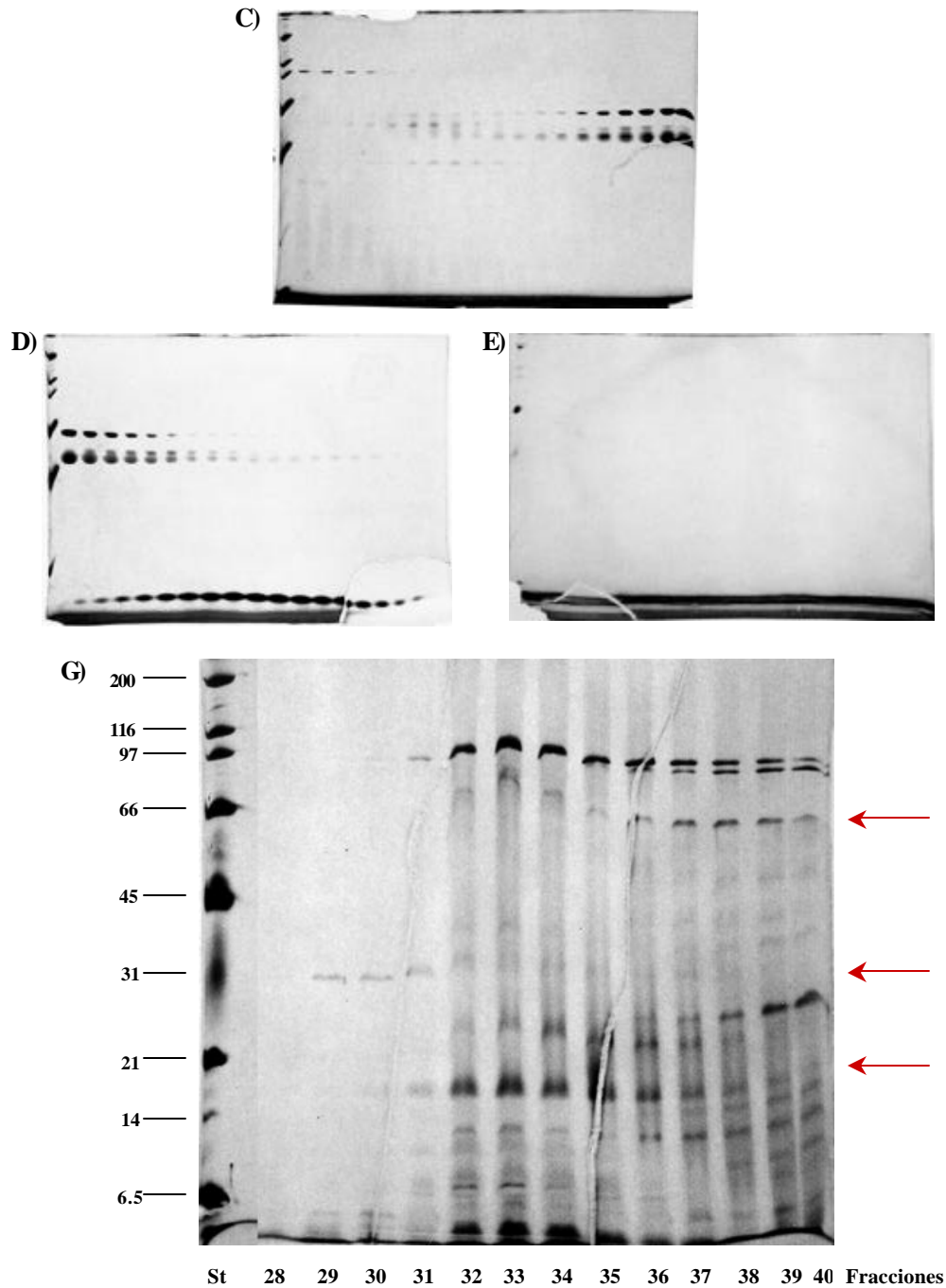


Fig.3.3. Patrón proteico de las fracciones F3-F95 obtenido tras hacer una electroforesis en geles del 15% de acrilamida y teñirlos con sales de plata. (A-E) Geles correspondientes a las fracciones: A) de F3 a F21; B) de F22 a F40; C) de F41 a F59; D) de F60 a F78; E) de F79 a F95; G) región ampliada del gel C correspondiente a las fracciones F28-F40 y en el que aparecen señaladas con flechas las proteínas exclusivas de las fracciones citotóxicas que además son mayoritarias en F33 y F34. En todos los geles se cargó un carril correspondiente al estándar de peso molecular (St).

Seguramente, muchos adelantos en ciencia se han producido como consecuencia de algún hecho fortuito; en nuestro caso podemos afirmar que nuestra línea de investigación sufrió un giro a raíz de uno de uno de estos hechos. Un día en el que repetimos la prueba del MTT y la electroforesis en geles de acrilamida con las distintas fracciones nos encontramos con lo siguiente: mientras que el resultado del estudio de la viabilidad coincidía con los anteriormente realizados (las fracciones F33 y F34 eran las más activas de entre F27-F38, las únicas con actividad citotóxica), al teñir los geles de acrilamida con la solución de plata observamos que se había producido la degradación proteica de las muestras (fig.3.4).

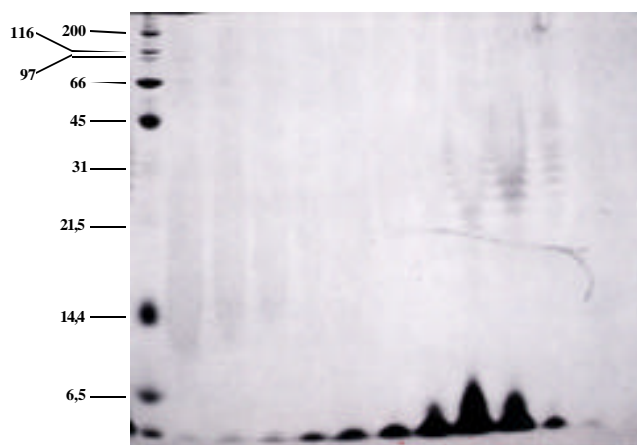


Fig.3.4. Gel de acrilamida teñido con plata correspondiente a las fracciones F28-F40. Mientras que el estándar de peso molecular se había resuelto correctamente (carril de la izquierda), todas las fracciones testadas se habían degradado (el resto).

Estos resultados indicaban que la molécula responsable del efecto apoptótico no tenía naturaleza proteica. A raíz de este hecho diseñamos una serie de ensayos con el objetivo de poder confirmar esta nueva hipótesis.

3.2. TRATAMIENTOS PARA DESNATURALIZAR E HIDROLIZAR LAS MUESTRAS CON NATURALEZA PEPTÍDICA

Tras juntar las dos fracciones más activas para así tener muestra suficiente (muestra a la que llamamos F33/34), varias alícuotas de ésta fueron sometidas a distintos tratamientos enzimáticos y térmicos con el objeto de desnaturalizar y poder descartar definitivamente la naturaleza proteica del principio activo buscado.

Distintas alícuotas de F33/34 fueron incubadas en presencia de proteasas (tripsina, EDTA y proteasa V8) solas o combinadas entre ellas, durante 5 horas a 37°C y entonces, previamente a ser testadas por los ensayos del MTT y de la fragmentación del DNA se les añadió un cóctel de inhibidores de proteasas (ver 'Materiales y métodos'). El resultado de estas pruebas fue que a pesar estos tratamientos desnaturizantes la muestra F33/34 conservaba la actividad apoptótica (fig. 3.6.A).

También sometimos a F33/34 a tratamientos térmicos. Las condiciones probadas fueron las de incubar la muestra a 37°C durante 5 horas, a 65°C durante 45 minutos y a 100 °C durante 15 minutos; a continuación testamos estas muestras por viabilidad y por el ensayo de la fragmentación del DNA (fig.3.5. A y B).

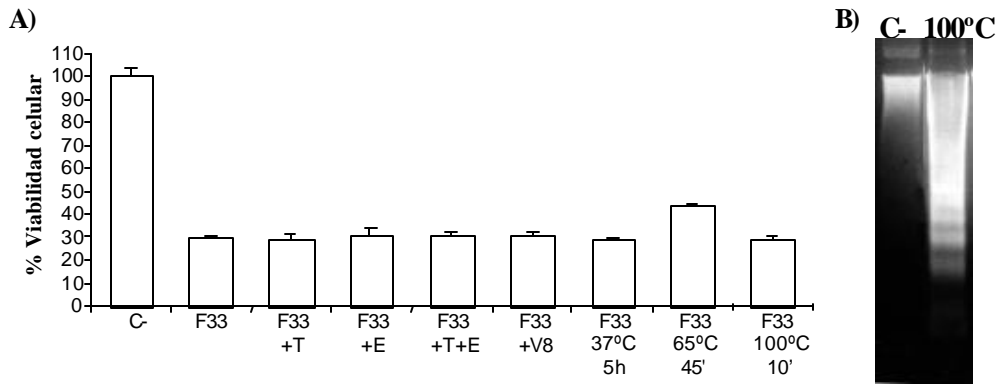


Fig.3.5. Actividad de la muestra F33/34 determinada en Jurkat, después de distintos tratamientos enzimáticos y térmicos. A) Efecto de F33/34 tras ser sometida a distintos tratamientos desnaturizantes con proteasas o con calor con el objeto de desnaturizar las proteínas y a los péptidos presentes en la muestra; en el estudio de la viabilidad celular hecho con la muestra F33/34 tratada con las distintas proteasas se tomó como control negativo a células tratadas con los mismos enzimas e inhibidores. B) Estudio del fraccionamiento celular realizado con una fracción de F33/34 que había sido incubada a 100°C durante 15 minutos (100°C); el primer carril se corresponde a células sin tratar (C).

Otra prueba fue la de tratar la muestra F33/34 con carbón activo; este ensayo fue pensado para eliminar la fracción proteica de la muestra al quedar absorbida por el carbón activo. Tras precipitar el carbón activo por centrifugación comprobamos que el sobrenadante seguía manteniendo las propiedades citotóxicas de la fracción madre mediante la prueba del MTT.

Paralelamente también hicimos algunas pruebas con la muestra CS-2170, como p.e. los ensayos enzimáticos y térmicos explicados anteriormente, obteniendo el mismo resultado: el extracto CS-2170 seguía induciendo la apoptosis a pesar de los distintos tratamientos aplicados.

Otro experimento fue el de tratar la muestra CS-2170 con un 10% de ácido tricloroacético (TCA) con el objeto de obtener un precipitado formado esencialmente por proteínas; una vez resuspendido este sedimento en PBS estudiamos su capacidad de inducir apoptosis a través del estudio de la fragmentación del DNA (fig.3.6); el resultado que obtuvimos fue que esta fracción proteica no inducía apoptosis.

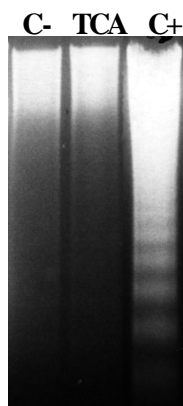


Fig.3.6. Estudio de la capacidad de inducir apoptosis del extracto proteico obtenido por precipitación con TCA a partir del sobrenadante de *S. marcescens* 2170. El ensayo de la fragmentación del DNA se hizo con Jurkat (3×10^6 células /3ml) no tratadas (C-) o tratadas con 20 μ g de muestra precipitada con TCA (TCA); como control positivo utilizamos células tratadas con 20 μ g de CS-2170 (C+). El tiempo de incubación fue de 7 horas.

En una precipitación con TCA, por tratarse de un procedimiento realizado en medio ácido, se favorece el que se deshagan las uniones inespecíficas entre moléculas como podría ser la de un pigmento con alguna proteína (Goldschmidt & Williams, 1968); esto explicaría por qué el sedimento obtenido después de centrifugar una muestra CS-2170 tratada con TCA tenía actividad apoptótica. Por el contrario, una muestra CS es obtenida al concentrar las proteínas de peso molecular superior a 8 kDa con la ayuda de un filtro Centricon[®] y con ellas también pueden quedar retenidas otras moléculas que se asocien a ellas, lo que explicaría por qué con una muestra CS se puede inducir la apoptosis.

Los resultados de los distintos ensayos que acabamos de explicar nos sirvieron para descartar la naturaleza peptídica de la sustancia con actividad apoptótica presente en el extracto de *S. marcescens* 2170.

El siguiente objetivo que nos planteamos fue el de caracterizar la molécula con actividad apoptótica sintetizada por esta bacteria. Para ello seguimos una serie de pasos, entre ellos el estudiar la implicación del lipopolisacárido (LPS) de *S. marcescens* en la inducción de la apoptosis.

3.3. IMPLICACIÓN DEL LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO EN LA APOPTOSIS

El LPS es una endotoxina que forma parte de la membrana externa de las bacterias gram-negativas. Es sabido que el LPS es inductor de la apoptosis (Valledor *et al.*, 2000); para poder descartar que el efecto apoptótico inducido por el extracto CS-2170 (obtenido a partir del cultivo de *S. marcescens* 2170) fuese debido a la presencia de LPS en la muestra lo que hicimos fue estudiar la capacidad de inducir apoptosis de una muestra CS obtenida a partir del cultivo en medio PG líquido de una cepa mutante, *S. marcescens* NR1, que presenta un LPS incompleto carente del antígeno O, región responsable de la inmunogenicidad de los gram-negativos. Esta muestra CS-NR1 fue testada a través del ensayo de la fragmentación del DNA y de esta forma comparamos su capacidad de inducir la apoptosis con la del LPS puro (proveído por Sigma). El resultado fue que ambas muestras inducían la fragmentación del DNA (fig.3.7) y por tanto pudimos concluir que el LPS de *S. marcescens* 2170 no era responsable de la apoptosis que estábamos estudiando.



Fig.3.7. Fragmentación del DNA inducida por CS-NR1 y por el LPS. Células Jurkat fueron incubadas en ausencia (C-) o en presencia de 100 ng/ml LPS (LPS) o 10 µg/ml CS-NR1 (CS-NR1) respectivamente durante 16 horas; en cada caso, el DNA de las células fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa.

3.4. FRACCIONES PIGMENTADAS DE ROJO

Sorprendentemente, nos dimos cuenta al mirar los eppendorfs que contenían las diferentes fracciones sobre una superficie blanca que los correspondientes a las fracciones activas (F27-F38) tenían una coloración ligeramente rosada, siendo los de F33 y F34 los que presentaban una mayor intensidad en el color.

S. marcescens es una bacteria cromófora que sintetiza un pigmento rojo conocido como prodigiosina. En un principio habíamos descartado a este pigmento como posible agente apoptótico (ver '*Antecedentes*', pág. 59), pero una vez resuelta la hipótesis inicial a favor de que la sustancia apoptótica buscada no era de naturaleza peptídica, lo único que tenían en común las fracciones activas era la pigmentación que coincidía con el color característico de la prodigiosina. Puesto que estas fracciones se habían obtenido a partir del concentrado CS-2170 era evidente que la prodigiosina, a pesar de su pequeño peso molecular (323,4), quedaba retenida por los filtros de concentración Centricon[®] utilizados en el proceso de obtención de las muestras CS y esto podría ser posiblemente debido a que se asociaba a alguna proteína de peso molecular mayor a 8 kDa, que es el tamaño de poro de estos filtros.

3.5. NUEVA HIPÓTESIS: EL PIGMENTO DE *Serratia marcescens*, MOLÉCULA INDUCTORA DE LA APOPTOSIS

El hecho de que las fracciones F27-F38 tuviesen un color rosado sugería la posibilidad de que dicho pigmento estuviese relacionado con la actividad citotóxica que estábamos estudiando. Por ello nos planteamos una nueva hipótesis sobre la que trabajar: el pigmento (posiblemente prodigiosina) como posible inductor de la apoptosis.

3.6. ESTUDIOS REALIZADOS CON LOS EXTRACTOS PROCEDENTES DEL CULTIVO DE CEPAS DE *Serratia marcescens* MUTANTES EN LA SÍNTESIS DE LA PRODIGIOSINA

Para confirmar esta nueva hipótesis estudiamos la capacidad de inducir apoptosis de tres cepas de *S. marcescens* deficientes en la biosíntesis de prodigiosina, conocidas como OF, WF y 933; ninguno de estos mutantes es capaz de completar la síntesis de la prodigiosina, obteniendo en cada caso diferentes precursores de este pigmento (ver 'Introducción', pág. 37 (fig. 2), donde se muestra el proceso de síntesis de la prodigiosina seguido por *S. marcescens* y se señalan los precursores obtenidos por estos mutantes). Brevemente apuntaremos que el mutante OF llega a formar el compuesto norprodigiosina, tripirrol que se diferencia de la prodigiosina únicamente en que posee un grupo hidroxil en vez de un metoxi; el mutante 933 sintetiza el bipirrol MBC, mientras que con mutante WF se puede obtener el monopirrol MAP.

El efecto de las muestras CS obtenidas a partir del cultivo de estos mutantes (a las que llamamos CS-OF, CS-933 y CS-WF) fue determinado a través del estudio de la viabilidad celular y de la fragmentación del DNA. Los resultados obtenidos con el ensayo del MTT mostraron que sólo la muestra procedente de *S. marcescens* OF inducía una bajada significativa en la viabilidad de forma dosis-dependiente, mientras que las muestras procedentes de los mutantes WF y 933 no mostraron actividad citotóxica (fig.3.8.A). Con el estudio de la fragmentación del DNA sólo detectamos apoptosis en las células tratadas con CS-OF (fig.3.8.B).

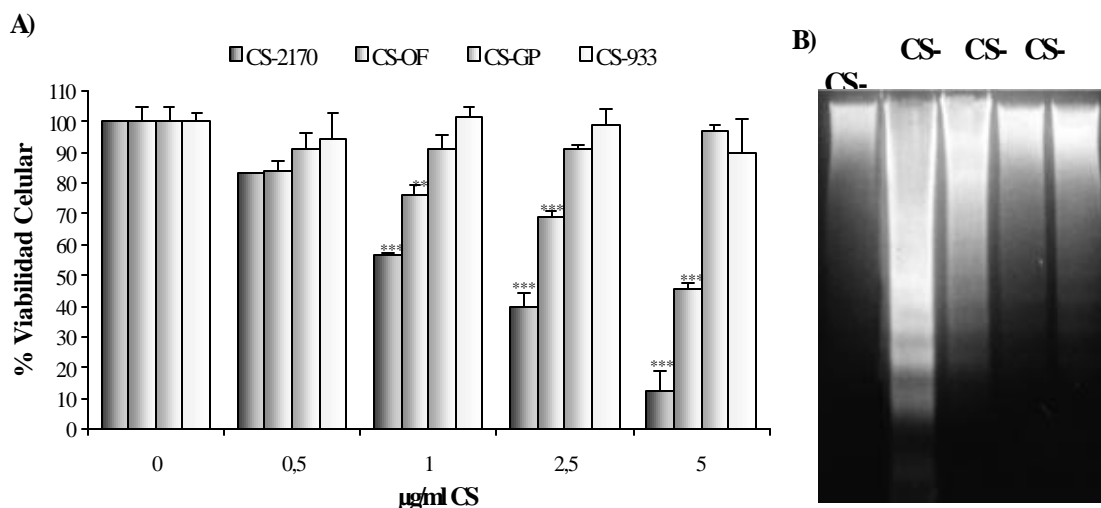


Fig.3.8. Capacidad de los mutantes *S. marcescens* OF, WF y 933 de inducir apoptosis. A) Estudio de la viabilidad celular realizado con células Jurkat tratadas durante 4 horas con distintas cantidades (0-5 $\mu\text{g/ml}$) de las muestras CS-2170, -OF, -WF y -933. El resultado mostrado es la media de tres experimentos independientes \pm s.e.m. La significancia estadística fue determinada mediante el programa ANOVA, PLSD Fisher y viene indicada por ** $P < 0.1$ y *** $P < 0.001$. B) Estudio de la capacidad de inducir la fragmentación del DNA de las muestras CS-2170, -OF, -WF y -933 realizado con células Jurkat control (C-) o tratadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de los diferentes extractos durante 16 horas.

3.7. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS SV

Para poder afirmar que la prodigiosina era el pigmento sintetizado por *S. marcescens* 2170 y también para estudiar su actividad apoptótica debíamos caracterizar y purificar el pigmento formado por esta bacteria, razón por la que empezamos a utilizar el método recomendado en la literatura para la obtención de la prodigiosina (Goldschmidt & Williams, 1968); hasta ese momento, para obtener las muestras CS lo que hacíamos era concentrar el sobrenadante bacteriano, mientras que en el protocolo indicado para la extracción del pigmento de *S. marcescens* la extracción se hacía a partir de las bacterias (el sedimento), con la ayuda de una solución ácida de metanol (metanol/1N HCl, 24:1) que favorece la separación entre el pigmento y las proteínas. Nosotros introdujimos una pequeña modificación para poder concentrar la muestra consistente en evaporar el metanol:HCl con la ayuda del *speed-vacuum* para entonces resuspender el pigmento en un volumen menor al inicial de DMSO o metanol. A este tipo de muestra la denominamos muestra 'SV' (de *speed-vacuum*) (para más detalle ver '*Material y métodos*').

Para determinar la cantidad de muestra SV utilizada en un ensayo utilizamos como unidad de medida la concentración de prodigiosina y para su cuantificación aplicamos la fórmula descrita por Goldschmidt y Williams (Goldschmidt & Williams, 1968):

$$(\text{Abs}_{534 \lambda} - \text{Abs}_{655 \lambda}) \times 19.3 = \mu\text{g Prodigiousina} / \text{ml}$$

La aplicación de esta fórmula está restringida a aquellas soluciones cuyo pH no sea básico pues entonces el espectro en el visible de la prodigiosina cambia y puede llevar a

errores en su cuantificación (Williams & Quadri, 1980). En nuestro laboratorio, para hacer la lectura de la absorbancia normalmente hemos hecho una dilución 1:10 de la muestra SV en metanol pero hemos comprobado que esta dilución se puede hacer igualmente en metanol ácido, en PBS y en DMSO, por lo que también sería correcto hacer una cuantificación directa de la prodigiosina presente en una muestra SV; el haber comprobado que para cuantificar la muestra era posible diluirla en PBS, medio inocuo para las células, nos pareció interesante pues en ocasiones hemos aprovechado estas muestras para hacer algún ensayo.

Hasta el momento no teníamos constancia de que nadie hubiese aplicado la fórmula de Goldschmidt y Williams para cuantificar la prodigiosina presente en el sobrenadante obtenido de un cultivo bacteriano en medio líquido (es el caso de nuestras muestras CS), pero de poder aplicarse nos sería de gran utilidad pues hasta el momento habíamos utilizado como unidad de medida para estas muestras la concentración de proteínas, de forma que tras obtener el espectro de absorción a lo largo del UV-Vis de una muestra CS diluida 10 veces en PBS y en PBS: HCl 1N (24:1) vimos que, a diferencia de lo que ocurre en las muestras obtenidas según el método de Goldschmidt y Williams, en estas muestras no había ningún pico de absorbancia a la longitud de onda de 534 nm; a pesar de ello aplicamos la fórmula y comprobamos, como se verá a continuación, que los resultados que habíamos obtenido con las muestras CS eran comparables a los conseguidos con las muestras SV, si se expresaban en función de la cantidad de prodigiosina.

3.8. CORRELACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON CS-2170 Y SV-2170

La comparación entre las muestras CS-2170 y SV-2170 la hicimos a través de la cuantificación del efecto por citometría de flujo, utilizando anexina-V y IP como marcadores. La unidad de medida utilizada en ambos casos fue la concentración de prodigiosina.

Este ensayo se hizo incubando células Jurkat con el volumen de CS-2170 y SV-2170 necesario para que en ambos cultivos hubiese la misma cantidad de prodigiosina. Tras incubar 1×10^6 Jurkat /ml con 200 nM prodigiosina (Prod) durante 4 horas la apoptosis inducida era del orden del 40% en ambos casos (fig. 3.9).

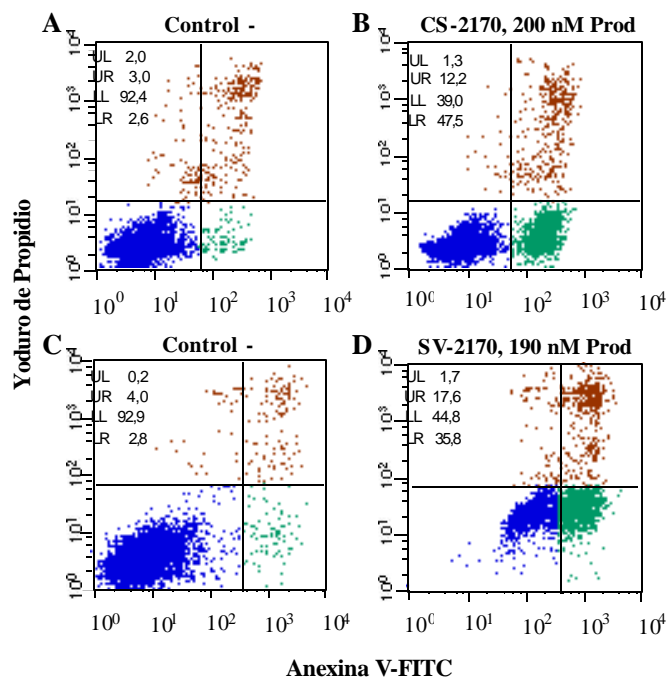


Fig. 3.9. Estudio cuantitativo de la inducción de la apoptosis con la prodiginosina realizado por citometría de flujo para comparar la respuesta apoptótica obtenida con una muestra CS y otra SV. Las figuras aquí mostradas proceden de un experimento representativo donde A y C son células control (Control -); B, células tratadas con CS-2170 (200 nM Prod); D, células tratadas con SV-2170 (190 nM Prod). El tiempo de incubación fue en todos los casos de 4 horas; la representación de los resultados mostrada divide a la población celular en cuatro casillas que se corresponden con: LL) células vivas (anexina -/IP -); LR) células apoptóticas (anexina+/ IP-); UR) células necróticas y con apoptosis secundaria (anexina +/IP +); UL) restos celulares.

3.9. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PIGMENTO PRODIGINOSINA

Todos los resultados apuntaban al pigmento producido por *S. marcescens* 2170 como a la sustancia con actividad apoptótica presente en las muestras que utilizábamos en nuestros estudios, pero hasta que no fuese caracterizada no podíamos afirmar que se tratase realmente de la prodiginosina, cuya fórmula $C_{20}H_{25}N_3O$ requiere 323.4381 (peso molecular promediado). Con el objeto de llegar a identificar el pigmento se procedió al análisis de una muestra obtenida por extracción con metanol:HCl 1N (24:1), siguiendo los pasos que se describen a continuación.

3.9.1. Espectrometría de masas

Tras hacer un primer análisis del extracto crudo por espectrometría de masas utilizando la técnica de ionización por electrospray (ESI-MS), obtuvimos como resultado varios picos, entre ellos uno que aparecía a m/z 324.4 ($M+H$)⁺, correspondiente al producto que nos proponíamos aislar (fig.3.10).

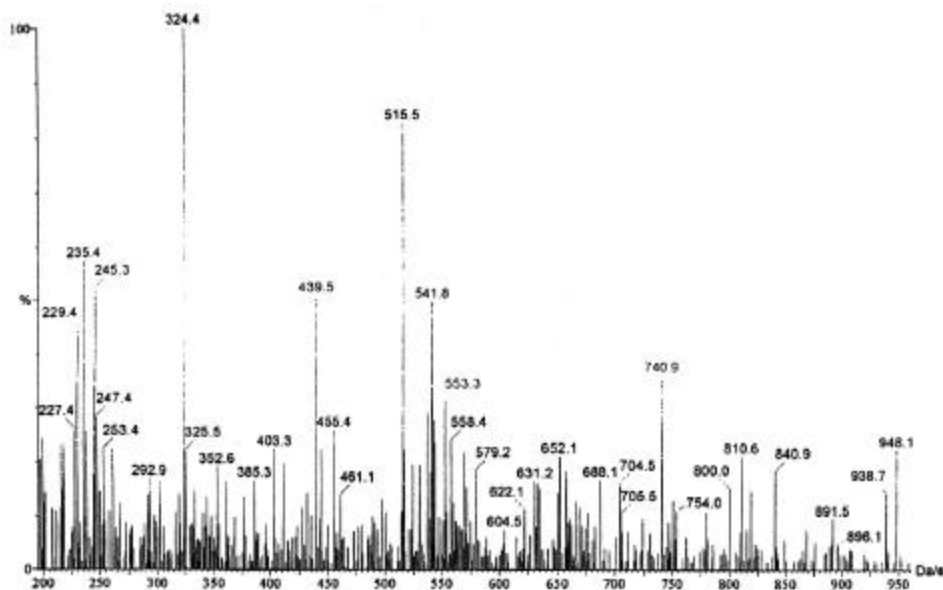


Fig. 3.10. ESI-MS de un extracto crudo de prodigiosina.

3.9.2. Cromatografía líquida a presión atmosférica en fase normal

Al hacer un análisis del extracto crudo por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando como solvente CH₂Cl/MeOH (6:4) aparecieron diferentes manchas, siendo de nuestro interés la única de color rojo, con un R_f=0.5 (el valor R_f=0 correspondía al glicerol).

Para aislar dicha mancha se hizo una purificación por cromatografía líquida a presión atmosférica en fase normal haciendo un seguimiento de la misma por TLC. Las fracciones eluidas coloreadas fueron juntas y el solvente eliminado al vacío para poder liofilizar la muestra. Una vez redisuelta esta nueva fracción en metanol fue analizada por ESI-MS, obteniendo un pico m/z 324.4 mayoritario.

3.9.3. Cromatografía líquida a alta presión en fase reversa (HPLC)

La fracción aislada fue analizada utilizando como detector un diodo-array Shimadzu CBM-10A para obtener el espectro completo UV-Vis del producto eluyente.

El resultado de la cromatografía indicaba que el producto de interés (con una absorción a 537 nm, correspondiente al valor de absorción teórico de la prodigiosina) eluía hacia el final del gradiente utilizado, aproximadamente a un tiempo de retención de 37-40 minutos.

3.9.4. Análisis/purificación por HPLC/ESI-MS

Esta nueva purificación se hizo haciendo la detección del producto que iba eluyendo de la columna por ESI-MS.

En esta ocasión, el objetivo era obtener la mayor cantidad de producto puro, reduciendo al máximo la cantidad de muestra que se perdía con el análisis de las fracciones. Por esta razón, el producto eluido era dividido con un divisor de flujo Micro-Tech Scientific, de forma que 1/50 del producto era dirigido hacia el espectrómetro de masas y el resto era recogido de forma manual en diferentes fracciones.

Según el análisis realizado por ESI-MS, la fracción recogida a un tiempo de retención de 38 minutos se correspondía al producto de m/z 324.4 $(M+H)^+$; esta purificación fue repetida hasta agotar la muestra y una vez terminada se juntaron las fracciones obtenidas al tiempo de retención de 38 minutos.

Esta fracción fue analizada de nuevo por ESI-MS por introducción directa para comprobar que su contenido seguía siendo el mismo: m/z 324.4 $(M+H)^+$ (fig. 3.11).

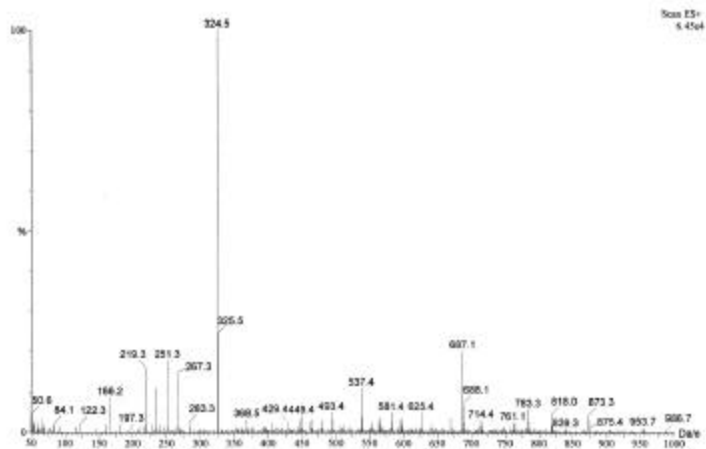


Fig. 3.11. ESI-MS de una fracción de prodigiosina purificada por HPLC.

La muestra así obtenida fue dividida en dos para poder hacer con ella el análisis por RMN- H^1 y el ensayo biológico (ver '*Resultados*', pág. 89).

3.9.5. Análisis por RMN- H^1

El resultado del análisis de esta muestra obtenido por RMN- H^1 (CD_3OD , 500 MHz, ppm) fue 10.71 (m, NH), 8.54 (m, NH), 7.08 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.83 (m, 1H), 6.30 (m, 1H), 6.25 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.43 (t, 2H), 1.58 (s, 3H), 1.2-1.4 (m, 6H), 0.91 (t, 3H) y se correspondía con la 2-metil-3-pentil-6-metoxiprodigioseno o prodigiosina (fig.3.12).

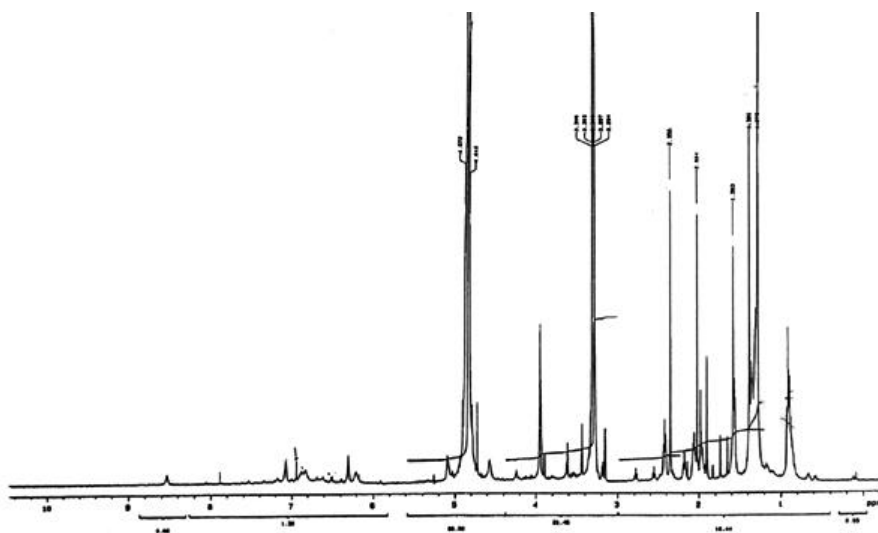


Fig.3.12. RMN-¹H de prodigiosina.

4. EFECTO DE LA PRODIGIOSINA EN LÍNEAS CELULARES CANCEROSAS Y NO CANCEROSAS

Con el objeto de poder determinar si existían diferencias en cuanto al grado de sensibilidad frente a la prodigiosina entre líneas celulares cancerosas y no cancerosas, diseñamos una serie de experimentos con los que estudiar la inducción de la apoptosis en diversas líneas de distinta naturaleza y origen, procedentes de aquellos tumores de mayor incidencia o gravedad en la actualidad como son los linfomas, cáncer de colon, estómago, mama y piel.

Este estudio se hizo a través de la determinación de la viabilidad celular, cuyos valores sirvieron para obtener el valor IC_{50} para prodigiosina de cada línea y para compararlas de forma semicuantitativa, según la sensibilidad al efecto de la prodigiosina mostrado. Para determinar si había o no inducción de la apoptosis ensayamos en cada línea la fragmentación del DNA y analizamos los cambios morfológicos de las células tratadas con respecto a las control utilizando el Hoechst 33342 y el yoduro de propidio (IP) como marcadores.

Las drogas empleadas en estos ensayos fueron las llamadas CS-2170 y SV-2170, siendo la unidad de medida la concentración de prodigiosina, obtenida mediante la aplicación de la fórmula de Goldschmidt & Williams (pág. 75), expresada en forma de nM de prodigiosina.

4.1. ESTUDIOS REALIZADOS EN LÍNEAS CANCEROSAS DE ORIGEN HEMATOPOYÉTICO

Los resultados obtenidos con Jurkat indicaban que se trataba de una línea muy sensible a la droga que estábamos estudiando, así que nos propusimos estudiar su efecto en otras líneas cancerosas humanas de origen hematopoyético como MOLT-4, procedente de una leucemia linfoblástica aguda, NSO y HL-60, ambas mielomas y Ramos, procedente de un linfoma de Burkitt.

Mediante el estudio de la viabilidad celular pudimos determinar que todas las líneas hematopoyéticas estudiadas eran sensibles a la acción de la prodigiosina y que su respuesta era de forma dosis-dependiente. En estos ensayos se incubaron las diversas líneas celulares con concentraciones crecientes de prodigiosina (0-1200 nM) durante 4 horas. La IC_{50} expresada en

nM Prod fue de 180 para Jurkat, 400 para Ramos y HL-60, 440 en Molt-4 y 1100 en NSO (fig. 4.1.A). Para determinar si la prodigiosina inducía apoptosis en estas líneas celulares se hizo el estudio de la fragmentación del DNA con células tratadas con 800 nM Prod durante 16 horas; el resultado obtenido con este ensayo fue que en todas las células tratadas se había inducido la apoptosis (fig.4.1.B). También observamos las células al microscopio de fluorescencia previo marcaje del DNA celular con el colorante vital Hoechst 33342 y observamos que en las células tratadas con 400 nM Prod se producía la condensación y fragmentación del núcleo (fig.4.1.C).

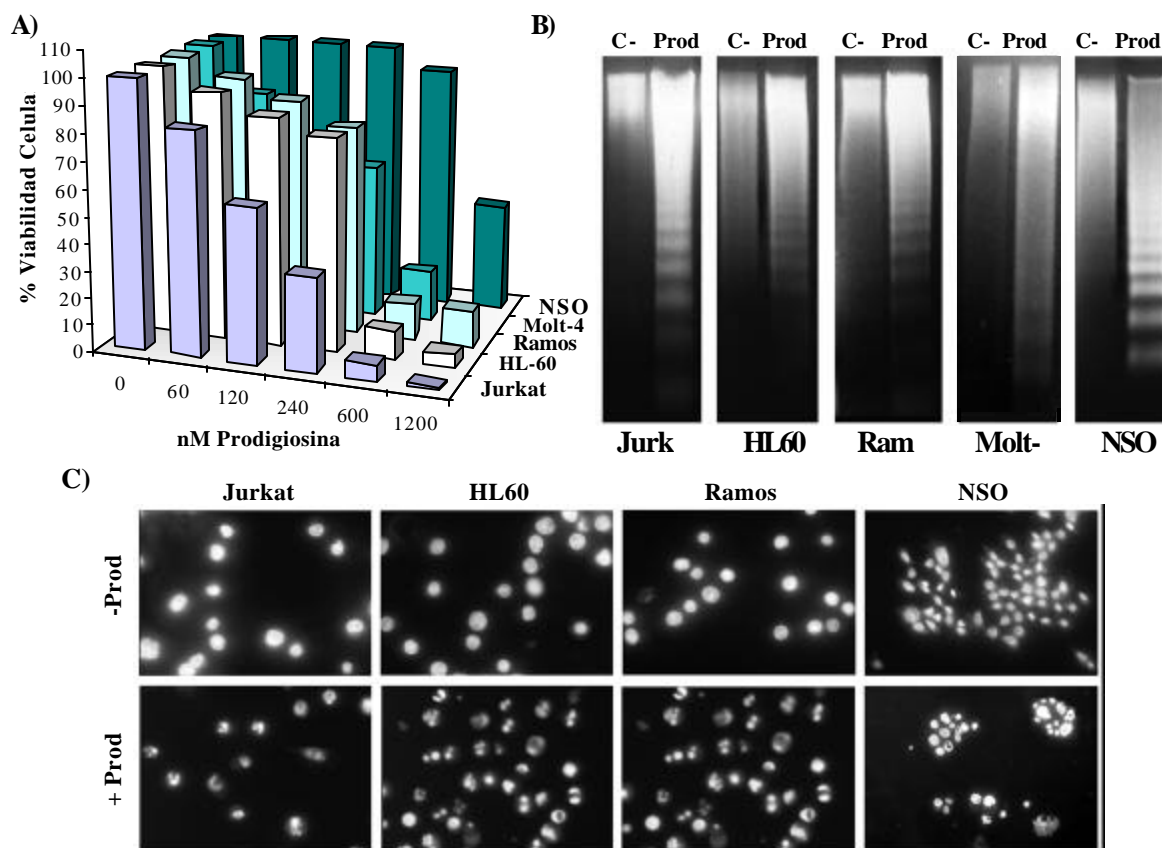


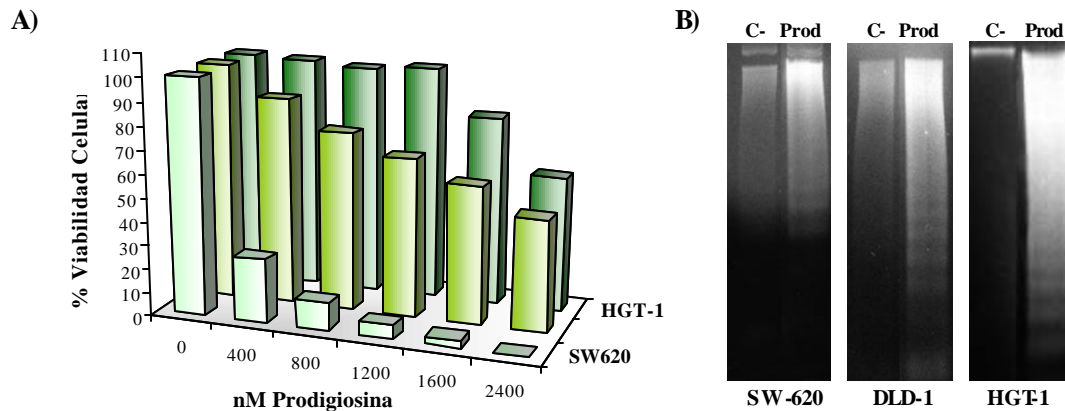
Fig.4.1. Efecto de la prodigiosina en diferentes líneas tumorales hematopoyéticas. A) El estudio de la viabilidad de las líneas Jurkat, HL-60, Ramos, MOLT-4 y NSO se hizo tratando las células con concentraciones de 0-1200nM Prod durante 4 horas. B) Estudio de la fragmentación del DNA. Las distintas líneas celulares fueron tratadas con 800 nM Prod durante 16 horas. El DNA de bajo peso molecular fue resuelto en geles del 1% agarosa y visualizado a la luz UV por tinción con BrEt. C) Análisis morfológico por microscopía de fluorescencia. Las células fueron teñidas con los colorantes Hoechst 33342. Aspecto que ofrecían las células control (-Prod) y las tratadas (+ Prod) con 400 nM Prod durante 6 horas.

4.2. ESTUDIOS REALIZADOS EN LÍNEAS DERIVADAS DE CÁNCER DE COLON Y DE ESTÓMAGO

El efecto de la prodigiosina sobre líneas humanas cancerosas de origen gastrointestinal fue estudiado en las líneas SW-620, DLD-1 y HGT-1, las dos primeras procedentes de adenocarcinomas de colon y la última de un tumor gástrico maligno. En ellas determinamos los cambios producidos al ser tratadas con prodigiosina en la viabilidad celular, su posible fragmentación del DNA y los cambios morfológicos al teñirlas con el colorante nuclear Hoechst 33342 y IP.

Los resultados del estudio de la viabilidad de las distintas líneas celulares tratadas con cantidades crecientes de prodigiosina (0-2400 nM) durante un tiempo de incubación de 4 horas, sirvieron para ver que el efecto de la droga era dosis-dependiente y para obtener los valores de la IC₅₀ de prodigiosina en las distintas células que fue de 275 nM para SW-620, 2200 nM en DLD-1 y 3100 nM en HGT-1 (fig. 4.2.A). Las líneas procedentes de cáncer de colon fueron más sensibles que la línea HGT-1, derivada de un cáncer de estómago, resultado en parte previsible puesto que los tumores gástricos son muy resistentes a la quimioterapia.

Para poder determinar si el efecto de la prodigiosina en estas líneas estaba relacionado con la inducción de la apoptosis miramos si se producía la fragmentación del DNA en células tratadas (fig.4.2.B); tras incubar las distintas líneas procedentes de cáncer de colon con 1100 nM Prod durante 16 horas y con 2000 nM Prod durante 12 horas en la línea procedente de cáncer de estómago, el resultado fue que en todas ellas se había producido la fragmentación del DNA en escalera. También observamos cambios en la morfología de las células tratadas utilizando el fluorocromo Hoechst 33342, produciéndose la condensación y fragmentación del núcleo en las tres líneas (fig.4.2.C).



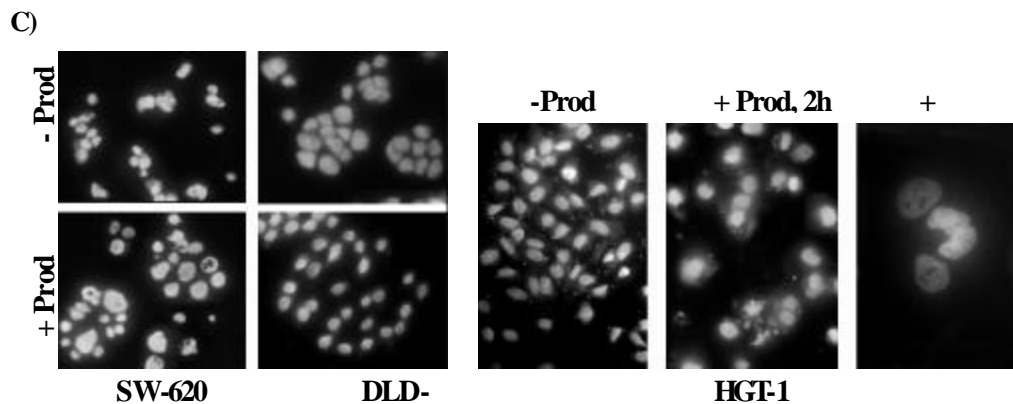


Fig.4.2. Efecto de la prodigiosina en diferentes líneas cancerosas de origen gastrointestinal. A) Estudio de la viabilidad celular realizado en SW-620, DLD-1 y HGT-1 al ser tratadas con distintas cantidades de prodigiosina (de 0 a 2400 nM), durante 8 horas. La cantidad de células viables ha sido expresada en forma de porcentaje con respecto al control (células no tratadas). B) Estudio de la fragmentación del DNA. Las líneas SW-620 y DLD-1 fueron incubadas con 1100 nM Prod durante 16 horas, mientras que la línea HGT-1 fue tratada con 2000 nM Prod durante 12 horas; tras hacer la electroforesis del DNA en geles del 1% agarosa, éstos fueron teñidos con BrEt y visualizados a la luz UV. C) Análisis morfológico realizado por microscopía de fluorescencia. SW-620 y DLD-1 fueron incubadas con 1100 nM Prod durante 5 horas; en el caso de HGT-1, el tratamiento fue con 3000 nM Prod durante 2 y 3 horas; tanto las células tratadas (+ Prod) como las control (- Prod) fueron teñidas con el Hoechst 33342. Aumentos originales: 100X para SW-620 y DLD-1, 200X, 200X y 500X respectivamente para HGT-1.

4.3. ESTUDIOS REALIZADOS EN UNA LÍNEA DE CÁNCER DE MAMA

Para estudiar el posible efecto apoptótico de la prodigiosina en el cáncer de mama utilizamos como modelo la línea humana MCF-7, procedente de un adenocarcinoma y que presenta un aspecto epitelial (*epithelial-like*).

El ensayo del MTT realizado al tratar estas células con cantidades crecientes de prodigiosina (0-1650 nM) durante 4 horas mostró que este efecto era dosis-dependiente, obteniéndose una IC_{50} de 1080 nM Prod. También observamos la fragmentación del DNA en escalera en células tratadas con 800 nM Prod durante 16 horas y por tanto concluimos que la prodigiosina inducía la apoptosis en MCF-7 (fig. 4.3. A y B).

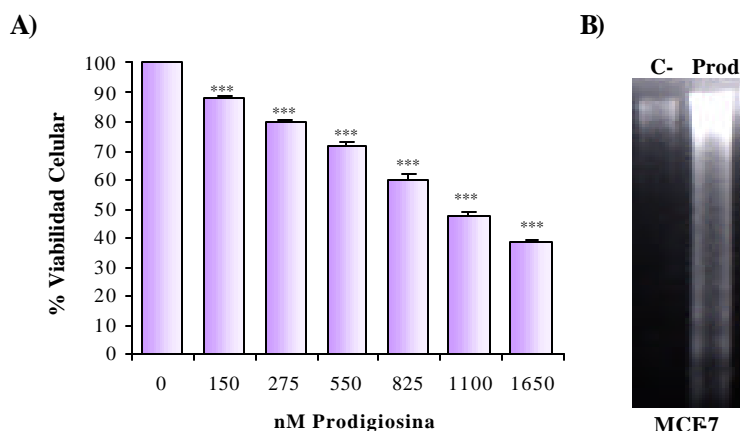


Fig. 4.3. Estudio *in vitro* del efecto de la prodigiosina sobre el cáncer de mama. A) El estudio de la viabilidad de MCF-7 se hizo incubando 40.000 células con concentraciones crecientes de prodigiosina (0-1650 nM) durante 4 horas. El resultado es la media \pm SEM de dos experimentos realizados por triplicado. La significancia estadística de los resultados obtenidos en células tratadas con respecto a las no tratadas fue determinada mediante el programa ANOVA, PLSD Fisher, y para todas las dosis fue de *** $P < 0.001$. B) Estudio de la fragmentación del DNA. Las células fueron no tratadas (C-) o incubadas en presencia de 1100 nM Prod durante 16 horas. El DNA fragmentado fue resuelto en geles del 1% agarosa y visualizado a la luz UV tras ser teñido con BrEt.

4.4. ESTUDIOS REALIZADOS EN UNA LÍNEA DE CÁNCER DE PIEL

Para saber si la prodigiosina era capaz de inducir la apoptosis en células procedentes de un cáncer de piel estudiamos su efecto en la línea humana A431 procedente de un carcinoma epidermoide, mediante el estudio de la viabilidad celular y de la inducción de la apoptosis por el ensayo de la fragmentación del DNA.

A través del ensayo del MTT determinamos que el efecto de prodigiosina sobre la viabilidad celular era dosis-dependiente (entre 0 y 2400 nM Prod), obteniendo una IC_{50} para esta línea de 925nM Prod; el efecto inducido en A431 era el de apoptosis pues observamos fragmentación del DNA tras el tratamiento con 800nM Prod durante 16 horas) (fig. 4.4.A y B).

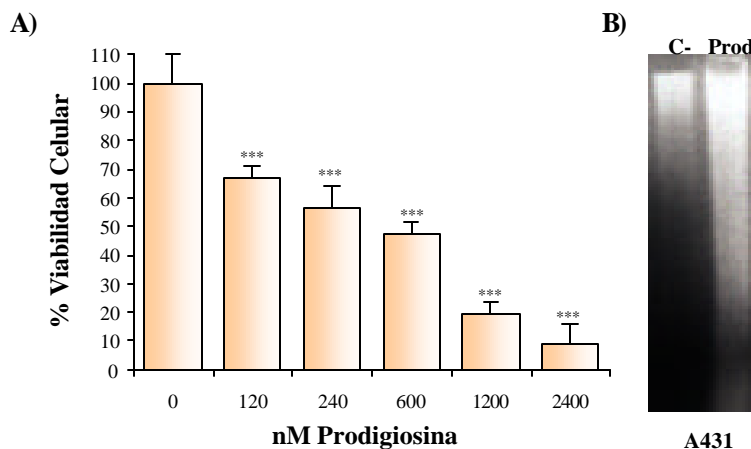


Fig. 4.4. Efecto de la prodigiosina en A431. A) El estudio de la viabilidad celular en A431 se hizo a través del ensayo del MTT al tratar las células con cantidades crecientes de prodigiosina (0-2400 nM Prod) durante 4 horas; la significancia estadística fue determinada mediante el programa ANOVA, PLSD Fisher, y para todas las concentraciones de droga utilizadas fue de $***P < 0.001$. B) Ensayo de la fragmentación del DNA realizado con las células control y con las tratadas con 800 nM Prod durante 16 horas.

4.5. ESTUDIOS REALIZADOS EN LÍNEAS CELULARES NO CANCEROSAS

El efecto de la prodigiosina también fue estudiado en líneas celulares no cancerosas de distinta naturaleza y origen como MDCK (NBL-2) que son células epiteliales no malignas de riñón de *Canis familiaris*, NRK que son fibroblastos normales de riñón de rata y también hicimos estudios con NIH-3T3 y Swiss-3T3, ambas células embrionarias de ratón. En ellas estudiamos el efecto de la prodigiosina sobre la viabilidad celular y su capacidad de inducirles apoptosis utilizando concentraciones mayores que las empleadas en las líneas cancerosas estudiadas (0-3800 nM Prod para el estudio de la viabilidad celular y 2200 nM Prod para el de la fragmentación del DNA). Estos resultados fueron muy útiles para comparar el efecto del pigmento entre líneas cancerosas y no cancerosas. El valor la IC_{50} de prodigiosina obtenido a través del ensayo del MTT fue de 2800 nM en NRK, 3000 nM en MDCK y 3400 nM en Swiss-3T3, mientras que para NIH-3T3 la prodigiosina no mostró actividad citotóxica ni a la dosis de 3800 nM (fig. 4.5.A). No se obtuvo fragmentación del DNA en ninguna de estas líneas tratadas con la prodigiosina (fig. 4.5.B).

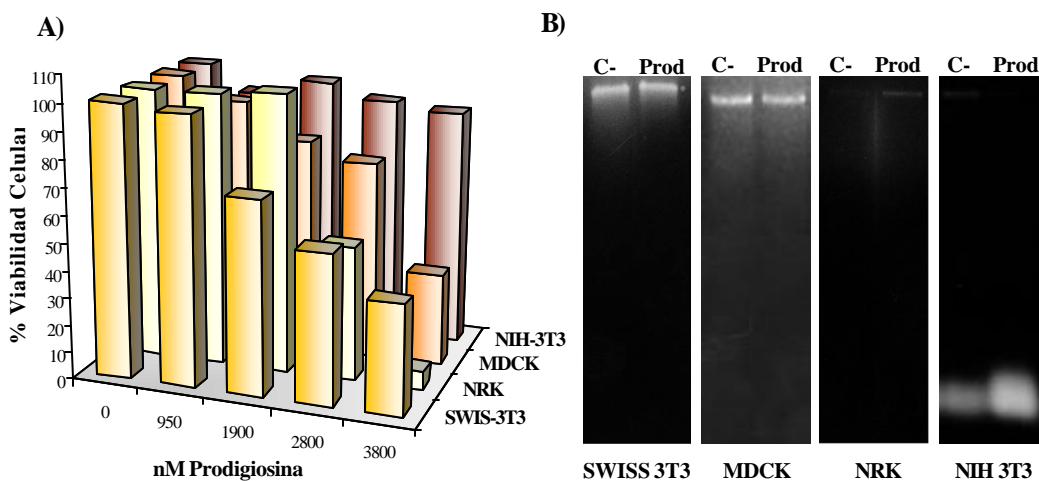


Fig. 4.5. Efecto de la prodigiosina en líneas celulares no cancerosas. A) El estudio de la viabilidad se hizo al incubar las líneas MDCK, NRK, NIH-3T3 y Swiss-3T3 con distintas concentraciones de prodigiosina (0-3800 nM). B) Ensayo de la fragmentación del DNA realizado con células control (C-) y células tratadas con 2200 nM Prod durante 16 horas (Prod).

4.6. ESTUDIO DE LA REVERSIBILIDAD DEL EFECTO DE PRODIGIOSINA

Un hecho que observamos en aquellas células que crecen adheridas a la placa de cultivo fue que durante el tratamiento con prodigiosina, lo primero que se observaba era que se desenganchaban de la placa aunque mantenían un aspecto sano. A raíz de esta observación quisimos estudiar el comportamiento de las células si en ese punto eran lavadas y puestas de nuevo en cultivo con medio limpio. El resultado de este ensayo hecho con las líneas SW-620 y HGT-1 fue que a los 15 minutos de estar en medio fresco, las células estaban enganchadas a la base de la placa de cultivo y estiradas, como si nada hubiese ocurrido; sería un proceso similar al que tiene lugar cuando las células son tripsinizadas, aunque en este caso nos sorprendió la rápida recuperación de las células, ya que al ser tratadas con tripsina necesitan varias horas para llegar a este estado de anclaje. Este experimento nos sirvió para ver cómo en las fases más iniciales del tratamiento con la prodigiosina, su efecto podía ser reversible.

4.7. ENSAYOS REALIZADOS CON LA PRODIGIOSINA PURA

Para corroborar los datos obtenidos con las muestras CS-2170 y SV-2170 testamos en varias líneas celulares el efecto de la prodigiosina pura, procedente de la cepa bacteriana *S. Marcescens* 2170 y caracterizada por RMN-H¹. En primer lugar hicimos un estudio cuantitativo de la apoptosis inducida por prodigiosina pura en células Jurkat por citometría de flujo, utilizando el marcador Anexina-V FITC y IP (fig. 4.6).

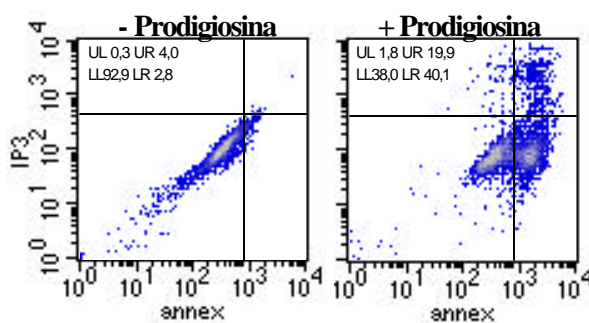


Fig. 4.6. La prodigiosina induce la apoptosis en Jurkat. Las células fueron incubadas durante 4 horas sin prodigiosina o con 300 nM Prodigiosina (- y + prodigiosina). Debido a que la prodigiosina interfiere con el fluorocromo FITC lo que hicimos fue añadirle al control negativo 300nM Prod para poder situar correctamente los ejes.

Una vez comprobado que en las células tratadas con la prodigiosina pura se obtenía una respuesta apoptótica hicimos un estudio comparando su efecto en la línea cancerosa Jurkat y en la línea no cancerosa NIH-3T3; para ello determinamos las curvas dosis-respuesta a la prodigiosina a través del ensayo del MTT y analizamos la capacidad de prodigiosina de inducir apoptosis por el ensayo de la fragmentación del DNA y por la tinción nuclear con el colorante Hoechst (fig. 4.7 A, B y C).

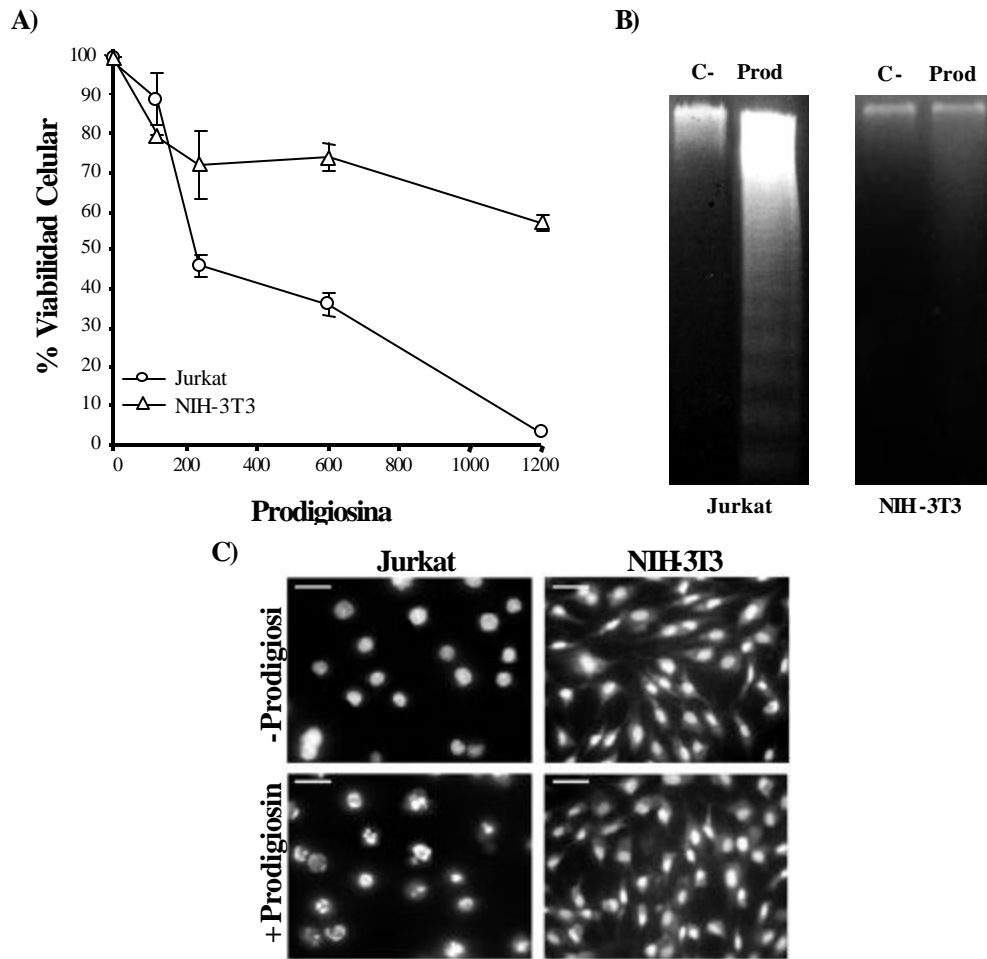


Fig. 4.7. Estudio comparativo del efecto de prodigiosina pura en las líneas Jurkat y Swiss-3T3. A) Estudio de la viabilidad celular de Jurkat y NIH-3T3 por el ensayo del MTT, en el que las células fueron tratadas con distintas cantidades de prodigiosina (de 0 a 1200 nM) durante 4 horas. B) Fragmentación del DNA obtenida de células sin tratar (C-) o tras ser incubadas con 300 nM Prodigiosina (Prod) durante 16 horas. C) Análisis morfológico por microscopía de fluorescencia de células control (- Prodigiosina) y células tratadas con 300 nM Prodigiosina (+ Prodigiosina) durante 6 horas (aumento original 100X).

La IC₅₀ para Jurkat fue de 225 nM Prodigiosina; también, vimos que a la dosis estudiada prodigiosina inducía la apoptosis en Jurkat pero no en NIH-3T3, ya que en estas células no observamos fragmentación del DNA ni cambios en su morfología nuclear.

5. ESTUDIO PARCIAL DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA PRODIGIOSINA

Las drogas utilizadas para hacer estos ensayos fueron del tipo CS-2170 y SV-2170, siendo la unidad de medida la concentración de prodigiosina obtenida mediante la aplicación de la fórmula de Goldschmidt & Williams (pág. 75), expresada en forma de nM de prodigiosina.

5.1. MECANISMO INDEPENDIENTE DE p53

p53 es un gen supresor de tumores que se encuentra mutado en muchos cánceres. Algunas de las líneas celulares cancerosas en las que hemos testado prodigiosina y en las que hemos visto una gran sensibilidad a su efecto apoptótico tienen mutada o no expresan *p53*, como las líneas hematopoyéticas Jurkat (Vigorito *et al.*, 1999; Chen & Haas, 1990) y HL60 (Shimitzu *et al.*, 1998; Ju *et al.*, 1998), las líneas de colon SW-620 (Goldwasser *et al.*, 1996) y DLD-1 (Huang & Pardee, 1999) y la línea de piel A431 (Ohtsubo *et al.*, 1998). Esta observación es indicativa de que el mecanismo inductor de la apoptosis en las células tratadas con prodigiosina es independiente de la acción protectora de *p53*.

5.2. IMPLICACIÓN DE LAS CASPASAS EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LA PRODIGIOSINA

Los resultados que habíamos obtenido al estudiar la fragmentación del DNA en distintas líneas celulares tratadas con la prodigiosina eran indicativos de que se había producido la activación, vía caspasas, de la endonucleasa responsable de esta fragmentación ordenada.

Las caspasas son unas cisteína-proteasas que se consideran la maquinaria efectora de la apoptosis. Para determinar el papel de estas moléculas en la apoptosis inducida por la prodigiosina estudiamos por Western blot la activación de las caspasas más importantes en la apoptosis: las caspasas 9, 3 y 8. Los anticuerpos utilizados nos permitieron detectar en las células tratadas la aparición de la forma activa de la caspasa 9, una reducción de la pro-caspasa

3 y la bajada en la expresión de la forma precursora así como la aparición de la forma activa de la caspasa 8; también pudimos comprobar que estos sucesos eran dosis-dependientes (fig. 5.1).

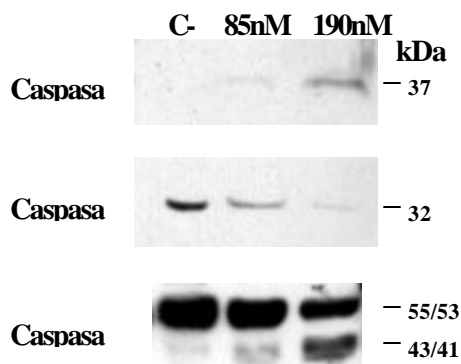


Fig.5.1. Análisis por Western blot de la activación de las caspasas 9, 3 y 8 en células tratadas con prodigiosina. Para cada condición, 80µg de proteína correspondientes a un extracto total de Jurkat fueron resueltos en un gel de acrilamida al 15%. Las células fueron tratadas con 85 y 190 nM Prod durante 3 horas; el control negativo se corresponde a células sin tratar incubadas en las mismas condiciones. En este estudio se puede apreciar que en las células tratadas con prodigiosina aparece la forma activa de las caspasas 9 y 8 y desaparece la forma precursora de las caspasas 3 y 8.

5.2.1. Liberación del citocromo C

El citocromo C es una proteína mitocondrial responsable de la inducción de la apoptosis a través de la activación de la caspasa 9 cuando es liberada al citosol. Para poder determinar si la prodigiosina promovía o no la salida del citocromo C mitocondrial estudiamos por Western blot su expresión en la fracción citosólica y vimos que ésta se producía sólo en las células incubadas con la droga (fig. 5.2).

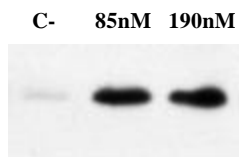


Fig.5.2. Detección de la liberación del citocromo C mitocondrial por Western blot. El extracto citosólico fue obtenido tras incubar células Jurkat con prodigiosina: 0 nM (C-), 85nM y 190 nM durante 3 horas; en cada carril se cargaron 80 µg de proteína.

5.2.2. Fragmentación de la PARP

La PARP es una enzima nuclear de 116 kDa que interviene en los procesos de replicación y reparación del DNA. Por ser un sustrato de las caspasas, la PARP es inactivada durante los primeros estadios de la apoptosis. Para ver si la prodigiosina inducía la proteólisis de la PARP hicimos un estudio por Western blot en varias líneas celulares tratadas con 85 y 190 nM Prod.

En Jurkat vimos que esta proteólisis era dependiente de la dosis de prodigiosina utilizada (Fig.5.3.A); además, comparando este resultado con el efecto de la prodigiosina sobre la viabilidad celular vimos que existía una correlación entre el efecto citotóxico obtenido y la proteólisis de la PARP. También comprobamos que al incubarse las células con 50 nM TPA, un éster de forbol, se inhibía la fragmentación de la PARP inducida por la prodigiosina (fig.5.3.A). En las líneas tumorales de colon SW-620 y DLD-1 también detectamos la proteólisis de la PARP al ser tratadas con el pigmento (fig.5.3.B).

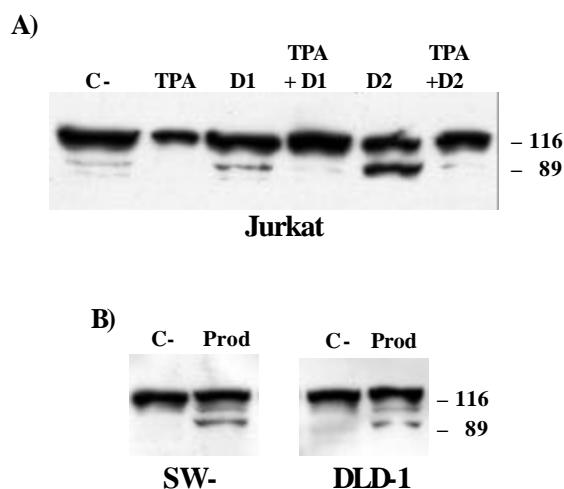


Fig. 5.3. Estudio de la proteólisis de la PARP por Western blot en respuesta al tratamiento con prodigiosina. Inhibición de esta proteólisis en células pre-incubadas con TPA. Los extractos proteicos totales de varias líneas celulares (80 µg de proteína) fueron resueltos en geles de acrilamida al 12%. A) Células Jurkat fueron tratadas con distintas cantidades de prodigiosina (0, 85 y 190 nM) durante 3 horas; paralelamente se hizo otro ensayo en el que estas células fueron pre-incubadas con 50 nM TPA durante 30 minutos y después con prodigiosina (0, 85 y 190 nM Prod) durante 3 horas. B) Proteólisis de la PARP en SW -620 y DLD-1 inducida con 1100 nM Prod tras 8 horas de tratamiento.

5.2.3. Efecto del inhibidor de las caspasas Z-VAD.fmk

Con el objeto de determinar la implicación de las caspasas en la apoptosis inducida por la prodigiosina nos propusimos estudiar el efecto del inhibidor de las caspasas Z-VAD.fmk en células Jurkat tratadas con el pigmento. Para hacer una valoración cuantitativa de la apoptosis estudiamos por citometría la presencia de residuos de fosfatidilserina en la superficie celular, utilizando como marcadores anexina V-FITC y yoduro de propidio. El resultado que obtuvimos en este ensayo fue que en las células tratadas con Z-VAD.fmk y prodigiosina se produjo la inhibición de la apoptosis (fig.5.4). El efecto inhibitor de caspasas del Z-VAD.fmk también fue analizado a través del estudio de la fragmentación del DNA y se obtuvo el resultado esperado, que fue que en las células tratadas con Z-VAD.fmk y prodigiosina no se producía fragmentación del DNA (fig. 5.5). Estos resultados muestran que ha habido un bloqueo de la apoptosis al tratar las células conjuntamente con el inhibidor ZVAD.fmk y con prodigiosina, indicativo de que en este proceso apoptótico están implicadas las caspasas.

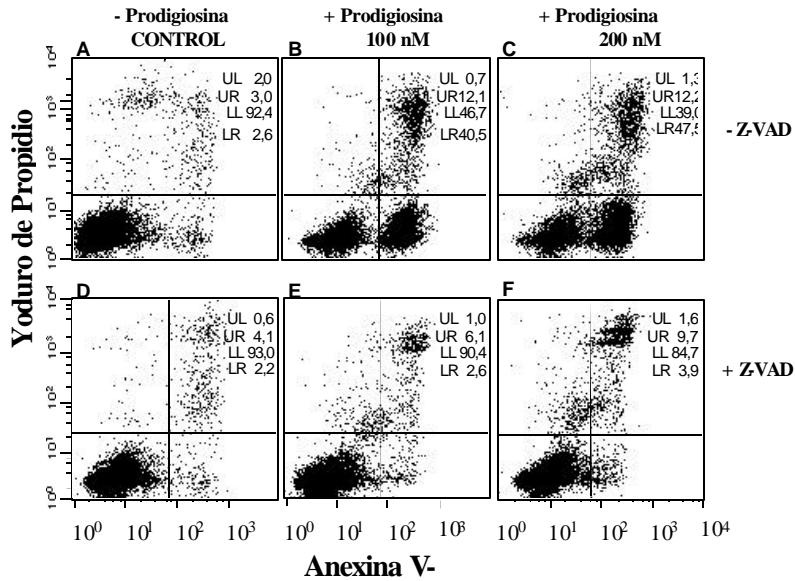


Fig.5.4. Implicación de las caspasas en la inducción de la externalización de los residuos PS de la membrana citoplasmática. Resultado correspondiente a una condición de un experimento representativo; cada condición se hizo por duplicado; los valores mostrados corresponden a la media de tres experimentos independientes. A) células sin tratar (Control); B y C) células tratadas con prodigiosina (100 y 200 nM respectivamente); D) control de células tratadas con Z-VAD.fmk (50 μ M Z-VAD.fmk); E) y F) células tratadas con la combinación de inhibidor y droga. Las células fueron pre-incubadas con 50 μ M Z-VAD.fmk durante 1 hora y después tratadas con la prodigiosina durante 4 horas.

| Prodigiosina | 0nM | 100 nM | 200 nM | | |
|--------------|-----|--------|--------|---|---|
| Z.VAD.fmk | - | + | - | + | - |

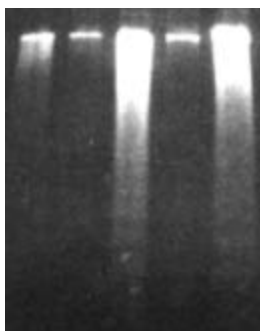


Fig. 5.5. Efecto del inhibidor de caspasas ZVAD.fmk en la fragmentación del DNA inducida por la prodigiosina. Las células fueron pre-incubadas con ZVAD. fmk durante 1 hora y después tratadas con 100 y 200 nM Prod durante 4 horas.

5.3. MECANISMO INDEPENDIENTE DE LA ACCIÓN PROTECTORA DE Bcl-2

Bcl-2 es un protooncogen del que se sabe juega un papel muy importante en la supervivencia celular, actuando como supresor en la transmisión de numerosos estímulos apoptóticos dirigidos a través de la vía mitocondria-liberación de citocromo C.

Por los estudios que habíamos hecho con el inhibidor de caspasas Z-VAD pudimos determinar que la prodigiosina actuaba vía caspasas, de forma que nos propusimos como siguiente objetivo caracterizar el papel de Bcl-2 en el proceso apoptótico inducido por la prodigiosina. Para poder resolver la cuestión de si Bcl-2 era capaz de inhibir la apoptosis inducida por este pigmento lo que hicimos fue comparar su efecto en la viabilidad celular de células Jurkat normales y en Jurkat transfectadas de forma estable con *bcl-2* (Jurkat-*bcl2*). Para descartar que las diferencias que pudiésemos observar fuesen debidas al plásmido utilizado en la transfección incluimos en el estudio a células Jurkat transfectadas de forma estable con el plásmido vacío (Jurkat-*neo*) (fig. 5.6).

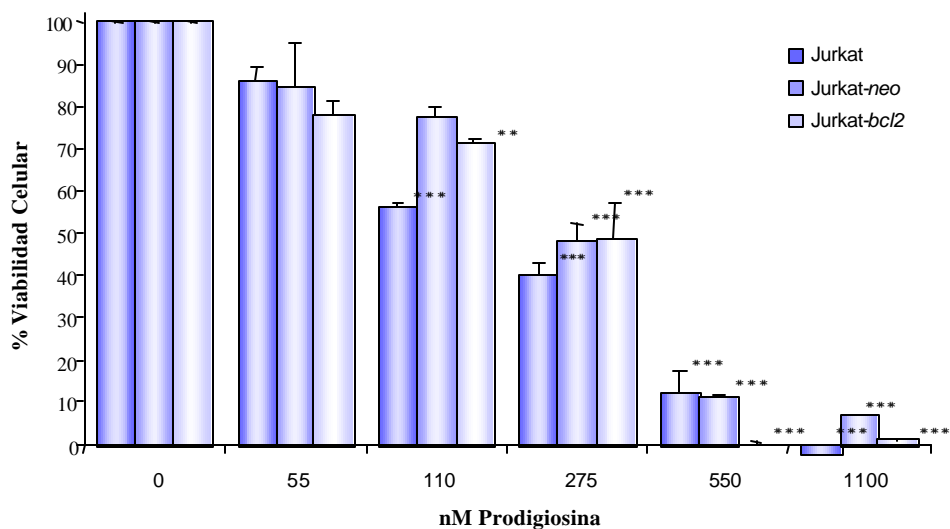


Fig.5.6. Efecto de la prodigiosina en células que sobreexpresan Bcl-2. Determinación de la viabilidad celular por el ensayo del MTT. Células Jurkat control (Jurkat), transfectadas con el plásmido vacío (Jurkat-*neo*) y transfectadas con *bcl-2* (Jurkat-*bcl2*) fueron tratadas con diferentes cantidades de prodigiosina (de 0 a 1100 nM), durante 4 horas. Este resultado es la media de tres experimentos independientes \pm s.e.m. La significancia estadística fue determinada mediante el programa ANOVA, PLSD Fisher, para $**P<0.1$ y $***P<0.001$.

Estos resultados nos permitieron llegar a la conclusión de que la sobreexpresión de Bcl-2 no es capaz de suprimir la apoptosis inducida por el pigmento prodigiosina o lo que es lo mismo, que Bcl-2 no es capaz de proteger a la célula de la acción de la prodigiosina.

5.4. RELACIÓN DE LA PKC EN LA REGULACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR LA PRODIGIOSINA

Para poder determinar la relación de la PKC con la modulación de la apoptosis inducida por la prodigiosina utilizamos el TPA, un éster de forbol que actúa como un potente activador de las formas cPKC y nPKC a tiempos cortos (Jun *et al.*, 1997). Para ello analizamos por FACS el efecto de la prodigiosina en células Jurkat pre-incubadas con TPA. Las condiciones del ensayo fueron células control (sin tratar), y células tratadas con prodigiosina (con 55 y 275nM); en los tres casos sin o con TPA. El resultado de dicho estudio se muestra en la siguiente figura (fig.5.7).

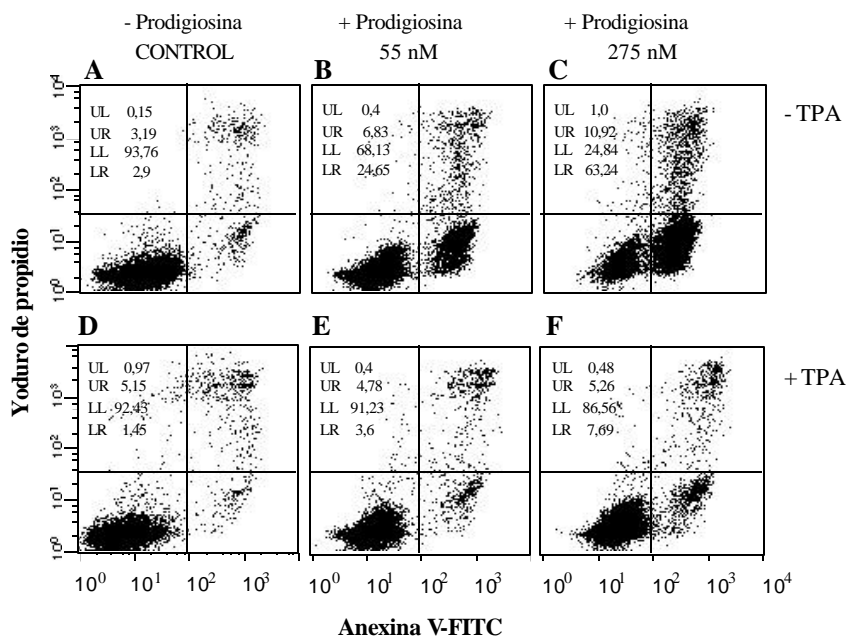


Fig.5.7. Implicación de la PKC en la apoptosis inducida por la prodigiosina. A) células control (sin prodigiosina); B) y C) células tratadas durante 4 horas con 55 nM y 275 nM Prod respectivamente; D) células incubadas con 50 nM TPA; E) y F) células tratadas respectivamente con 55 y 275 nM Prod, en presencia de 50 nM TPA. Las células fueron pre-incubadas con el TPA durante 30 minutos y después tratadas con prodigiosina durante 4 horas.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo mostraron que el efecto apoptótico inducido por la prodigiosina era prácticamente nulo en las células que habían sido previamente tratadas con TPA. La conclusión obtenida tras analizar estos resultados es que la prodigiosina no es capaz de inducir la apoptosis en células incubadas a su vez con TPA, hecho que indica de que la activación de la PKC protege a las células de la acción apoptótica de la prodigiosina.

En segundo lugar quisimos analizar el papel de las ERKs en este proceso. Dado que la activación de ERK1/2 tiene un papel anti-apoptótico en varios sistemas, nos propusimos estudiar si la acción anti-apoptótica conferida por el TPA a la célula era a través de la vía de las ERKs. Para ello utilizamos un inhibidor específico de las quinasas responsables de la fosforilación de las ERKs, las MEKs, llamado PD98059. Los ensayos que nos planteamos para poder estudiar el papel de las ERKs en la inhibición de la apoptosis inducida por la prodigiosina fueron la determinación de la viabilidad celular, el análisis de la fragmentación del DNA y el estudio por Western blot de la fosforilación de ERK1/2.

Con el estudio de la fragmentación del DNA observamos que al incubar las células con TPA no se producía fragmentación de DNA; tampoco había fragmentación en el carril correspondiente a TPA y prodigiosina, por lo que se demuestra que el TPA protege de la apoptosis inducida por la prodigiosina; en los carriles correspondientes a las células tratadas con prodigiosina y el de las células incubadas con PD98059, TPA y prodigiosina se observa el característico patrón en escalera del DNA de células apoptóticas, indicativo de que con el inhibidor de la activación de las ERKs se anula la acción protectora del TPA en las células tratadas con la prodigiosina. Por último, en los carriles correspondientes a células incubadas con el inhibidor PD98059 sólo o con TPA no se detecta fragmentación del DNA; estas últimas muestras sirvieron para comprobar que la fragmentación del DNA no era debida al efecto del PD98059 (fig. 5.8).

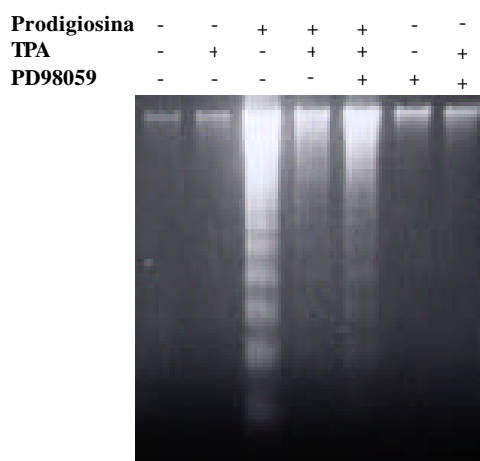


Fig.5.8. La activación de ERK1/2 inhibe la apoptosis inducida por la prodigiosina. Estudio del efecto protector del TPA y del inhibidor PD98059 (PD) en la apoptosis inducida por la prodigiosina mediante el ensayo de la fragmentación del DNA. Las concentraciones de las drogas utilizadas en este experimento fueron: 190 nM Prod, 100nM PD98059 y 50 nM TPA. El orden de carga fue el siguiente: C, TPA, Prod, Prod-TPA, Prod-TPA -PD, PD y TPA-PD.

Del análisis detallado del estudio de la viabilidad celular podemos concluir que el TPA protege a las células Jurkat de la pérdida de la viabilidad inducida por la prodigiosina y que el inhibidor PD98059 actúa por debajo de la acción protectora activada por el TPA a través de la vía de supervivencia regulada por la PKC, como se deduce al observar la bajada en la viabilidad celular tras combinar ambas sustancias con la prodigiosina (fig. 5.9).

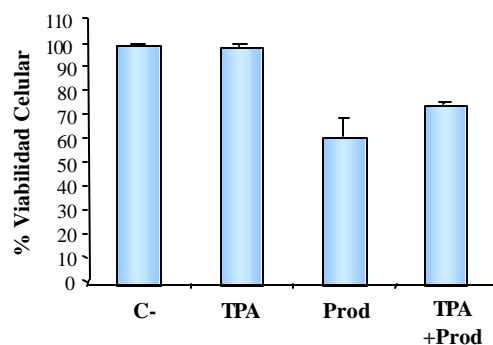


Fig.5.9. Inhibición del efecto de la prodigiosina sobre la viabilidad celular con TPA. Las condiciones utilizadas fueron células control (C-), tratadas con 50 nM TPA (TPA), células incubadas con 190 nM Prod (Prod) y la combinación de TPA y prodigiosina (TPA +Prod).

Al mirar el efecto de las distintas combinaciones de prodigiosina, TPA y PD98059 sobre la fragmentación de la PARP comprobamos que ésta sólo se había producido en las células tratadas con la prodigiosina (fig. 5.10).

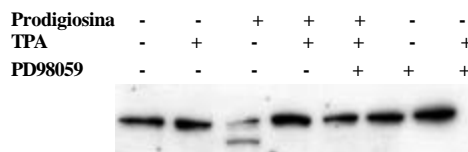


Fig. 5.10. Estudio de la fragmentación de la PARP. La proteólisis de la PARP fue determinada por Western blot en células control, en células tratadas con TPA y en tratadas con prodigiosina; también se ensayaron las combinaciones prodigiosina y TPA, prodigiosina-TPA-PD98059, sólo PD y TPA-PD. En cada carril, 50 μ g de proteína fueron resueltos en geles de acrilamida al 12%. Las concentraciones de las drogas utilizadas en este experimento fueron: 190 nM Prod, 100 nM PD98059 y 50 nM TPA.

También estudiamos por Western blot los posibles cambios sufridos en la fosforilación de proteínas clave en la vía de actuación de la PKC, las ERK1/2. Los resultados obtenidos al combinar la prodigiosina con el TPA y el PD98059 mostraron que se producía la fosforilación de ERK1/2, indicativo de que la vía de supervivencia se había activado, pues no encontramos activación basal de ERK1/2 en las células Jurkat ni tampoco fosforilación de ERK1/2 al

tratarlas con prodigiosina y sin embargo, si que había fosforilación de ERK1/2 en células tratadas con TPA y en menor medida en las tratadas con prodigiosina y TPA, activación que era inhibida totalmente por el inhibidor PD98059 (fig. 5.11.A).

Como control estudiamos la presencia de ERK1/2 en todas las muestras, y pudimos ver que dichas MAP quinasas están presentes por igual en todos los casos (Fig.5.11.B).

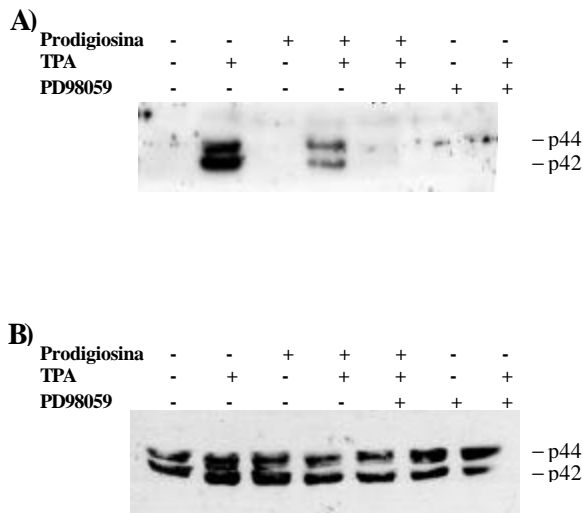


Fig. 5.11. Efecto del TPA y de la prodigiosina en la activación de las quinasas ERK1/2 50 µg de proteína fueron resueltos en geles de acrilamida al 12%. A) Estudio de las formas fosforiladas de ERK1/2; B) Expresión de ERK1/2. En ambos casos el estudio se hizo por Western blot en células control, tratadas con TPA o tratadas con prodigiosina; también se ensayaron las combinaciones prodigiosina y TPA, prodigiosina-TPA-PD98059, sólo PD y TPA-PD. Las concentraciones de las drogas utilizadas en este experimento fueron: 190 nM prodigiosina, 100 nM PD98059 y 50 nM TPA.

El conjunto de todos estos resultados obtenidos con el empleo de diferentes técnicas indican que la prodigiosina inhibe la fosforilación de ERK1/2 inducida por los ésteres de forbol (TPA).

5.5. EFECTO DE LA PRODIGIOSINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE c-Jun y c-Fos

Con el objeto de profundizar en el estudio de las vías de activación de las quinasas también miramos la expresión de los factores de transcripción c-Jun y c-Fos.

Para estudiar la posible variación en la expresión de estas dos proteínas en células tratadas con prodigiosina hicimos el estudio por Western blot con distintas concentraciones de prodigiosina y lo que vimos fue que la prodigiosina induce la expresión de ambos factores (fig. 5.12.A y B).

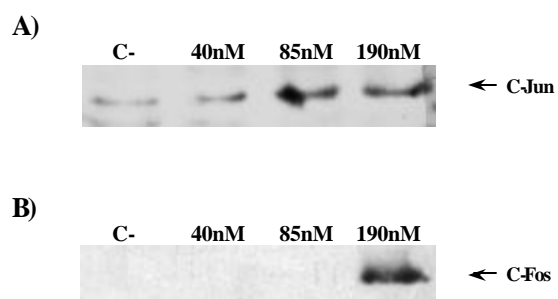


Fig.5.12. Western blot de los factores de transcripción c-Jun y c-Fos. En ambos casos las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de prodigiosina (0-190 nM) durante 3 horas. A) Western de c-Jun; B) Western de c-Fos.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido la caracterización de un principio activo de origen bacteriano con actividad apoptótica.

El trabajo aquí presentado abarca por un lado, la purificación e identificación de dicha molécula, la prodigiosina y por otro, el estudio del efecto apoptótico que induce a través del análisis de la citotoxicidad y de la muerte causada en varias líneas celulares, cancerosas y no cancerosas, así como de la caracterización del proceso molecular que desencadena en la célula a través del estudio de las principales vías de transducción de la señal apoptótica.

La célula cancerosa ha adquirido a lo largo de su vida una serie de mutaciones que actúan a modo de mecanismo de defensa ante la muerte y le confieren resistencia ante la mayoría de los tratamientos farmacológicos aplicados en la terapia contra el cáncer; sabemos que la acción antitumoral de muchos de estos agentes citotóxicos es debida principalmente a su acción inductora de la apoptosis, y es por esto que actualmente, la búsqueda de nuevas drogas capaces de inducir la muerte por apoptosis de las células tumorales es uno de los retos más importantes marcados en investigación, por sus posibles aplicaciones en el tratamiento de esta enfermedad. Solamente una de cada diez mil de estas drogas alcanzará la etapa final en el desarrollo de nuevos fármacos y podrá utilizarse en clínica, pero esto no quiere decir que las demás no hayan servido para nada; es sabido que muchos principios activos conocidos no pueden ser utilizados en pacientes, entre ellos la estaurosporina, siendo varios los motivos que impiden su aplicación en la terapia contra el cáncer, como por ejemplo su elevada toxicidad, cuestiones farmacocinéticas, etc. pero eso no ha impedido que estas moléculas se estén utilizando en la investigación de la apoptosis y del cáncer.

Nuestro grupo de investigación ha estado siempre interesado en el estudio del cáncer. Antes de introducirnos en el campo de la apoptosis estudiamos la relación del factor de crecimiento TGF- α (*transforming growth factor-alpha*) y de su receptor, el EGF-R (*epidermal growth factor-receptor*) con la malignidad de los tumores gastrointestinales. Cuando hace unos años empezamos a hacer el *screening* de posibles sustancias antitumorales producidas por la bacteria *Serratia marcescens*, prácticamente sin darnos cuenta nos fuimos implicando en el estudio del proceso de muerte por apoptosis en líneas tumorales de distinto origen. Lo que para algunos pudo parecerles en su momento un cambio de sentido muy brusco en nuestra línea de

investigación, para nosotros fue un proceso gradual, que se fue produciendo de una forma prácticamente imperceptible, simplemente nos dejamos llevar: como suele ocurrir en el campo de la investigación, un resultado nos llevó al siguiente paso y éste al siguiente y el producto final ha sido esta tesis doctoral.

ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y APOPTÓTICA DE UN EXTRACTO BACTERIANO

Estudios previos hechos en otro laboratorio indicaban que el mutante *S. marcescens* MG excretaba al medio de cultivo alguna sustancia de naturaleza peptídica con actividad antitumoral. A raíz de estas observaciones, en nuestro laboratorio realizamos una serie de ensayos con otras cepas que sirvieron para determinar que *S. marcescens* producía algún factor capaz de inducir la apoptosis en células en cultivo.

Estos ensayos fueron hechos con los sobrenadantes obtenidos a partir del cultivo en medio líquido de las cepas *S. marcescens* 2170 y ATCC 274. El efecto del sobrenadante concentrado de ambas cepas a los que llamamos CS-2170 y CS-274 fue estudiado en células en cultivo a través de los ensayos del MTT y del análisis de la fragmentación del DNA, que permiten conocer respectivamente el efecto de una droga sobre la viabilidad celular y en caso de que exista citotoxicidad, si ésta se produce a través de la inducción de la apoptosis. Como modelo celular para estos estudios utilizamos la línea celular Jurkat, por tratarse de una línea muy estudiada y empleada con frecuencia en el estudio de nuevos fármacos anticancerosos. Con estas pruebas vimos que las células tratadas sufrían una pérdida en la viabilidad celular de forma dosis-dependiente y que en ellas se había producido la fragmentación de su DNA genómico en múltiplos de 180 pb, resultados indicativos de que ambas muestras tenían un efecto citotóxico y que eran capaces de inducir la apoptosis.

El hecho de que las muestras procedentes de dos cepas distintas de *S. marcescens* tuviesen una acción similar sobre las células en cultivo, en ambos casos a través de la inducción de la apoptosis, indicaba que se trataba de un efecto común a ellas y posiblemente generalizable a la especie *S. marcescens*.

CARACTERIZACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO CON ACTIVIDAD APOPTÓTICA

Debido a que hacíamos los estudios con el sobrenadante concentrado (CS) procedente del cultivo de *S. marcescens* en medio PG, estas muestras podían contener LPS. El LPS, también conocido como endotoxina, es uno de los componentes estructurales de la membrana externa de las bacterias gram-negativas y es capaz de inducir la apoptosis (Seger & Krebs, 1995). Para descartar que el fenómeno apoptótico descrito fuese debido al LPS de *S. marcescens* lo que hicimos fue obtener la muestra 'CS' de *S. marcescens* NR1, cepa productora de un LPS mutado, que no produce antígeno O, región del LPS responsable de la inmunogenicidad de los gram-negativos.

El ensayo de la fragmentación del DNA en Jurkat hecho con CS-NR1 mostró que esta muestra tenía la capacidad de inducir apoptosis y por tanto, descartamos que este efecto pudiera ser atribuido al LPS de *S. marcescens*; además, este resultado reafirmaba nuestra hipótesis de que la capacidad de inducir apoptosis podía ser común a la especie *S. marcescens*.

Con el fin de aislar a la proteína supuestamente responsable de la inducción de la apoptosis, lo que hicimos fue pasar la muestra CS-2170 por una columna de Gel-filtración y de esta forma obtuvimos 100 fracciones, 95 de las cuales testamos por viabilidad; esta prueba nos sirvió para determinar que la citotoxicidad sólo se producía en unas determinadas fracciones, comprendidas entre F27 y F38, siendo F33 y F34 las que mostraban un mayor efecto citotóxico; el ensayo de la fragmentación del DNA realizado con las fracciones F33 y F34 confirmó que ambas inducían apoptosis, indicativo de que la sustancia apoptótica se encontraba en F27-F38 y que estaba más concentrada en las muestras F33 y F34.

Estudiamos también el patrón proteico de todas las fracciones, obtenido por electroforesis SDS-PAGE en geles de acrilamida teñidos con sales de plata, y de esta forma observamos una serie de proteínas presentes únicamente en las fracciones con actividad citotóxica y mayoritarias en las que tenían un efecto citotóxico mayor (F33 y F34).

Al repetir días mas tarde la separación proteica por electroforesis de las distintas fracciones resultó que las proteínas se habían degradado; a pesar de este hecho fortuito, el ensayo del MTT realizado paralelamente reveló que estas muestras mantenían su actividad. Este resultado sirvió para ponernos tras la pista de que la molécula con actividad apoptótica

presente en las fracciones tuviese naturaleza peptídica, por lo que realizamos diferentes ensayos para confirmar esta hipótesis.

Con el objeto de hidrolizar y degradar los péptidos y proteínas de la muestra sometimos a la fracción llamada F33/34 (F33+F34) a distintos tratamientos enzimáticos y térmicos y vimos que ni la acción de las proteasas ni del calor (llegando incluso a hervir la muestra durante quince minutos) sirvieron para que perdiera la actividad apoptótica, por lo que descartamos definitivamente la idea preconcebida de que la molécula inductora de la apoptosis fuese de naturaleza peptídica.

También hicimos pruebas con la muestra CS-2170, como precipitar su contenido proteico con TCA o tratarla con carbón activo. Los estudios de citotoxicidad hechos tras estos tratamientos dieron unos resultados que en un principio parecían contradictorios, pues la muestra que había sido precipitada con TCA no tenía efecto sobre las células en cultivo mientras que la tratada con carbón activo sí tenía actividad citotóxica, indicativo de que la capacidad de inducir apoptosis estaba relacionada con la presencia de proteínas en la muestra. La explicación que le dimos a este resultado fue sencilla: la molécula con actividad apoptótica se asociaba a las proteínas presentes en el medio de crecimiento de la bacteria y era por eso que: 1) al concentrar el sobrenadante obtenido tras cultivar durante dos días a la bacteria *S. marcescens* 2170 en medio PG líquido la molécula con actividad apoptótica quedaba retenida en las muestras llamadas CS; 2) con el TCA precipitaban las proteínas y por realizarse este proceso en medio ácido se favorecía la pérdida de las uniones inespecíficas entre proteínas y otras moléculas; 3) que la sustancia apoptótica era retenida por el carbón activo porque se conservaban las uniones inespecíficas con las proteínas.

En vista de que no estábamos buscando una proteína, aquellas proteínas que habíamos observado en las fracciones activas obtenidas por separación en columna de Gel-filtración de una muestra CS-2170 podrían ser a las que supuestamente se unía la molécula que buscábamos.

A diferencia de las fracciones que no tenían efecto sobre la viabilidad celular, observamos que las fracciones activas tenían una coloración rosada y que la intensidad del color era proporcional a la citotoxicidad de las mismas. Esta pigmentación era posiblemente debida al pigmento prodigiosina, sintetizado por *S. marcescens* y del que no se conoce aún la función que desempeña para la bacteria.

En aquel momento se acababa de publicar un trabajo en el que se describía que el pigmento cicloprodigiosina·HCl, obtenido de *Pseudomonas denitrificans*, actuaba como inmunosupresor y era inductor de la apoptosis (Kawauchi *et al.*, 1997); la importancia de este trabajo estaba en que dicho pigmento pertenece a la familia de las prodigiosinas (fig. 1), pero no encontramos ninguna referencia parecida para la prodigiosina; aún así, como ya habíamos descartado la naturaleza peptídica de la molécula apoptótica, quisimos estudiar la relación entre la prodigiosina y la actividad apoptótica del sobrenadante de *S. marcescens*. En el fondo eran varias las razones que justificaban este estudio:

- 1) Las condiciones de cultivo de *S. marcescens* utilizadas para obtener el sobrenadante y con él las muestras CS eran las más indicadas para que la bacteria pigmentara: cultivos realizados a 30 °C, ventilados (con agitación) y con 48 horas de incubación (prodigiosina es un metabolito secundario, formado principalmente cuando el cultivo ha alcanzado la fase de crecimiento estacionario)
- 2) La molécula prodigiosina es estable a 100°C y al tratamiento con proteasas (Boger & Patel, 1988)
- 3) Se había descrito para otros miembros de la familia de las prodigiosinas una actividad inmunosupresora (Tsuji *et al.*, 1992; Kawauchi *et al.*, 1997; Songia *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998)
- 4) El trabajo de Kawauchi *et al.*, (1997) era el único en el que se demostró que la inmunosupresión causada por cicloprodigiosina era debida a la inducción de apoptosis; dicho estudio se ha visto reforzado este último año por la publicación de otros trabajos en los que se ha estudiado la inducción de apoptosis en varias líneas celulares con cicloprodigiosina (Azuma *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2000a y b; Melo *et al.*, 2000)
- 5) En la década de los 60 se demostró, al hacer una extracción de prodigiosina en medio acuoso, que ésta se asociaba con proteínas de alto peso molecular (Cruz-Camariño & Sánchez-Zúñiga, 1968), lo que apoyaba nuestras explicaciones acerca del por qué las muestras CS tenían actividad apoptótica y que esta función se perdiese al tratarlas con carbón activo (prodigiosina se mantenía asociada a las proteínas en estas condiciones, pH neutro), y también del por qué en medio ácido, al precipitar la muestra con TCA, se perdía esta asociación y por tanto, el precipitado de proteínas no tenía actividad apoptótica.

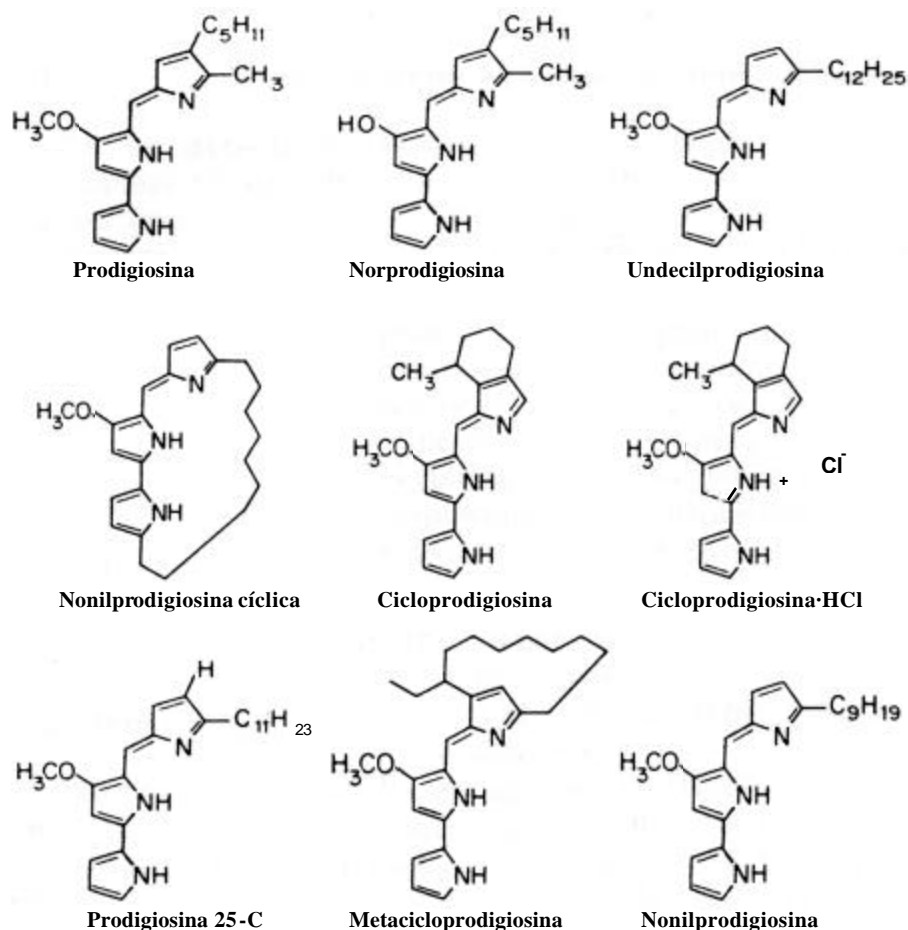


Fig. 1. Miembros de la familia de las prodigosinas.

Para ver si existía alguna relación entre la inducción de la apoptosis obtenida con el sobrenadante de *S. marcescens* y la prodigosina estudiamos la capacidad de inducir apoptosis de tres cepas deficientes en su biosíntesis. Cada uno de estos mutantes, *S. marcescens* OF, WF y 933 es capaz de sintetizar un precursor diferente de prodigosina: el mutante OF forma un compuesto tripirrólico, la norprodigosina, que se diferencia de la prodigosina únicamente en que en lugar de un grupo metoxi presenta un grupo hidroxilo en el segundo anillo; *S. marcescens* 933 llega hasta la síntesis del bipirrol MBC y el mutante WF forma el monopirrol MAP (ver ‘Introducción’, pág. 37, fig. 2).

Al ensayar la capacidad apoptótica de las muestras CS obtenidas del cultivo de los tres mutantes observamos que sólo CS-OF inducía la apoptosis, aunque la intensidad del efecto fue

menor a la producida por CS-2170; las muestras CS-WF y CS-933 no mostraron una actividad significativa a las mismas concentraciones. Estos resultados nos permitieron llegar a las siguientes conclusiones: 1) la molécula responsable de la actividad apoptótica de *S. marcescens* 2170 era supuestamente prodigiosina (faltaba purificar e identificar el pigmento); 2) la norprodigiosina, pigmento producido por *S. marcescens* OF, era también una molécula inductora de la apoptosis aunque menos eficiente que prodigiosina.

Existe una fórmula descrita por Goldschmidt y Williams (1968) que permite cuantificar la prodigiosina obtenida tras hacer su extracción de la bacteria con metanol ácido. Con esta fórmula determinamos la concentración de prodigiosina presente en las muestras CS-2170 y comprobamos que se trataba de método cuantitativo válido para este tipo de muestras. Para ello comparamos el efecto apoptótico producido por una muestra CS-2170 y otra llamada SV-2170, obtenida siguiendo el método descrito en Goldschmidt & Williams (1968) y de esta forma pudimos ver que la inducción de la apoptosis era similar a igualdad de concentración de prodigiosina. Esto supuso para nosotros un gran avance pues hasta ese momento habíamos cuantificado las muestras según la cantidad de proteína, pues al principio de este estudio pensábamos que la molécula apoptótica presente en el cultivo era de naturaleza peptídica.

Como las muestras a las que llamamos SV contenían menos impurezas que las CS y además eran obtenidas siguiendo el método descrito en la literatura para la obtención de la prodigiosina empezamos a utilizarlas en nuestros ensayos.

PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LA PRODIGIOSINA

Los resultados obtenidos apuntaban a la prodigiosina como a la molécula sintetizada por *S. marcescens* con actividad apoptótica, pero antes de hacer esta afirmación teníamos que purificar el pigmento e identificarlo, pues faltaba confirmar que el pigmento formado por *S. marcescens* 2170 fuese realmente prodigiosina y no otra molécula parecida y estudiar el efecto del pigmento puro.

Para hacer la identificación del pigmento partimos de una muestra obtenida al hacer una extracción con metanol:HCl y con ella se procedió en primer lugar a su análisis por ESI-MS, el cual mostró un pico mayoritario correspondiente a m/z 324,4 (M+H)⁺ que podría

corresponderse a la prodigiosina (323,4 Da). Una vez purificado el pigmento por HPLC y hecho su análisis por RMN- H^1 comprobamos que realmente se trataba de la prodigiosina (Boger & Patel, 1988).

La prodigiosina pura fue testada en Jurkat y NIH-3T3. Ensayamos su efecto sobre la viabilidad celular y su actividad apoptótica de forma cualitativa a través del análisis de la fragmentación del DNA y de la tinción de la cromatina con Hoechst 33342 y cuantitativamente por citometría de flujo, utilizando como marcadores la anexina V-FITC y el IP. Estas pruebas sirvieron para confirmar que la prodigiosina era la molécula con actividad apoptótica que estábamos buscando.

EFFECTO DE LA PRODIGIOSINA EN LÍNEAS CELULARES CANCEROSAS Y NO CANCEROSAS

Inicialmente vimos que la muestra llamada CS-2170 tenía un efecto citotóxico mayor en la línea cancerosa Jurkat que en la línea no cancerosa NRK. A partir de este resultado quisimos determinar si existían diferencias en cuanto a la sensibilidad frente a la prodigiosina entre células tumorales y células consideradas normales y también ver que tipo de tumores que eran más sensibles al efecto de prodigiosina. Para resolver estas cuestiones incubamos diversas líneas celulares cancerosas y no cancerosas de distinta naturaleza y origen con las muestras que contenían prodigiosina y estudiamos su efecto a través del estudio de la viabilidad celular, la fragmentación del DNA y la tinción con los colorantes Hoechst 33342 y IP. La limitación de estos estudios radica en que utilizamos como líneas no cancerosas líneas celulares establecidas, de las que es sabido que no pueden considerarse células normales del todo si bien no han perdido la inhibición por contacto ni el control de la proliferación.

En la mayoría de los cánceres más importantes los avances en los tratamientos son pequeños (estómago, colon, etc.) o prácticamente nulos (melanoma, mama, pulmón, etc.). Por esta razón quisimos testar el efecto de la prodigiosina en líneas celulares derivadas de cánceres con elevados índices de mortalidad y que se caracterizan por su agresividad, su resistencia a los tratamientos actuales y en muchos casos por la falta de tratamientos específicos. Las líneas celulares cancerosas utilizadas en este estudio fueron de origen hematopoyético,

gastrointestinal, mamario y de piel; a su vez, las líneas no cancerosas estudiadas fueron epiteliales y fibroblastos.

El efecto de la prodigiosina fue analizado en varias líneas humanas pertenecientes a los tres tipos de cánceres generados por células de la sangre: leucemias, linfomas y mielomas. Todas las líneas estudiadas fueron sensibles a la apoptosis inducida por la prodigiosina. Para comparar la sensibilidad de estas células frente a la prodigiosina calculamos el valor de la IC_{50} en todas ellas y de esta forma pudimos determinar que la línea celular más sensible al efecto de prodigiosina era Jurkat (180 nM prodigiosina), seguida de HL-60 y Ramos (400 nM prodigiosina), Molt-4 (440 nM prodigiosina) y por último NSO (1100 nM prodigiosina), de forma que para alcanzar una disminución en la viabilidad celular del 50%, la línea Jurkat, procedente de una leucemia de linfocitos T, necesitó una sexta parte de la droga requerida por NSO, células de mieloma humano, 2,5 veces menos que Molt-4, proveniente de una leucemia linfoblástica aguda, y casi la mitad que HL-60 y Ramos, derivadas respectivamente de una leucemia promielocítica y de un linfoma de Burkitt.

El estudio del efecto de prodigiosina en cánceres gastrointestinales se hizo en dos líneas derivadas de adenocarcinomas de colon, SW-620 y DLD-1 y en una línea procedente de un tumor gástrico maligno, HGT-1. Estos ensayos sirvieron para determinar que todas estas células eran sensibles a la inducción de la apoptosis con prodigiosina. En estos tres casos los valores de las IC_{50} frente a la prodigiosina fueron de 275 nM para SW-620, 2200 nM en DLD-1 y 3100 nM para HGT-1, indicando que la línea más sensible de todas ellas a la acción de prodigiosina era SW-620, necesitando 8 veces menos concentración de droga que DLD-1 y una onceava parte que la requerida por HGT-1; el ensayo de la viabilidad celular también sirvió para ver que en todos los casos, las células tratadas con cantidades crecientes de prodigiosina mostraban un descenso constante en cuanto al número de células viables.

Los estudios hechos en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama mostraron que estos tumores también son sensibles a la activación de la apoptosis con prodigiosina. El valor de la IC_{50} obtenido al hacer el estudio de la viabilidad celular fue de 2000 nM prodigiosina.

La inducción de la apoptosis en una línea procedente de un carcinoma epidermoide, la A431, es un resultado indicativo de que este tipo de tumores también puede considerarse sensible a la prodigiosina. La IC_{50} para esta línea celular fue de 925 nM prodigiosina.

En los estudios realizados con las líneas celulares no cancerosas tuvimos que utilizar concentraciones más elevadas de prodigiosina. Los resultados obtenidos con estas líneas celulares, ya fuera en fibroblastos (líneas NIH-3T3, NRK y Swiss-3T3) o en células epiteliales (MDCK), mostraron que la sensibilidad a la acción de prodigiosina de estas células no cancerosas era muy inferior a la de las líneas tumorales ensayadas. Los valores de la IC_{50} de prodigiosina para estas líneas fueron de 2800 nM en NRK, 3000 nM en MDCK y 3400 nM en Swiss-3T3, mientras que para NIH-3T3 la prodigiosina no mostró actividad citotóxica a las concentraciones utilizadas, siendo la dosis máxima de este estudio 3800 nM. Los ensayos de fragmentación del DNA, utilizando para ello una concentración de 2200 nM prodigiosina, tampoco mostraron inducción de la apoptosis mientras que en las líneas celulares cancerosas siempre detectamos la típica fragmentación en escalera a concentraciones menores, del orden de 800 a 1600 nM prodigiosina según la línea.

La prodigiosina actuó induciendo la apoptosis en líneas celulares cancerosas de origen hematopoyético, gastrointestinal, mamario y de piel. También comprobamos que la prodigiosina es citotóxica e induce apoptosis en líneas no cancerosas epiteliales y en fibroblastos aunque en estas líneas no tumorales fueron necesarias dosis de prodigiosina mayores para ver estos efectos; aún así, mientras que la prodigiosina fue eficiente en todas las líneas cancerosas estudiadas no ocurrió lo mismo en las no tumorales. Las líneas derivadas de células del torrente sanguíneo fueron las que tuvieron una mejor respuesta junto con SW-620, un adenocarcinoma de colon, mientras que la línea cancerosa de peor respuesta fue la gástrica HGT-1, resultado esperado ya que los tumores gástricos son los más resistentes a los tratamientos con quimioterapia; de todas formas HGT-1 mostró una sensibilidad mayor que Swiss-3T3 y NIH-3T3. La prodigiosina también fue capaz de inducir la apoptosis en la línea cancerosa de mama con características epiteliales MCF-7 y en el carcinoma epidermoide A431, necesitando en ambos casos aproximadamente una tercera parte de la concentración de prodigiosina requerida por la línea epitelial no cancerosa MDCK.

Esta desproporción en cuanto al grado de citotoxicidad de prodigiosina entre las líneas celulares cancerosas y las no cancerosas apuntan a que hay una selectividad de la prodigiosina por las células tumorales, resultado que la señala como a un posible candidato antitumoral.

PROCESO APOPTÓTICO INDUCIDO POR LA PRODIGIOSINA

La prodigiosina actúa de forma independiente a p53

Nosotros hemos visto que prodigiosina induce apoptosis en varias líneas celulares cancerosas que tienen mutada p53, tal es el caso de las linfocitarias Jurkat y HL60, en los adenocarcinomas SW-620 y DLD-1 y en las células de carcinoma epidermoide A431, indicativo de que el mecanismo inductor de la apoptosis de la prodigiosina es independiente de la acción de p53.

En estudios realizados con células procedentes de un mismo donante que se diferenciaban en el estado de p53 (las hay que presentaban la forma nativa de p53 y otras con una p53 mutada) se vió que se podía inducir igualmente la apoptosis aunque generalmente este proceso ocurría a tiempos más largos que la apoptosis dependiente de p53 (Huang *et al.*, 1998; Bracey *et al.*, 1995), en parte posiblemente por su papel como factor de transcripción y como sensor del daño causado en la regulación de la proliferación y de la muerte celular.

El gen *p53* se encuentra mutado aproximadamente en el 50% de los tumores humanos. Estas mutaciones suelen ocurrir en fases relativamente tardías del desarrollo tumoral y causan la inactivación de la proteína p53; la consecuencia en todos estos casos es que se ven alterados varios procesos fundamentales para la célula que conducirán al incremento en la capacidad de proliferación, disminución de la apoptosis, aumento de la inestabilidad génica, potenciación de la angiogénesis y a una mayor resistencia a la quimioterapia (Hollstein *et al.*, 1994; Donehower *et al.*, 1992).

Muchas de las drogas que se están utilizando hoy en día en el tratamiento del cáncer necesitan de una p53 funcional para actuar. Tal es el caso del 5-fluorouracilo (5-FU), terapia coadyuvante de elección para el tratamiento del cáncer colorectal (Bunz *et al.*, 1999; Lowe *et al.*, 1993), la camptotecina (Li *et al.*, 2000), el cisplatino (Righetti *et al.*, 1999; Zamble *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998), el Pt(IV)-bis (monoglutarato), otro compuesto con platino menos tóxico que el anterior (Pérez *et al.*, 1999), la adriamicina y el etopósido (Lowe *et al.*, 1993; Lutzker & Levine, 1996), el ketoconazol (Ho *et al.*, 1998), la bleomicina y la actinomicina D (Gibson *et al.*, 1998), la citosina arabinósido (Zhang *et al.*, 1999; McArthur, 1997), el TNP-470, que es un análogo de la fumagillina (Zhang *et al.*, 2000), etc. Otros agentes inductores de la apoptosis

funcionan mejor en células que presentan una p53 funcional, necesitando concentraciones menores que en el caso de p53 mutadas, como el taxol o paclitaxel (De Feuris *et al.*, 2000; Gururajanna *et al.*, 1999;), la gemcitabina (Casallo *et al.*, 2000), el PEITC (fenetil isotiocianato) (Huang *et al.*, 1998), etc. El hecho de que muchas de estas drogas sean el tratamiento de elección en determinados tumores y de que no exista una quimioterapia alternativa es la causa de que antes de aplicar un tratamiento antitumoral, en muchos casos se mire primero el estado de p53 en el tumor a tratar (Mowart, 1998).

El que una droga actúe de forma independiente al estado de p53 supone una gran ventaja frente a muchos de los tratamientos actuales y abre las puertas al tratamiento de muchos tumores hasta el momento intratables con quimioterapia. El hecho de que prodigiosina actúe de forma independiente a p53 hace de ella un candidato interesante para su estudio como posible agente anticanceroso.

Activación de las caspasas

Las caspasas son las moléculas efectoras de la apoptosis. Según sea la señal inductora de este proceso de muerte se podrá activar la apoptosis principalmente a través de dos vías: la vía dependiente de la mitocondria y la vía de los receptores de muerte presentes en la membrana citoplasmática (Green & Reed, 1998). Nosotros hemos estudiado la activación de varias caspasas en la apoptosis inducida por la prodigiosina y su implicación en el proceso apoptótico a través de diferentes técnicas.

Los ensayos por Western blot de las caspasas nos han servido para comprobar que en células tratadas con prodigiosina se produce el procesamiento de la caspasas 9, 3 y 8, de forma que parece que las dos principales vías de inducción de la apoptosis se activarían con prodigiosina. La activación de la caspasa 8 podría ser debida a que la señal apoptótica siguiera la vía extrínseca o ruta de los receptores de muerte; esta vía permite a su vez activar la vía intrínseca o dependiente de la mitocondria a través de Bid y de esta forma se produciría la activación de la pro-caspasa 9. Por otra parte, la activación de la caspasa 9, que depende de la liberación del citocromo C mitocondrial, permitiría activar a la caspasa 8 (entre otras) a través de la caspasa 3 (fig.2).

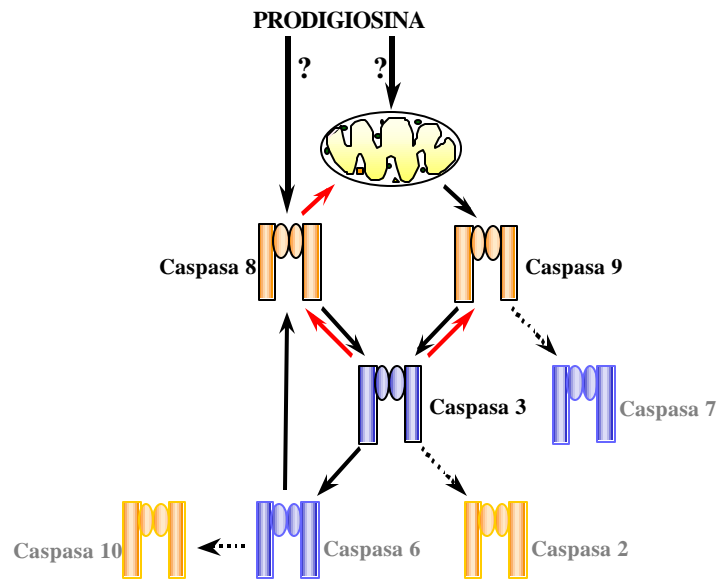


Fig.2. Prodigiosina induce la activación de las caspasas. Posibles caminos: a partir de la activación de la caspasa 8 o de la caspasa 9. Las flechas negras indican una activación directa mientras que las de color rojo representan un mecanismo de amplificación de la señal por retroalimentación que tiene la célula para asegurar la apoptosis; las caspasas 2, 8, 9 y 10 son iniciadoras (de color naranja), mientras que las caspasas 3, 6 y 7 son ejecutoras (de color azul). En discontinuo se señalan los procesos que seguramente se dan aunque no los hemos probado.

El orden de activación de las caspasas 8 y 9 no puede ser determinado con la información de que disponemos pues la activación de las caspasas comporta una amplificación de la señal por retroalimentación, mecanismo que sirve para garantizar la muerte de la célula (Slee *et al.*, 1999). De todas formas, más adelante volveremos a este punto.

También analizamos la salida del citocromo C de la mitocondria en el tratamiento con prodigiosina. Mediante la técnica del Western blot observamos la presencia de citocromo C en la fracción citoplasmática de células Jurkat tratadas con prodigiosina.

El citocromo C es un transportador de electrones presente en el espacio intermembrana de la mitocondria (IMS) que ante la llegada de determinados estímulos apoptóticos es liberado al citosol; en este espacio se unirá a la proteína activadora de caspasas Apaf-1 para formar un complejo y poder activar así a la caspasa 9, dando lugar a la consecuente activación de la cascada de caspasas y a que se induzca finalmente la apoptosis (Slee *et al.*, 1999).

El estudio de la fragmentación de la PARP y el empleo de inhibidores de las caspasas nos han servido también para confirmar la activación de la apoptosis y la implicación de las caspasas en este proceso de muerte celular. En células tratadas con la prodigiosina hemos visto que se produce la proteólisis de este sustrato de las caspasas, indicativo de que en este proceso apoptótico se produce la activación de estas proteasas.

El empleo del Z-VAD.fmk, un inhibidor global de las caspasas, nos ha servido para ver que con él se producía el bloqueo de la apoptosis inducida por prodigiosina, resultado que muestra que la activación de las caspasas es esencial para que se produzca la muerte por apoptosis de estas células.

La prodigiosina actúa de forma independiente a la acción protectora de Bcl-2

Uno de los caminos que puede seguir una señal de muerte en la célula es la vía que lleva a la disfunción de los orgánulos, siendo la desorganización mitocondrial la más conocida (Vaux & Korsmeyer, 1999; Green & Reed, 1998; Thornberry & Lazebnik, 1998); a este nivel Bcl-2 juega un importante papel, pues existe un equilibrio entre los miembros pro-apoptóticos y los anti-apoptóticos de su familia que actuará como punto de control de muerte o "*death checkpoint*"; la sobreexpresión de Bcl-2 inclinará este equilibrio a favor de la supervivencia de la célula, por lo que este fenómeno se asocia con la resistencia a drogas antitumorales (Israels & Israels, 1999).

Hemos visto que la acción apoptótica de la prodigiosina es independiente de la sobreexpresión de *bcl-2*, pues induce apoptosis con la misma eficiencia en células Jurkat transfectadas de forma estable con *bcl-2* que en Jurkat no transfectadas (con una expresión normal de Bcl-2). Una explicación a este comportamiento podría ser que el equilibrio entre los miembros anti-apoptóticos y pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 estuviese desplazado a favor de los segundos. En el caso de líneas celulares derivadas de células hematopoyéticas se ha implicado como miembro pro-apoptótico a Bax (Brimmel *et al.*, 1998; Clow *et al.*, 1998); podría ser que en respuesta al tratamiento con prodigiosina se vieran modificados los niveles de Bax o de otro miembro pro-apoptótico de la familia, lo que explicaría la pérdida del equilibrio Bcl-2/Bax a favor de la apoptosis, pero concretamente en Jurkat, la línea celular más sensible a la prodigiosina de todas las que hemos estudiado, además de *p53* (Vigorito *et al.*, 1999; Chen & Haas, 1990) también tiene mutado *bax* (Meijerink *et al.*, 1991); esta doble

mutación tendría que hacer a estas células, por definición, muy resistentes a la muerte por apoptosis (Israels & Israels, 1999).

Bcl-2 es también un sustrato de las caspasas; la activación de las caspasas produce la pérdida de su extremo amino-terminal que actuará como inductor de la apoptosis a través de la activación de otras caspasas (Cheng *et al.*, 1997); este mecanismo tendría la misma finalidad que la fragmentación de la PARP, que es la de asegurar la muerte de la célula y podría explicar también por qué la sobreexpresión de Bcl-2 no protege a la célula del efecto apoptótico de la prodigiosina.

El hecho de que el mecanismo de inducción de la apoptosis activado por la prodigiosina sea independiente de ambas moléculas protectoras, p53 y bcl-2, es una ventaja sobre otras drogas utilizadas hoy en día en el tratamiento del cáncer.

La prodigiosina es un inhibidor de la PKC

La activación de las JNKs, p38 y de las ERKs puede ser crítica para la apoptosis de la célula; la activación de las ERKs es capaz de anular la respuesta apoptótica de las otras dos quinasas y es posible que este proceso regulador no sea tanto debido a una cuestión cuantitativa sino cualitativa de las señales que se expresen (Xia *et al.*, 1995; Rincón *et al.*, 2000).

Del análisis de los estudios realizados con el TPA, un éster de forbol que activa la PKC, podemos concluir que en células tratadas con TPA y prodigiosina se consigue la protección frente a la inducción de la apoptosis, supuestamente a través de la activación de la PKC. Este efecto protector podría ser debido a la activación de las ERK1/2 pues hemos visto que utilizando un inhibidor específico de su activación, el PD98059, se consigue de nuevo inducir la apoptosis con prodigiosina.

Queda pendiente estudiar la activación de JNK y de p38, que conduciría seguramente a la muerte celular y de esta forma determinar si la prodigiosina es capaz de activar alguna de estas vías de transducción de la señal apoptótica. De todas formas hemos visto como la prodigiosina induce el aumento de la expresión de c-Jun, factor regulado vía JNK y también de

c-Fos; ambos hechos tendrán posiblemente como resultado un refuerzo en la inducción de la apoptosis a través del complejo AP-1.

La prodigiosina induce cambios en el citoesqueleto

Una observación que nos pareció muy interesante fue un hecho común a las células que crecían adheridas a la base de la placa de cultivo, tanto cancerosas como no cancerosas y era que al ser tratadas con prodigiosina, a dosis que incluso no tenían efecto en la viabilidad de las células, el primer cambio que se apreciaba era que se desenganchaban de la placa pero permanecían unidas entre ellas (esta unión se perdía a dosis elevadas). En estas células hicimos una prueba consistente en lavarlas y ponerlas en medio fresco una vez desenganchadas de la base de la placa de cultivo y vimos que se volvían a adherir, revertiendo el efecto.

Es sabido que la pérdida del contacto de una célula con las vecinas o con la matriz extracelular puede llegar a inducir la apoptosis de la célula (*anoikis*) (Ruoslahti, 1997); a este fenómeno se le conoce con el nombre de dependencia al anclaje y es necesario para el crecimiento y la supervivencia de la célula. Al poder revertir el efecto de la prodigiosina la apoptosis que induce podría ser debida a la pérdida del anclaje pero no al revés; aun así estos estudios no permiten saber si la apoptosis inducida por la prodigiosina es consecuencia directa de la pérdida de la adhesión celular o si por el contrario es activada por otras vías.

En nuestro laboratorio se ha estudiado la relación entre la prodigiosina y los cambios en el citoesqueleto que tienen lugar durante la apoptosis y hemos visto que la prodigiosina induce la reorganización del citoesqueleto de actina, posible causa de la pérdida de los contactos focales que actúan como puntos de anclaje de los filamentos de actina a la membrana en las células en cultivo (Díaz-Ruiz *et al.*, en prensa).

También hemos visto que el efecto apoptótico de la prodigiosina es prácticamente nulo cuando las células son tratadas previamente con el éster de forbol TPA, un potente activador de la PKC. Este fenómeno puede estar relacionado con el anclaje de las células y las integrinas. Las integrinas son unas proteínas de transmembrana que unen elementos estructurales como los filamentos de actina con la matriz extracelular a través de otras proteínas, que también pueden activar ciertas vías de transmisión de señal como la vía de la PKC (Clark & Brugge, 1995). La pérdida de la integridad de las integrinas podría explicar esta falta de efecto.

OTROS ESTUDIOS REALIZADOS CON LA PRODIGIOSINA

Hemos querido incluir en este apartado una serie de resultados obtenidos en nuestro laboratorio que no pertenecen a este trabajo, pero que serán muy útiles para explicar el mecanismo de acción de la prodigiosina.

La prodigiosina es un inhibidor de la Topoisomerasa I

Estudios realizados en nuestro laboratorio han servido para demostrar que la prodigiosina es una droga que interacciona con el DNA e inhibe la DNA Topoisomerasa I (Ollinger *et al.*, manuscrito en preparación). Las DNA topoisomerasas son unas enzimas que actúan relajando el DNA superenrollado haciendo cortes en una de las cadenas del DNA; la Topoisomerasa I participa en los procesos de la replicación del DNA, la transcripción del RNA, la recombinación del DNA, en la condensación de los cromosomas y en el mantenimiento de la estabilidad genómica. Se ha visto una sobreexpresión de esta enzima en multitud de tumores y en varias líneas celulares, entre ellas Jurkat, hecho que sugiere la importancia que debe tener para las células el mantener los niveles normales de esta proteína (Chen *et al.*, 2000). En su trabajo, Chen y cols. (2000) describen que ni en Jurkat ni en otras líneas tumorales encontraron actividad de la enzima responsable de la degradación de la Topoisomerasa I, posiblemente una *trypsin-like serine protease*, lo que explicaría su incremento en las células cancerosas.

Hoy en día está demostrando que los inhibidores de las topoisomerasas son muy eficaces en el tratamiento del cáncer (Huang & Pardee, 1999; Ferrante *et al.*, 1999; Kollmannsberger *et al.*, 1999; Pindur & Lemster, 1998) incluso en tumores que se saben resistentes a la quimioterapia convencional como el cáncer de estómago (Tsunoda *et al.*, 1999). Se ha probado también la combinación de drogas antitumorales como el 5-FU con inhibidores de las topoisomerasas (Rothenberg & Blanke, 1999; Armand *et al.*, 1999), obteniéndose unos resultados muy prometedores.

Ante la sugerencia de que la diana terapéutica de prodigiosina podría ser la Topoisomerasa I estamos estudiando la relación entre la actividad de la prodigiosina y el ciclo celular.

La prodigiosina inhibe el ciclo celular

Para saber si la prodigiosina interviene en la proliferación celular hemos estudiado su efecto sobre la incorporación de timidina- ^3H en células Jurkat y hemos visto que al tratarlas con prodigiosina se produce una inhibición en la síntesis de DNA proporcional a la pérdida de la viabilidad, resultado que confirma que la prodigiosina inhibe la proliferación celular y que este proceso tiene lugar de forma dosis-dependiente. Para poder conocer en qué momento del ciclo está interviniendo nuestra droga también hemos estudiado varias moléculas importantes en la regulación del ciclo celular.

Sabemos que p53, molécula responsable del control del ciclo celular, está mutada en la mayoría de las líneas celulares que hemos estudiado entre las que se encuentra Jurkat, las células con las que se están haciendo estos estudios. Al inducirle un daño en una célula p53 actuaría promoviendo la parada del ciclo en G1 hasta que el daño fuese reparado; para ello lo que haría sería inducir la expresión de p21, un inhibidor de las CDKs. La inhibición de varios complejos ciclina-CDK (ciclina D-CDK4, ciclina D-CDK6 y ciclina E-CDK2) tendría como consecuencia la inhibición de la fosforilación de Rb, impidiendo así la liberación de E2F y por tanto que este factor indujera la transcripción de proteínas necesarias para entrar en fase S (fig.3) (revisado en Israels & Israels, 1999). En el caso de que el daño celular fuese irreparable p53 induciría la apoptosis de la célula a través de la vía Bcl2/Bax.

Como p53 no es funcional en Jurkat lo que hemos hecho ha sido mirar qué ocurre a nivel de p21y Rb y hemos visto que en las células tratadas con prodigiosina se inhibe la fosforilación de Rb y la expresión de p21 (en este último caso, previa estimulación con TPA).

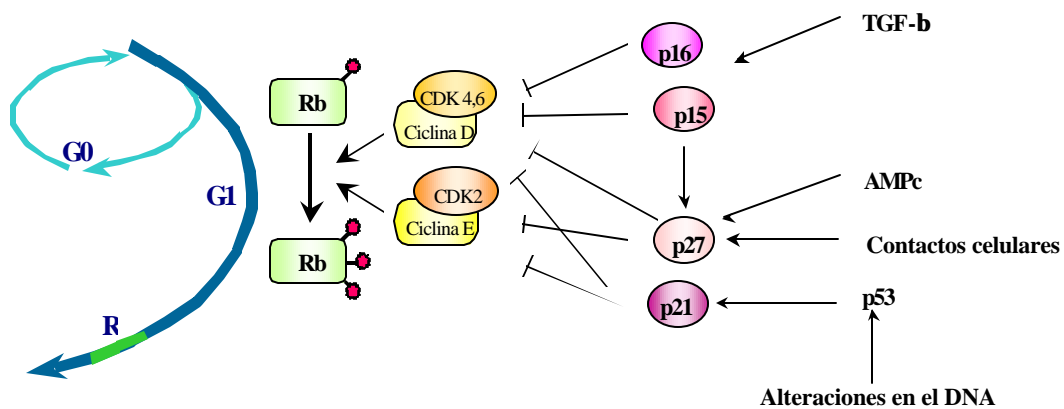


Fig. 3. Regulación de G1 a través de la hiperfosforilación de Rb: inhibición y control de esta etapa del ciclo celular por señales externas.

La prodigiosina también inhibe la expresión de p27, posiblemente a través de su acción sobre los contactos focales. p27 es un inhibidor de la actividad CDK2 y un modulador de la apoptosis, ya que la falta de expresión de p27 en condiciones como sería la ausencia de factores de crecimiento, una situación de estrés celular, se ha relacionado recientemente con la apoptosis de la célula (y la parada de ciclo) a través del control de los complejos ciclina-CDK: si la actividad de ciclina E-CDK2 no se ve modificada la célula será conducida a la apoptosis, mientras que si la actividad ciclina E-CDK2 se incrementa la célula entrará en la fase S del ciclo celular; en ambos casos se ha visto que se produce un aumento en la actividad de ciclina A-CDK2 (Hiromura *et al.*, 1999).

Dada su importancia en la regulación del ciclo celular hemos mirado qué ocurre a nivel de varias ciclinas y CDKs que actúan a nivel de G1 y en la transición G1-S. De momento hemos visto que la prodigiosina inhibe la expresión de la ciclina E pero no tiene efecto sobre la ciclina A; también hemos comprobado que la actividad de CDK2 decrece significativamente en células tratadas, mientras que la expresión tanto de CDK2 como de CDK4 no parece modificarse. Estos resultados indican que los complejos ciclina E/CDK2 necesarios para el inicio de la fase S, y los de ciclinaA/CDK2 que controlan la elongación de la síntesis de DNA, se inhiben con prodigiosina.

Estos datos parecen indicar que la prodigiosina inhibe el ciclo celular porque bloquea la entrada en S, actuando a nivel G1tardío-S; además, la inhibición de la síntesis de DNA se vería reforzada a través de su mecanismo inhibidor de la Topoisomerasa I.

Parte de estos resultados concuerdan con la descripción del mecanismo descrito para la undecilprodigiosina (UP) (Songia *et al.*, 1997). Ambas moléculas, UP y prodigiosina, inhiben la fosforilación de Rb e inhiben la proliferación; además, la UP impide la entrada de las células en la fase de síntesis del DNA (fase S). También se ha descrito para la prodigiosina 25-C (PrG), otro miembro de esta familia, que inhibe la respuesta mitogénica de esplenocitos de ratón y el crecimiento del linfoma de células T (Tsuji *et al.*, 1990; Kataoka *et al.*, 1992).

LA PRODIGIOSINA TIENE UN MECANISMO DE ACTUACIÓN DIFERENTE AL DE OTROS MIEMBROS DE SU FAMILIA

Se ha visto un efecto opuesto en células Jurkat estimuladas con ésteres de forbol y tratadas con otros miembros de la familia de las prodigiosinas; en el caso de células tratadas con cicloprodigiosina-HCl (cPrG-HCl) se produce un aumento en la muerte celular con respecto a las tratadas únicamente con cPrG-HCl (Kawauchi et al., 1997; Azuma et al., 2000), mientras que nosotros hemos visto que en células tratadas con TPA y prodigiosina se inhibe la muerte inducida por la prodigiosina.

El PNU156804, un análogo de la UP, actúa también inhibiendo la expresión del complejo transcripcional AP-1 que puede formarse por la heterodimerización de Jun y Fos (Mortellaro *et al.*, 1997). Nosotros hemos mostrado que prodigiosina induce la expresión de ambos factores de transcripción, c-Jun y c-Fos, resultado que se contradice con el obtenido con el PNU156804.

Los estudios de Songia y cols. (1997) demuestran que la UP actúa disminuyendo los niveles de CDK4 (estudio hecho por Western blot, no por actividad) y de ciclina A. Mortellaro y cols (1999) describen en mismo mecanismo de actuación para el PNU156804. Contrariamente a estos resultados, nosotros no hemos visto cambios en la expresión de CDK4 ni de ciclina A con prodigiosina. Tanto UP como su análogo PNU156804 no tienen efecto sobre la expresión de p27 (Songia *et al.*, 1997; Mortellaro *et al.*, 1999); contrariamente, nuestros estudios indican que prodigiosina actúa inhibiendo los niveles de ambas proteínas. Estas diferencias nos hacen pensar que ambas moléculas interfieren con ciclo celular en puntos diferentes: UP y PNU156804 inhiben el ciclo celular en el punto G1 medio-tardío, mientras que prodigiosina actúa en el punto G1 tardío-S.

MODELO PROPUESTO PARA EL PROCESO APOPTÓTICO INDUCIDO POR LA PRODIGIOSINA

Se conocen numerosas sustancias inductoras de la apoptosis pero son pocas de las que se sabe el mecanismo activador del proceso apoptótico. Sabemos que la prodigiosina actúa a muchos niveles: es dependiente de caspasas, activa las caspasas 9, 3 y 8, su efecto es inhibido en células tratadas con TPA, detiene el ciclo celular, interacciona con el DNA, inhibe la

Topoisomerasa I, etc. pero ignoramos cuál es el acontecimiento que actúa realmente como inductor de la apoptosis.

Muchos procesos que tienen lugar en la célula dependen de la correcta distribución de los iones H^+ en determinados compartimentos celulares, mientras que el citosol actúa como un tampón que equilibra el pH celular. Alteraciones en la regulación del pH de estos orgánulos, tal es el caso de las mitocondrias, pueden tener como consecuencia la muerte celular (Matsuyama *et al.*, 2000). Ciertos datos que aparecen en la bibliografía nos han hecho pensar que prodigiosina podría actuar a través de la desestabilización del pH mitocondrial, hecho que tendría como consecuencia la liberación al citosol del citocromo C mitocondrial y por tanto la activación de la apoptosis.

Estudios *in vitro* han mostrado que para que el citocromo C pueda activar de forma eficiente a las caspasas el pH del citosólico debe ser ácido. Estos resultados concuerdan con el hecho de que en la apoptosis inducida a través de la vía dependiente de la mitocondria (conocida también como vía intrínseca) se produce rápidamente la alcalinización de la mitocondria y la acidificación del citosol (Matsuyama *et al.*, 2000; Llopis *et al.*, 1998). Se cree que el mecanismo de algunas drogas inductoras de la apoptosis podría ser a través de la inducción de la salida del citocromo C de la mitocondria, p.e. aspirina (Piqué *et al.*, 2000).

Los miembros de la familia de Bcl-2 regulan el proceso apoptótico actuando sobre la compartimentación mitocondrial del citocromo C; de forma que mientras que Bcl-2 y Bcl-x_L previenen la redistribución del citocromo C en respuesta a múltiples estímulos inductores de la muerte celular, Bax promueve su salida a través de un canal específico situado en la membrana externa (revisado en Antonsson & Martinou, 2000 y Vander Heiden & Thompson, 1999). Nosotros hemos visto que la apoptosis inducida por la prodigiosina es independiente de la acción protectora de Bcl-2 y de Bax (en el caso de Jurkat), aunque podrían ser otros miembros de la familia los que estuviesen implicados en este proceso. De todas formas, ciertos indicios nos hacen creer que la explicación a la liberación del citocromo C mitocondrial puede ser otra.

La mitocondria también puede intervenir en el proceso de muerte celular como consecuencia de la regulación de cambios en su potencial de membrana, el pH citoplasmático y el estado redox de la célula; cambios en la función mitocondrial pueden ser responsables del

incremento en los niveles de especies de oxígeno reactivas y de la acidificación del citosol, acontecimientos tempranos en la apoptosis (Vander Heiden & Thompson, 1999).

Se han propuesto dos procesos que explicarían la salida del citocromo C mitocondrial durante la apoptosis. El primero describe un mecanismo dependiente del volumen: debido al aumento del volumen de la matriz mitocondrial se produciría la tumefacción de la mitocondria que provocaría la ruptura de la membrana externa y la liberación del citocromo C, junto con otras proteínas normalmente presentes en el IMS. El segundo mecanismo defiende que la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial se alteraría de forma selectiva a través de la apertura de un canal en la membrana mitocondrial externa que permitiría la salida de determinadas proteínas, entre las cuales estaría el citocromo C (Matsuyama *et al.*, 2000; Antonsson & Martinou, 2000). Para explicar el mecanismo dependiente del volumen existen dos modelos, uno defiende que se produciría un aumento no selectivo de la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial a través de un gran complejo multiproteico llamado poro PT (*permeability-transition pore*); según un segundo modelo, el aumento del volumen mitocondrial se debería a la apertura de unos canales iónicos desconocidos presentes en la membrana externa (Vander Heiden & Thompson, 1999; Antonsson & Martinou, 2000).

En un trabajo reciente dirigido por JC Reed (Matsuyama *et al.*, 2000) se demuestra que la alteración del pH mitocondrial representa un acontecimiento temprano que precede a la salida del citocromo C y a la apertura de los poros PT y que además, facilita la activación de las caspasas mediada por el citocromo C; tal es el caso de ciertos estímulos apoptóticos como la estaurosporina, Bax y las radiaciones UV, todos ellos mitocondria-dependientes, con los que se produce la alcalinización de la mitocondria y la acidificación del citosol, seguido de la liberación del citocromo C, activación de las caspasas y la tumefacción, la despolarización y la pérdida del gradiente de H^+ mitocondriales, de forma que la apertura de los poros PT es un acontecimiento tardío, posterior a la activación de las caspasas. Estímulos apoptóticos mitocondria-independientes como Fas no siguen este proceso por lo que en estos casos la activación de las caspasas es independiente del pH del citosol. De este trabajo se deduce, por tanto, que una sustancia que altere el gradiente de H^+ en la mitocondria inducirá posiblemente la apoptosis de la célula a través de este mecanismo activador.

En un principio se había descrito que la prodigiosina 25-C (PrG) actuaba inhibiendo las bombas de protones vacuolar y mitocondrial (V- y F-ATPasa), proceso que conducía al

aumento del pH de los compartimentos vacuolares ácidos (como el aparato de Golgi, endosomas, lisosomas y vesículas de secreción), así como de la mitocondria, causando cambios morfológicos y funcionales en estos orgánulos (Kataoka et al., 1995a; Kataoka et al., 1995b; Lee et al., 1995). Posteriormente, estos mismos autores demostraron, a través de nuevos estudios, que el efecto alcalinizante de varios miembros de la familia de las prodigiosinas (como prodigiosina, PrG y metacicloprodigiosina) se debía en realidad a que actuaban como cotransportadores del tipo simporte de H^+/Cl^- (equivalente al intercambio o antiporte OH^-/Cl^-); también comprobaron que la actuación de estos nuevos ionóforos no afectaba prácticamente a la formación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) ni a la actividad F-ATPasa (en la membrana interna mitocondrial), pues en un estudio hecho con partículas submitocondriales, la concentración de prodigiosina necesaria para reducir al 50% la actividad ATPasa y la formación de $\Delta\Psi_m$ fue del orden de 1.000 veces superior a la requerida para inhibir la actividad acidificadora (Konno et al., 1998; Sato et al., 1998); de estos estudios se deduce que estas sustancias actúan como inhibidores de la acidificación inducida por la respiración oxidativa, pero sin interferir en este proceso de síntesis del ATP ni por tanto sobre la formación del $\Delta\Psi_m$.

Gracias a la autofluorescencia de la prodigiosina hemos podido estudiar su entrada en las células en cultivo; al observar al microscopio de fluorescencia las células tratadas hemos visto que la entrada de la prodigiosina es muy rápida (en menos de un minuto), quedando localizada en gránulos del citosol alrededor del núcleo pero no la hemos detectado en la membrana citoplasmática (imágenes de la cubierta de este trabajo); estas observaciones apuntan a que la diana de la prodigiosina en la célula eucariota podrían ser orgánulos como las mitocondrias o el aparato de Golgi.

El modelo que proponemos para explicar la activación del proceso apoptótico inducido por la prodigiosina se basa en todos estos datos y en que la prodigiosina induce la salida de la mitocondria del citocromo C (fig. 5.2 de *Resultados*); todo ello apunta a que la inducción de la apoptosis sería consecuencia de su modo de actuación como cotransportador del tipo H^+/Cl^- simporte, disipando el potencial eléctrico de transmembrana a través de la membrana externa mitocondrial pero manteniendo intacto el volumen, debido a que actuaría únicamente como poro permeable a iones, manteniéndose intacta la actividad ATPasa y por tanto el intercambio ATP/ADP (fig. 4); a altas concentraciones de prodigiosina, debido a la inducción de la pérdida

del $\Delta\Psi_m$, se produciría la tumefacción de la matriz con la consecuente ruptura de la membrana mitocondrial externa; estudios realizados con PrG describen que al cabo de una hora de tratamiento se había producido un aumento del volumen del aparato de Golgi y de las mitocondrias, apoyando esta teoría (Kataoka et al., 1995a; Konno et al., 1998).

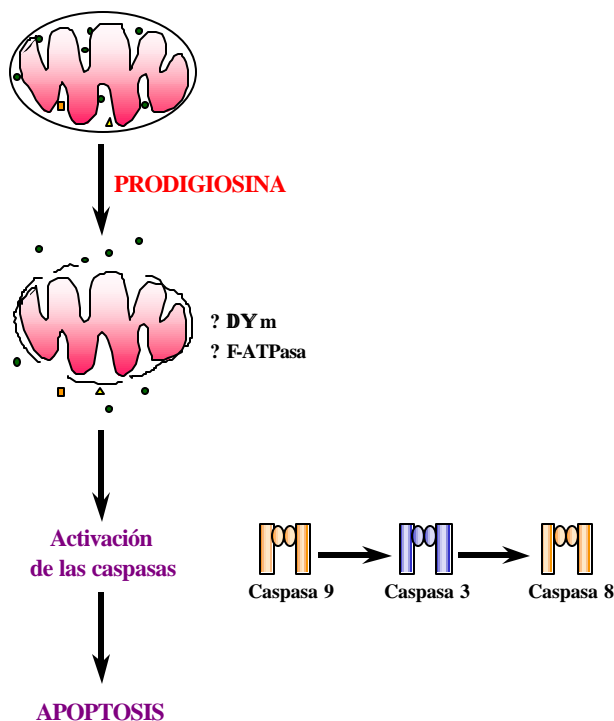


Fig. 4. Posible mecanismo de acción de la prodigiosina. A) mitocondria viable; B) la prodigiosina produce una alteración en la función mitocondrial al actuar como cotransportador tipo simporte de H^+/Cl^- ; la membrana externa pierde su integridad, liberándose el citocromo C y otras proteínas como las caspasas, etc.; C) activación de la caspasa 9 vía citocromo C/Apaf-1, que activa a la caspasa 3 y en consecuencia, activación de la caspasa 8 (seguramente también se activan las caspasas 7, 2 y 10); D) apoptosis.

POSIBLES APLICACIONES DE LA PRODIGIOSINA

Se ha descrito una actividad inmunosupresora para la prodigiosina por Han y cols. (Han et al., 1998) y para otros miembros de la familia como cicloprodigiosina-HCl (Kawauchi et al., 1997; Azuma et al., 2000) y prodigiosina 25-C (Tsuji et al., 1992; Lee et al., 1995; Songia et

al., 1997; Lee *et al.*, 1998). La importancia de que la prodigiosina haya inducido apoptosis en líneas cancerosas de origen hematopoyético estriba en que, además de su posible uso como inmunosupresor, también puede tener aplicación en el tratamiento de estos cánceres. Recientemente Yamamoto y cols. (2000a) han estudiado el efecto de la cicloprodigiosina-HCl en la línea HL60 y han descrito que es capaz de inducirles la apoptosis y la diferenciación a monocitos, por lo que sugieren que la cicloprodigiosina-HCl podría ser un candidato a tener en cuenta en el tratamiento de la leucemia.

Previamente a la aparición de este trabajo, iniciamos un estudio en colaboración con el Dr. Joan Gil y su grupo (Departamento de ciencias Fisiológicas II, UB), para ver el efecto de la prodigiosina en la leucemia linfática crónica de células B (LLC-B). La LLC-B se debe a la proliferación y acumulación de un clon de linfocitos B neoplásicos en la sangre, médula ósea, nódulos linfoides y bazo; aunque poseen una morfología de linfocitos B maduros, son deficientes en la producción de anticuerpos, de forma que los pacientes que padecen esta enfermedad son propensos a padecer infecciones (Montserrat *et al.*, 1997). Constituye el tipo de leucemia más común en el mundo occidental, siendo la media de edad en el momento del diagnóstico de 65 años, con sólo un 10-15% por debajo de los 50 años y es más frecuente en varones. En general tiene una buena prognosis, aunque la falta de tratamientos específicos hace que en algunos casos que la supervivencia esté entre 1 y 5 años (Rozman & Montserrat, 1995). La terapia actual se basa principalmente en la aplicación de clorambucil.

Desde hace tiempo se conoce la relación de determinados factores biológicos, como la mutación de p53 y la sobreexpresión de Bcl-2, con la resistencia al tratamiento de la LLC (Banneji & Byrd, 2000); dado que la prodigiosina actúa de forma independiente a p53 y Bcl-2, este trabajo nos pareció de gran interés. En este estudio se están utilizando muestras de pacientes que no están siendo tratados con quimioterapia, para evitar una posible respuesta alterada al tratamiento con prodigiosina. Los resultados de que disponemos apuntan a la prodigiosina como a un posible candidato en el tratamiento de la LLC, al compar su toxicidad con la de otros quimioterápicos actualmente en uso (Campas *et al.*, manuscrito en preparación).

El cáncer de colon representa un 9% de todos los tumores que aparecen cada año en el mundo. A pesar de que en su tratamiento se están utilizando drogas quimioterapéuticas inductoras de la apoptosis, promotoras de la diferenciación celular o inmunomoduladoras

(Langman & Boyle, 1998; Agarwal *et al.*, 1999; Castaño *et al.*, 1999), con el objeto de prevenir la metástasis o el control de las recidivas, la única terapia realmente eficaz hoy en día es la extirpación quirúrgica. La prodigiosina ha mostrado una enorme selectividad para las líneas tumorales derivadas de adenocarcinomas de colon, pudiendo ser una terapia a tener en cuenta, ya sea por sí sola o como refuerzo a la quimioterapia actual, basada principalmente en el empleo de 5-FU (Sinicrope & Sugarman, 1995; Royce & Pazdur, 1999; van Cutsem *et al.*, 1999). Además, hemos visto que se están haciendo estudios con resultados muy interesantes en los que se combina el 5-FU con inhibidores de las topoisomerasas (Rothenberg & Blanke, 1999; Armand *et al.*, 1999); dado que la prodigiosina es un inhibidor de la Topoisomerasa I, esta combinación podría ser muy interesante.

El principal problema en la terapia del cáncer de estómago es la falta de tratamientos eficaces; el tratamiento más efectivo para este tipo de tumores es la extirpación quirúrgica, posible únicamente en un 50-60% de los casos diagnosticados, mientras que el empleo de quimioterapia, tan aconsejable en otros tumores en los que está recomendada la cirugía, sólo se utiliza como refuerzo debido a la gran resistencia que desarrollan estos tumores (Kelsen, 1996). Del estudio obtenido al tratar con prodigiosina la línea HGT-1, procedente de un carcinoma de estómago, podemos concluir que, si bien es cierto que ha sido la línea cancerosa con la IC_{50} más alta, ha sido más sensible que NIH-3T3 y Swiss-3T3.

El cáncer de mama presenta una respuesta moderada a la quimioterapia que se aplica actualmente, pero a pesar de ello sigue teniendo un mal pronóstico. Una vez más, el tratamiento de elección es la extirpación quirúrgica y no existe un tratamiento farmacológicamente adecuado para el control de esta enfermedad. Los resultados aquí presentados se han hecho utilizando una sola línea, la MCF-7, pero en nuestro grupo se está trabajando en la caracterización del efecto de prodigiosina sobre otras líneas celulares de cáncer de mama; los resultados de los que disponemos en este momento indican que en la línea MDA-MB-231 también responde a través de la activación de la apoptosis en presencia de prodigiosina, obteniéndose una IC_{50} de 750 nM, valor que la sitúa entre las líneas celulares más sensibles de entre las que hemos estudiado.

Recientemente se ha visto que la cicloprodigiosina-HCl también induce la apoptosis en líneas celulares humanas de cáncer de mama (Yamamoto *et al.*, 2000b). Entre las líneas que estudian están también MCF-7 y MDA-MB-231, presentando unos valores de IC_{50} de 550 y

620 nM cicloprodigosina-HCl respectivamente. En este trabajo Yamamoto y cols. encuentran que la cicloprodigosina-HCl también tiene efecto sobre otras líneas celulares no cancerosas, como la línea epitelial de mama humana HBL-100, aunque para lograr este efecto son necesarias concentraciones de entre 3 y 4 veces superiores a las utilizadas en las líneas cancerosas.

La importancia de que prodigosina se haya mostrado selectiva en A431, línea derivada de un carcinoma epidermoide, es también un resultado cuanto menos interesante y su importancia estriba en que la terapia del cáncer de piel es de gran importancia sanitariamente puesto que en los próximos años la incidencia de este tipo de tumores sufrirá incrementos alarmantes.

Los resultados presentados en esta tesis no permiten, por sí solos, de hablar de prodigosina como molécula antitumoral; para ello serían necesarios muchos más estudios, si bien algunos de ellos ya han sido realizados con otros miembros de su familia; con cicloprodigosina-HCl se han llegado a hacer estudios en animales xenotransplantados y los resultados que se obtuvieron han hecho pensar en su uso para el tratamiento del cáncer hepático (Yamamoto *et al.*, 1999). Incluso se están estudiando análogos sintéticos de estas moléculas naturales con el objeto de mejorar sus propiedades farmacológicas, como el PNU156804 (Rizzo *et al.*, 1999).

El hecho de que prodigosina sea una molécula fluorescente la hace un candidato interesante para diferentes estudios y posibles aplicaciones, como por ejemplo, estudiar su localización intracelular. Actualmente se están aplicando sustancias fluorescentes para localizar y caracterizar tumores; este marcaje se está aplicando en la terapia fotodinámica del cáncer (PDT) para detectar el momento óptimo de irradiación (máxima diferencia de concentración entre el tejido tumoral y el sano), fundamentándose en el hecho de que los tejidos enfermos presentan características de fluorescencia diferentes a las de los tejidos sanos; para algunos tejidos estas diferencias son observables directamente, pero en otros casos es necesario utilizar un marcador fluorescente del tumor. La selectividad de estas moléculas por las células o tejidos tumorales no es algo indispensable, pues se pueden conjugar con anticuerpos específicos contra células tumorales (Mew *et al.*, 1983; Jiang *et al.*, 1999). Sería

interesante poder determinar la selectividad de prodigiosina por los tejidos o células tumorales, ya que pues sería una ventaja sobre otras moléculas y de momento sólo hemos hecho estudios in vitro (Scott & Goa, 2000; Chen & de Witte, 2000; Rosenkranz et al., 2000).

Además de poder ser utilizada como marcador, prodigiosina presenta otras características comunes a los fotosensibilizadores que la hacen un candidato interesante para su empleo en la terapia fotodinámica del cáncer. En primer lugar, fue descrita hace tiempo su habilidad como fotosensibilizador (Roth, 1967), característica que aprovecha *S. marcescens* para colonizar el medio; en segundo lugar, sabemos que la mayoría de los fotosensibilizadores son tetrapirroles, como las porfirinas (Bonnett, 1981) y cabría esperar que los tripirroles como prodigiosina también pudieran tener algún interés; creemos que sería interesante estudiar la utilidad de prodigiosina, así como la de otros miembros de la familia como cicloprodigiosina, con una estructura cíclica parecida a los tetrapirroles antes mencionados. Es importante que la molécula fotosensibilizadora absorba en la zona roja del espectro, porque a mayor longitud de onda de la luz incidente hay una mayor transmitancia de los tejidos y se consiguen mejores resultados a igualdad de dosis; prodigiosina presenta un pico de absorción a $\lambda=534$ nm, lo que permitiría trabajar con una intensidad de luz bastante aceptable.

Puede ser que en un futuro se llegue a la conclusión de que la prodigiosina como tal no sea útil para el tratamiento del cáncer, pero de momento parece una molécula muy interesante para el estudio de la apoptosis.

CONCLUSIONES

1. La prodigiosina procedente de la cepa bacteriana *Serratia marcescens* 2170 induce la muerte celular a través de la apoptosis. La norprodigiosina, pigmento producido por el mutante *S. marcescens* OF, es también una molécula inductora de la apoptosis aunque menos eficaz que la prodigiosina.

2. La prodigiosina ha mostrado ser muy eficiente en inducir apoptosis en líneas celulares cancerosas de diverso origen: hematopoyético (Jurkat clon E6-1-leucemia de linfocitos T, Molt-4-leucemia linfoblástica aguda, HL-60-leucemia promielocítica, Ramos-linfoma de Burkitt y NSO-mieloma), gastrointestinal (HGT-1-carcinoma gástrico, DLD-1 -adenocarcinoma de colon y SW-620-adenocarcinoma de colon procedente de un nódulo linfático), de mama (MCF-7-adenocarcinoma) y de piel (A431-carcinoma epidermoide). Las células cancerosas que presentaron una menor IC_{50} (225 nM de prodigiosina) han sido las células Jurkat correspondientes a una leucemia de linfocitos T.

3. La prodigiosina también ha mostrado su efecto apoptótico en líneas celulares no cancerosas tales como: MDCK (NBL-2)-células epiteliales no malignas de riñón de *Canis familiaris*, NIH-3T3-células de embrión de ratón Swiss, NRK-49F-fibroblastos de riñón de rata, Swiss-3T3-células embrionarias de ratón Swiss. De todas ellas las que presentaron una menor IC_{50} (2800 nM de prodigiosina) han sido las células NRK-49F correspondientes a fibroblastos de riñón de rata.

4. En el proceso apoptótico inducido por la prodigiosina se produce la salida de la mitocondria del citocromo C y la activación de las caspasas 9, 3 y 8 así como la fragmentación de la PARP. Este proceso apoptótico desencadenado por la prodigiosina es independiente de p53 y de la acción protectora de Bcl-2.

5. El efecto apoptótico de la prodigiosina es prácticamente nulo cuando las células son tratadas previamente con el éster de forbol TPA, que es un potente activador de la proteína-quinasa C (PKC). Además, la fosforilación de las quinasas ERK1/2 inducida por el TPA se ve inhibida por la prodigiosina. Estos hechos nos indican que la activación de la PKC al menos por una de las vías de las MAP quinasas (ERK1/2) protege a las células de la acción apoptótica de la prodigiosina.

6. La prodigiosina induce un incremento en la expresión de los factores de transcripción c-Jun y cFos; ambos hechos tendrán como resultado en la célula un refuerzo en la inducción de la apoptosis a través del complejo AP-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO DE CÉLULAS PROCARIOTAS

Cepas bacterianas utilizadas

- *Serratia marcescens* 2170: cepa ambiental productora del pigmento prodigiosina (2-metil-3-pentil-6-metoxiprodigioseno).
- *S. marcescens* ATCC 274: cepa productora de prodigiosina.
- Cepas de *S. marcescens* deficientes en la biosíntesis de prodigiosina: *S. marcescens* -OF, -WF y -933:
 - El mutante OF no puede formar el compuesto MBC (4-metoxi-2,2'-bipirrol-5-carboxaldehído), llegando sólo a la síntesis del precursor HBC (4-hidroxi-2,2'-bipirrol-5-carboxaldehído). De la unión entre HBC y MAP (2-metil-3-n-amilpirrol) se obtiene la norprodigiosina (2-metil-3-pentil-6-hidroxi-prodigioseno)
 - El mutante WF sintetiza el precursor MAP
 - El mutante 933 produce el compuesto MBC
- *S. marcescens* NR1: cepa que presenta un lipopolisacárido incompleto, deficiente del antígeno-O.

Las distintas cepas bacterianas utilizadas en esta tesis fueron cedidas por el Dr. Miguel Viñas, de la Unidad de Microbiología de la Universidad de Barcelona.

Condiciones de crecimiento

El medio PG que se ha utilizado para el desarrollo de todas las cepas bacterianas está compuesto por peptona y glicerol (1% peptona de carne y 10% de glicerol).

Las condiciones de incubación utilizadas para el cultivo de las distintas cepas fueron: agitación (cultivos oxigenados), a 30°C y durante 48 horas, condiciones necesarias para la producción de pigmento.

Obtención de un cultivo puro

Para obtener un cultivo puro se hizo un crecimiento en placa de cada cepa y se pasó una colonia a un tubo que contenía unos 2 ml de medio PG; tras 16 horas de incubación se recogieron las bacterias por centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de PG y 20% de glicerol para ser conservadas a -80°C.

Condiciones de los cultivos bacterianos requeridas para la obtención de droga

Se cultivaron a partir de un inóculo del cultivo puro en 25 ml de PG durante 16 horas, a 30°C y agitación fuerte (300 r.p.m. en un agitador Clifton) y entonces se transfirió 1ml de este cultivo a 5-6 matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían 100 ml de medio PG cada uno y se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y agitación durante 48h.

CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES EUCARIOTAS

Líneas celulares utilizadas

Líneas cancerosas:

- A431, carcinoma epidermoide humano
- DLD-1, adenocarcinoma de colon humano
- HGT-1: procedentes de un carcinoma de estómago humano. Con propiedades de célula parietal
- HL-60, línea humana procedente de una leucemia promielocítica
- Jurkat clon E6-1, línea humana procedente de una leucemia de linfocitos T
- Jurkat-*bcl2*: células Jurkat transfectadas de forma estable con *bcl-2* (Torigoe *et al.*, 1994)
- Jurkat-*neo*: células Jurkat transfectadas de forma estable con el plásmido *neo* (Torigoe *et al.*, 1994)
- MCF-7, adenocarcinoma de mama de origen humano, con propiedades de célula epitelial
- Molt-4, línea humana procedente de una leucemia linfoblástica aguda

- NSO, células de mieloma humano
- Ramos, células humanas procedentes de un linfoma de Burkitt
- SW-620, células humanas de adenocarcinoma de colon procedente de un nódulo linfático

Líneas no cancerosas:

- MDCK (NBL-2), células epiteliales no malignas de riñón de *Canis familiaris*
- NIH-3T3, células de embrión de ratón Swiss
- NRK-49F, fibroblastos normales de riñón de rata
- Swiss-3T3, células embrionarias de ratón Swiss

Todas las líneas celulares proceden de la *American Type Culture Collection* (ATCC) (Rockville, MD), excepto HGT-1, que fueron cedidas por el Dr. Levine y las transfectadas Jurkat-*neo* y Jurkat-*bcl2*, ambas procedentes del Departamento del Dr. JC Reed.

Condiciones de los cultivos

Todas las células fueron cultivadas a 37°C, en una atmósfera al 5% CO₂ y en el medio de cultivo correspondiente:

- A) DMEM + 10% FCS + 4 mM L-Glutamina + 100 u/ml penicilina G y 100 µg/ml estreptomicina. (Utilizado en las líneas HGT-1, NIH-3T3, NRK, SW-620 y Swiss-3T3).
- B) MEM + 10% FCS + 2 mM L-Glutamina + 100 u/ml penicilina G y 100 µg/ml estreptomicina. (Medio de cultivo para A431 y MDCK).
- C) RPMI + 10% FCS + 2 mM L-Glutamina + 100 u/ml penicilina G y 100 µg/ml estreptomicina. (Medio requerido por DLD-1, HL60, Jurkat, MOLT-4, NSO y Ramos).
- D) HAMF12/DMEM (1:1)+ 10% FCS + 4 mM L-Glutamina + 100 u/ml penicilina G y 100 µg/ml estreptomicina, (para MCF7 y MDA-MB-231).

El medio de cultivo de A431 y NRK fue completado con 1% NEAA (aminoácidos no esenciales), y con 10 µg/ml insulina en el caso de A431 y MCF-7.

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS BACTERIANOS

El cultivo bacteriano fue recogido y centrifugado a 6.000 x g durante 15 minutos (Sorvall RC 5C Plus) y de esta forma separamos el medio de cultivo y la masa bacteriana; en nuestros trabajos utilizamos principalmente dos tipos de muestras: la obtenida a partir del sobrenadante y la procedente del sedimento (la masa bacteriana).

- A PARTIR DEL SOBRENADANTE: Obtención de las muestras CS

El sobrenadante obtenido de la centrifugación de un cultivo bacteriano fue filtrado (filtro Nalgene, tamaño de poro 0,22µm) para eliminar las bacterias que pudiesen quedar y se concentró con un Centricon[®] Plus-20 Biomax-8 (Millipore), dispositivo de ultrafiltración de alto rendimiento que permite concentrar los solutos de peso molecular superior a 8 kDa de los caldos y medios de cultivo y recuperarlos en un volumen 100 veces menor que el de partida. Tras concentrar todo el sobrenadante se hicieron alícuotas y se conservaron a -20°C. Las muestras obtenidas de esta forma las denominamos 'CS' (de *concentrated-sample*).

- A PARTIR DEL SEDIMENTO: Obtención de las muestras SV

Con el sedimento obtenido tras centrifugar un cultivo bacteriano, formado principalmente por las bacterias, se procedió a hacer la extracción del pigmento, utilizando como disolvente metanol acidificado para facilitar su separación de las proteínas (metanol:HCl 1N, en una proporción 24:1) (Goldschmidt & Williams, 1968). La extracción se hizo poniendo aproximadamente un gramo del precipitado en un tubo de centrifuga de 50 ml con 10-15 ml de metanol ácido; para favorecer la extracción se sacudió el tubo con fuerza varias veces y entonces se centrifugó durante 5 minutos a 2.000 x g (Sorvall TC6); esta operación se repitió para todo el precipitado, reutilizando el metanol-HCl mientras fue posible, para que la muestra quedara concentrada al máximo, y entonces se repartió en eppendorfs y el disolvente se evaporó en el *speed-vacuum*; el contenido de todas las alícuotas se combinó utilizando DMSO o metanol como disolvente y se hicieron alícuotas que se conservaron a -20°C. Las muestras obtenidas siguiendo este procedimiento las llamamos 'SV' (de *speed-vacuum*).

A los lotes de las muestras CS y SV que íbamos obteniendo les dimos un número de lote (día/mes/año) para diferenciarlos y testamos su eficacia a través de los ensayos de la viabilidad celular y de la fragmentación del DNA en la línea Jurkat.

MEDICIONES HECHAS EN LAS MUESTRAS CS Y SV

Cuantificación de las proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976)

La concentración de proteína fue determinada en las muestras CS por el método Bradford y utilizada como medida cuantitativa de la muestra empleada en los ensayos, hasta que pasamos a usar la concentración de prodigiosina como medida.

Cuantificación de la prodigiosina (Goldschmidt & Williams, 1968)

Para poder cuantificar la cantidad del pigmento prodigiosina presente en las muestras se tomó el valor de la absorbancia a dos densidades ópticas diferentes: a 534nm, que se corresponde con el pico de absorción de la prodigiosina y a 655nm, para poder corregir el ruido de fondo; una diferencia entre los dos valores de 1,0 equivale a 19,3 µg de prodigiosina por mililitro. La fórmula que se aplica para determinar la concentración de prodigiosina es la siguiente:

$$(\text{Abs}_{534\lambda} - \text{Abs}_{655\lambda}) \times 19,3 = \mu\text{g Prodigiousina} / \text{ml}$$

Para hacer esta medición diluimos las muestras CS y SV en metanol o en PBS (dilución 1:9) (Allen, 1967).

DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR POR EL ENSAYO DEL MTT (Mosmann, 1983; Holst-Hansen, 1998)

El ensayo del MTT se utiliza como método para cuantificar coloriméricamente la viabilidad celular en estudios de la proliferación celular y citotoxicidad. Se basa en la característica que tienen las sales amarillas de tetrazolio, como el MTT, que al fragmentarse

forman un derivado del formazán insoluble en medio acuoso de color azul intenso; esta rotura es producida por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, activa solamente en las células vivas. En estas pruebas se utiliza el isopropanol como disolvente de estos cristales y se mide la intensidad del color azul de la muestra en un espectrofotómetro.

El procedimiento que seguimos fue el siguiente: en una placa de 96 pocillos se incubaron un número determinado de células por pocillo (la mayoría de nuestros ensayos se hicieron con 20.000 células/pocillo), en ausencia (control negativo) o en presencia de distintas cantidades de la droga a estudiar; transcurrido el tiempo de incubación requerido (según el experimento) a cada pocillo se le añadieron 10 μ l de MTT (de una solución con 5 mg/ml MTT en PBS) y se dejaron en el incubador el tiempo necesario en función de la línea celular (normalmente 4 horas). Posteriormente se añadieron 100 μ l de isopropanol:HCl 1N(24:1)/pocillo y tras homogeneizar el contenido de cada pocillo con la ayuda de una micropipeta se midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas ELISA. El valor neto de absorbancia se obtuvo al restar la medida de los medios y la droga al de las células y fue expresado en forma de porcentaje, dando el valor 100% de viabilidad a la absorbancia neta de las células control, que es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas.

En cada ensayo se realizaron todas las condiciones por triplicado; además, cada estudio se repitió 3 veces y posteriormente se determinó la significancia estadística mediante el programa ANOVA, PLSD Fisher, para $*P<0,5$, $**P<0,1$ y $***P<0,001$.

En los estudios de la viabilidad de las líneas que tienen dependencia al anclaje, pusimos 15.000 células/pocillo por la noche y al día siguiente les cambiamos el medio por medio fresco antes de empezar el ensayo.

Dadas las diferencias en la actividad metabólica de las distintas líneas celulares fue necesario hacer una curva estándar de MTT que nos permitiera ver la linealidad entre el número de células y la absorbancia leída, así como determinar el tiempo de incubación con MTT idóneo para alguna de las líneas estudiadas.

Las drogas que hemos estudiado por viabilidad han sido CS-2170, CS-OF, CS-WF, CS-933, CS-NR1, SV-2170 y prodigiosina pura.

ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL DNA EN GELES DE AGAROSA

La apoptosis se caracteriza bioquímicamente por la rotura del DNA genómico en pequeños fragmentos múltiples de unos 180pb, siendo un proceso bastante temprano (anterior a la desintegración de la membrana), irreversible, y bastante generalizado, que conduce a la muerte celular. El estudio cualitativo de este fenómeno se realiza al extraer el DNA de las células y observar el característico patrón del DNA fragmentado, tras hacer una electroforesis en gel de agarosa (Kerr *et al.*, 1994; Ascaso, 1994).

Para ello, se trataron 1-2 millones de células (500.000 células/ml) con la droga el tiempo necesario (5-48 horas, según la línea celular). Tras lavar las células con PBS, se incubaron con un tampón de lisis (LB: 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,2% Tritón X-100) durante 15 minutos, a 4°C y entonces se centrifugaron 15 minutos a 14.000 x g; al sobrenadante obtenido se le añadieron una serie de componentes que constituyeron un segundo tampón de lisis (formado por 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 40 mM EDTA, 1% SDS y 200 µg/ml proteinasa K (pK)); para saber la cantidad que había que añadir de cada compuesto se calculó el *volumen final*, partiendo del volumen de tampón de lisis recuperado (*volumen del sobrenadante*) aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen final} = \text{Volumen del sobrenadante} \times 1,2$$

El volumen final es el volumen que se obtiene tras añadir los distintos componentes que forman el tampón de lisis. La siguiente tabla incluye el volumen que hay que añadir de cada ingrediente (a partir de unas soluciones stock), en función del volumen final calculado:

| <u>Solución stock</u> | <u>Volumen final</u> | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| | 300 | 325 | 350 | 375 | 400 | 425 | 450 | 475 | 500 |
| 5M NaCl | 10,8 | 11,7 | 12,6 | 13,5 | 14,4 | 15,3 | 16,2 | 17,1 | 18 |
| 1M Tris pH 8,0 | 3,6 | 3,9 | 4,2 | 4,5 | 4,8 | 5,1 | 5,4 | 5,7 | 6 |
| 1M EDTA | 14,4 | 15,6 | 16,8 | 18 | 19,2 | 20,4 | 21,6 | 22,8 | 24 |
| 20% SDS | 18 | 19,5 | 21 | 22,5 | 24 | 25,5 | 27 | 28,5 | 30 |
| pK 20mg/ml | 3,6 | 3,9 | 4,2 | 4,5 | 4,8 | 5,1 | 5,4 | 5,7 | 6 |
| H₂O estéril | 9,6 | 10,4 | 11,2 | 12 | 12,8 | 13,6 | 14,4 | 15,2 | 16 |

Estos volúmenes se corresponden a las siguientes diluciones de las soluciones stock:

| <u>Stock</u> | <u>dilución del stock</u> |
|---------------------|---------------------------|
| 5 M NaCl | 1:33,3 |
| 1 M Tris-HCl pH 8,0 | 1:100 |
| 1 M EDTA | 1:25 |
| 20 % SDS | 1:20 |
| 20 mg/ml p K | 1:100 |

Las muestras se dejaron durante 4-16 horas a 37°C y después se hizo una doble extracción con fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1); la fase acuosa se recuperó y se precipitó con 1 volumen de isopropanol o el doble de etanol absoluto y 140 mM NaCl, a -20°C, durante 1 ó 16 horas (como mínimo) en función del alcohol utilizado. La cantidad de NaCl 5M (solución stock) a añadir fue determinada también a partir del *volumen de la fase acuosa*, resultado de dividir 35,7 veces el *volumen final* obtenido según la fórmula:

$$\text{Volumen final} = \text{Volumen de la fase acuosa} \times 1,03$$

Una vez precipitado el DNA, se hicieron un par de lavados con etanol al 70%, centrifugando cada vez la muestra 10 minutos a 14.000 x g y se dejó secar. El DNA fue resuspendido finalmente en 15 µl TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, pH 8,0) durante 2 horas y entonces se dejó durante 1 hora, a 37°C, con 25µg/ml RNAsa A (1 µl del stock 500 µg/ml); pasado este tiempo, se le añadió a la muestra 3,2 µl de tampón de carga 6X (*gel-loading buffer* 6X: 40% sucrosa, 0,25% azul de bromofenol) antes de ser cargada en un gel al 1% agarosa-TBE (45 mM Tris, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH 8,0), que contenía 2,5 µl de bromuro de etidio (BrEt, de una solución stock 10 mg/ml).

Como control positivo en estos ensayos utilizamos la droga estaurosporina, un potente inhibidor de la PKC que induce la apoptosis a través de un mecanismo muy general.

TINCIÓN DEL DNA CON EL FLUOROCROMO HOECHST 33342

Los fluorocromos son sustancias que tienen la capacidad de emitir luz al ser excitados por una energía de una determinada longitud de onda. Esta técnica se basa en la tinción de la cromatina de células en cultivo con el fluorocromo Hoechst vital, que se intercala en las regiones A-T (adenina-timina) del DNA, pudiendo verse la luz azul que emite en un microscopio de fluorescencia y de esta forma podemos identificar morfológicamente las células vivas y las apoptóticas. Si se combina el uso del Hoechst 33342 con el yoduro de propidio (IP), otro fluorocromo que se intercala en el DNA de las células que han perdido la integridad de la membrana citoplasmática, podemos identificar también las células necróticas, que se verán de color rojo.

Para ello se incubaron 400.000 células/ml con la droga durante 5 horas; después de lavarlas un par de veces con PBS, fueron resuspendidas en 500µl PBS y se les añadió 1µl Hoechst 33342 (de una solución stock que contiene 1mg bis-Bencimida/ml) que se dejó incubar 30 minutos, a 37°C y a oscuras; pasado este tiempo se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 500 µl PBS con 5 µl IP (de una solución stock 0,5 mg/ml) durante 10 minutos, a temperatura ambiente y protegidas de la luz (este paso es opcional); tras eliminar de nuevo el sobrenadante, el sedimento fue resuspendido con el poco volumen de PBS que había quedado en el eppendorf (≈ 10 µl), y se procedió a hacer el montaje en un portaobjetos para mirar el marcaje al microscopio de fluorescencia.

CUANTIFICACIÓN DE LA APOPTOSIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

En las etapas iniciales de la apoptosis se producen una serie de cambios en la superficie de la célula que permiten la exposición de entidades, como los restos de fosfatidilserina (PS); estos restos de PS se encuentran en el lado citosólico de las células vivas y durante la apoptosis pasan de la cara interna a la cara externa de la membrana citoplasmática. La PS puede ser detectada al incubar las células con Anexina V marcada con fluoresceína, que se une a la PS a través de una unión dependiente de Ca^{2+} (Homburg *et al.*, 1995; Vermes *et al.*, 1995). En las células apoptóticas el marcaje de anexina se localiza en la cara externa de la membrana; cuando las células necróticas pierden la integridad de la membrana citoplasmática también se

marcan con anexina V-FITC, pero esta unión PS-anexina se produce en la cara interna de la membrana.

El citómetro de flujo es un aparato que cuenta el número de cuerpos marcados con distintos fluorocromos. Si se utilizan a la vez los fluorocromos FITC (anexina V-FITC) (A) y el IP se pueden cuantificar las distintas poblaciones formadas por células vivas (A-, IP-), células apoptóticas (A+, IP-) y células necróticas o apoptóticas avanzadas (A+/IP+). En nuestro caso hemos estudiado cada vez 10.000 células en un citómetro FACS Calibur Becton & Dickinson y el programa *Cell Quest* para el análisis de los resultados.

Para ello, incubamos 400.000 células/ml con los factores deseados durante 4 horas. Después de lavar las células, las resuspendimos en 200 µl tampón BB *binding buffer*: 10 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂ y les añadimos 0,6 µl de anexina (Annexin V-FITC; Bender MedSystems, Boehringer Ingelheim) durante 30 minutos, a oscuras y a temperatura ambiente, para entonces añadirles otros 200 µl de BB y 4 µl de IP (de una solución stock preparada con 50 µg/ml).

Los estudios de citometría de flujo fueron realizados en la línea celular Jurkat. Las muestras utilizadas en estos ensayos fueron CS-2170, SV-2170 y prodigiosina pura. En el estudio del efecto del inhibidor de caspasas Z-VAD, hicimos una preincubación de 1 hora con 50 µM Z-VAD.fmk (solución stock, 10mM Z-VAD.fmk en DMSO); en el estudio del efecto de los ésteres de forbol en células tratadas con prodigiosina hicimos una preincubación de 30 minutos con 50 nM TPA (solución stock 100mM). El tiempo de incubación con la droga en ambos casos fue de 4 horas.

PRECIPITACIÓN DE LAS PROTEINAS PRESENTES EN EL SOBRENADANTE BACTERIANO CON TCA

Tras cultivar *S. marcescens* 2170 en PG durante de 48 horas y separar la masa bacteriana por centrifugación a 6.000 x g durante 15 minutos, recogimos el sobrenadante, lo filtramos y le añadimos inhibidores de la proteólisis (1µg/ml leupeptina, 1µg/ml pepstatina, 0,1 mM PMSF y 1 mM EDTA) y la cantidad suficiente de ácido tricloroacético, TCA (SIGMA) para que quedara al 10% TCA; una vez mezclado lo dejamos 10 minutos a 4°C y entonces fue centrifugado a

12.000 x g, durante 10 minutos, a 4°C; el sedimento fue lavado con acetona fría (centrifugando la muestra de nuevo). El precipitado obtenido fue resuspendido en 50µl de PBS y conservado a -80°C. La cantidad de proteína de esta muestra fue determinada por el método de Bradford.

OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN PROTEICA DE LAS LÍNEAS CELULARES

Para obtener una fracción de proteínas totales utilizamos 9 millones de células por condición (400.000 células/ml); una vez transcurrido el tiempo de incubación con la droga (de 3 a 8 horas, en función de la línea celular estudiada), tanto las células tratadas como las no tratadas (control negativo) fueron lavadas con PBS frío; entonces, 8 millones de células se resuspendieron en 400µl de tampón de lisis (85 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 0,2% PMSF, 0,1% leupeptina y 0,1% aprotinina) y se centrifugaron a 11.500 x g durante 10 minutos, a 4°C. Al sobrenadante resultante se le hizo un vórtex fuerte y se calentó a 93°C durante 10 minutos para romper el DNA, antes de ser alicuotado y conservado a -80°C.

Paralelamente, para ver si la droga ha hecho efecto hicimos el estudio de la fragmentación del DNA con el millón de células sobrante.

La línea celular Jurkat fue la utilizada para estudiar el efecto del TPA con la droga; en este estudio, las células fueron pretratadas durante media hora con 50nM de TPA.

EXTRACCIÓN PROTEICA PARA LA DETECCIÓN DEL CITOCROMO C (Piqué *et al.*, 2000).

Para este ensayo se utilizaron 9 millones de células Jurkat por condición (750.000 células/ml), las cuales fueron incubadas en ausencia o presencia de distintas dosis de droga, durante 3 horas. Pasado este tiempo, pasamos a trabajar en la cámara fría, donde las células fueron lavadas con PBS frío y entonces, 7 millones de células fueron tratadas durante 30 segundos con un tampón de lisis frío (250 mM sucrosa, 1 mM EDTA, 0,1% digitoxina, 25 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 mM DTT, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina, 1 µg/ml aprotinina, 1mM benzamidina y 100 µM PMSF). El lisado obtenido fue centrifugado a 11.500 x g durante 2 minutos, a 4°C. Con este método de extracción, el sobrenadante que se obtiene en este último

paso se corresponde con la fracción citosólica, aunque contaminado de membranas, mientras que el sedimento es rico en mitocondrias (fracción mitocondrial).

Como control hicimos paralelamente los siguientes ensayos: ensayo de la viabilidad (con 75.000 células/pocillo), estudio de la fragmentación del DNA (con 600.000 células) y cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo (con 750.000 células).

CUANTIFICACIÓN PROTEICA DE LOS EXTRACTOS CELULARES

Para calcular la concentración de los diferentes extractos proteicos utilizamos el método del ácido bicinonámico (BCA) (Smith *et al.*, 1985).

ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA

Electroforesis en una dimensión

La técnica llamada SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis*) permite separar las proteínas de una muestra en función de su tamaño, mediante la aplicación de un campo eléctrico, siendo la movilidad proteica función lineal del logaritmo del peso molecular de las proteínas (Laemmli, 1970; Dunbar, 1990). Para ello, las muestras son tratadas con un tampón de carga desnaturizante que contiene, entre otros componentes, el detergente aniónico SDS que les confiere carga neta negativa. Se utilizan geles con mayor o menor % de acrilamida según interese observar proteínas de bajo o alto peso molecular; nosotros hemos empleado geles con 7, 12 y 15 % de acrilamida, siempre en condiciones reductoras. Como estándar de peso molecular hemos utilizado uno de amplio rango, que va desde 200 hasta 6,5 kDa (BioRad, 161-0317).

Para realizar la electroforesis vertical, hemos procedido según se indica en la siguiente receta:

Se prepara el gel resolutivo según la proporción de acrilamida deseada “X” expresada en % P/V y que contiene: “X” acrilamida, 0,025 x “X” bis-acrilamida, 354 mM Tris-HCl pH 8,8,

0,1% SDS, 0,05% TEMED y 0,05% persulfato amónico. Una vez polimerizado se añade el gel empaquetador (3% acrilamida, 0,08% bis-acrilamida, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1% TEMED y 0,15% persulfato amónico). Nosotros hemos trabajado con geles de dos tamaños diferentes (pequeños: 1,5mm x 9cm x 9cm o medianos: 1,5mm x 14cm x 14cm).

Las muestras a cargar se diluyen en un tampón de muestra o de disociación 5X (60mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 20% P/v glicerol, 0,01% azul de bromofenol y 5% β -mercaptoetanol) en la proporción 4:1 y se hierven durante 5 minutos antes de ser cargadas en el gel. La electroforesis se realiza con tampón electrolito 1X (25mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicina y 0,1%SDS). Según se trate de geles pequeños o medianos se corren a 100 voltios hasta la salida del frente (de 2 a 3 horas) o se dejan correr durante la noche a 50 voltios y después a 100-120 voltios hasta la salida del frente (1-3 horas más).

TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A UNA MEMBRANA DE PVDF

Después de correr la electroforesis las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de PVDF (Immobilon-P[®], Millipore), durante 30 minutos a 20 voltios y 2 horas a 60 voltios, a 4°C, en tampón de transferencia 1X (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,02% SDS y 20% metanol) (Moors *et al.*, 1988; Szewczyk & Summers, 1988), o bien a 20V durante la noche y 30 minutos a 60V.

Tras la transferencia siempre hicimos las siguientes comprobaciones:

- 1) que en todas las muestras se hubiese cargado la misma cantidad de proteína; para ello, las membranas se tiñeron con Ponceau S durante 5 minutos (0,5% Ponceau S y 1% ácido acético) y se destiñeron con TBS-T (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl y 0,1% Tween 20).
- 2) que la transferencia hubiese sido correcta, mediante la tinción de los geles con solución de Coomassie (0,25% azul de Coomassie G-250, 45% metanol y 10% ácido acético) durante 10 minutos que a continuación era desteñida con una solución desteñidora (5% metanol y 7,5% ácido acético).

WESTERN BLOT

Las membranas fueron bloqueadas con un 5% de leche en polvo en TBS-T (5% LP/TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente y después se dejaron incubando con el anticuerpo primario diluido en 5% LP/TBS-T, durante la noche, a 4°C; tras lavar las membranas tres veces con 5% LP/TBS-T, se incubaron con el anticuerpo secundario pertinente conjugado con peroxidasa (HRP), diluido 1000 veces en 5% LP/TBS-T, durante 1 hora, a temperatura ambiente; a continuación se lavaron las membranas 3 veces con TBS-T, y se reveló el marcaje de la peroxidasa por quimioluminiscencia (0,08% luminol y 0,02% p-yodofenol, ambos en DMSO, 50 mM Tris-HCl pH 9,0 y 0,01% H₂O₂) (Ausubel *et al.*, 1987).

Anticuerpos primarios utilizados:

- c-Fos: anticuerpo policlonal hecho en cabra; dilución de trabajo 1:500 en 5% LP/TBS-T y NaN₃ (0,05%). Santa Cruz Biotechnology. *c-Fos (4-10)*, cat # sc-52-G.
- c-Jun: anticuerpo policlonal hecho en conejo; dilución de trabajo 1:100 en 5% LP/TBS-T y NaN₃ (0,05%). Calbiochem, Darmstadt, Germany. *c-jun/AP-1 (Ab-1)*, cat # PC06.
- Caspasa 3: Anticuerpo monoclonal hecho en ratón; dilución de trabajo 1:1000 en 2% LP/TBS-T y 0,05% azida sódica (NaN₃). Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA. *Ref. C31720*.
- Caspasa 8: Anticuerpo monoclonal hecho en ratón; dilución de trabajo 1:500 en 2% LP/TBS-T y 0,05% NaN₃. Cell Diagnostica, Münster, Germany. *Mab anti-hu Caspase8-p18*, #06 01 0001
- Caspasa 9: anticuerpo policlonal hecho en conejo, contra la forma activa de la caspasa 9; dilución de trabajo 1:500 en 2% LP/TBS-T y 0,05% NaN₃. New England Biolabs INC. *Cleaved Caspase-9 (37 kDa) Antibody*, #9501
- Citocromo C: Anticuerpo monoclonal hecho en ratón; dilución de trabajo 1:500 en 2% LP/TBS-T y 0,05% NaN₃. Pharmingen, San Diego, CA, USA. *Purified Anti-Cytochrome c Antibody*, #65981A.
- ERK1 y ERK2 fosforiladas: anticuerpo monoclonal hecho en ratón contra la forma precursora, la pro-caspasa 3; dilución de trabajo 1:1.000 en 5% LP/TBS-T y NaN₃ (0,05%). New England BioLabs, INC. *Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) E10*, #9106.

- ERK1: anticuerpo policlonal hecho en conejo; dilución de trabajo 1:200 en 5% LP/TBS-T y NaN_3 (0,05%). Santa Cruz Biotechnology. *ERK1 (K-23)-G, sc-94-G*.
- ERK2: anticuerpo policlonal hecho en conejo; dilución de trabajo 1:200 en 5% LP/TBS-T y NaN_3 (0,05%). Santa Cruz Biotechnology. *ERK1 (C-14)-G, sc-154-G*.
- PARP: anticuerpo policlonal hecho en conejo; Dilución de trabajo 1:1.000 en 2% LP/TBS-T y NaN_3 (0,05%). Boehringer Mannheim. *Anti-poly-(ADP-ribose)-polymerase, cat. No. 1 835 238*.

Anticuerpos secundarios:

- Goat Anti Mouse-HRP: dilución de trabajo 1:1.000 en 5% LP/TBS-T. BioRad. *IgG (H+L)-HRP conjugated, Cat. No. 170-6516*.
- Goat Anti Rabbit-HRP: dilución de trabajo 1:1.000 en 5% LP/TBS-T. BioRad. *IgG (H+L)-HRP conjugated, Cat. No. 170-6515*.
- Rabbit Anti Goat-HRP: dilución de trabajo 1:1.000 en 5% LP/TBS-T. DAKO A/S, Denmark. *Peroxidase-conjugated Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins, Code No. P0449*.

TINCIÓN DE GELES DE ACRILAMIDA CON SALES DE PLATA

Para conocer el patrón proteico de los extractos bacterianos, separamos las proteínas por SDS-PAGE y después teñimos el gel con sales de plata.

Para ello, fijamos el gel con 30% etanol y 10% ácido acético de 30 minutos a 16 horas; posteriormente hicimos 6 lavados con agua de 10 minutos cada uno y dejamos el gel un minuto con 0,02% tiosulfato sódico; tras hacer dos lavados con agua de un minuto cada uno, se añadieron 100 ml de una solución que contenía 0,2% AgNO_3 y 70 μl formaldehído; pasados 30 minutos lavamos el gel con agua durante un minuto y se lo revelamos con 100 ml de una solución que contenía 6 g Na_2CO_3 , 50 μl formaldehído y 50 μl tiosulfato sódico al 2%; para detener la reacción añadimos 3,5 ml ácido acético glacial y diez minutos después hicimos 4 lavados con agua de 30 minutos cada uno.

SEPARACIÓN EN COLUMNA POR GEL FILTRACIÓN(protocolo de Lluís Riera)

Esta técnica se aplicó para separar una muestra CS-2170 en fracciones. Para ello se utilizó una columna Hiprep® Sephacryl S-200 de alta resolución de medida 16/60, que permite trabajar con proteínas del rango de 5-250 kDa, conectada a una bomba peristáltica, y procedimos de la siguiente forma:

Se cargaron 4 ml de muestra CS-2170 (con una concentración proteica de 1 µg/ml) al principio de la columna, y a continuación se pasaron 100 ml de tampón de elución (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM KCl, 200 µM PMSF, 1 µM leupeptina, 2 µM pepstatina y 0,3 µM aprotinina) con una velocidad de elución de 1 ml/minuto, a 4°C. En total se recogieron 100 fracciones de 1 ml cada una. Las cinco primeras fueron descartadas por considerar que no había dado tiempo a que la muestra saliera de la columna; el resto fueron alicuotadas y conservadas a -20°C.

TRATAMIENTO ENZIMÁTICO Y TÉRMICO DE LAS MUESTRAS CON NATURALEZA PEPTÍDICA

Con el objeto de hidrolizar y desnaturalizar los posibles péptidos y/o proteínas presentes en la muestra CS-2170, sometimos a distintos tratamientos enzimáticos y térmicos a dicha muestra y a la fracción F33.

Tratamientos enzimáticos:

Las muestras fueron tratadas con diferentes proteasas, solas o combinadas entre sí:

- Tripsina: 50 µg/ml en 100 mM NaHCO₃ pH 7,5
- EDTA: 1 mM EDTA
- Proteasa V8: 5 unidades/ml en 0,2% SDS

La incubación con las distintas proteasas se hizo a 37°C durante 5 horas; a continuación les añadimos un cóctel de inhibidores de proteasas (1µg/ml leupeptina, 1µg/ml pepstatina y

0,1mM PMSF), antes de estudiar su efecto. Como control negativo utilizamos el cóctel de proteasas y sus inhibidores.

Tratamientos térmicos:

Se hicieron tres tratamientos térmicos diferentes:

- Incubamos la muestra a 100°C, durante 15 minutos
- Incubamos la muestra a 65°C, durante 45 minutos
- Incubamos la muestra a 37°C, durante 5 horas

PURIFICACIÓN DE LA PRODIGIOSINA

La purificación e identificación de la prodigiosina han sido llevadas a cabo en colaboración con el Laboratorio de Espectrometría de Masas y con el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Químicas de la Universitat de Barcelona.

Tras hacer un cultivo de *S. marcescens* 2170 a gran escala (en un litro de medio PG), la masa bacteriana fue recogida por centrifugación a 6.000 x *g* durante 15 minutos y con ella se hizo la extracción del pigmento con metanol-HCl; con esta extracción se procedió al análisis químico de la muestra y a la purificación del principio activo responsable del efecto apoptótico descrito en esta tesis doctoral, según se explica a continuación:

1A. Tras eliminar el disolvente al vacío, la muestra fue liofilizada (extracto crudo) y analizada por espectrometría de masas por la técnica de ionización por electrospray (ESI-MS).

El espectrómetro utilizado fue un VG-Quattro de Micromass, trabajando en modo de ionización positivo, con N₂ como gas nebulizante y secado (utilizando un flujo de 10 y 450 l/h respectivamente) con una temperatura de la fuente de 80°C, un voltaje del capilar de 3,5 RV y un voltaje de foco de 57 V. La detección de los iones se hizo con Scan, mediante barridos de *m/z* 150-1.500.

1B. La muestra fue cromatografiada para aislar una primera fracción que teóricamente contenía el pigmento prodigiosina. Para ello:

- * Se hizo un análisis de la muestra por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando como solvente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (6:4).
- * Posteriormente se hizo una cromatografía líquida en fase normal a presión atmosférica utilizando una columna de vidrio (30x1,5cm) revestida de sílica chromagel (40-60 mecrone, 230-400 meah).
- * Se cromatografiaron 10 ml de crudo, efectuando su elución con la siguiente batería de disolventes:
 - + 30 ml CHCl_3
 - + 20 ml CHCl_3 / metanol (9,5:0,5)
 - + 30 ml CHCl_3 / metanol (9:1)
 - + 30 ml CHCl_3 / metanol (8:2)
 - + 30 ml CHCl_3 / metanol (6:4)

El control analítico de las fracciones eluidas se realizó en continuo por TLC, en $\text{CHCl}_3/\text{metanol}$ (6:4).

Las fracciones eluidas de interés se juntaron, el solvente se eliminó en el rotavapor y la muestra fue redisuelta en $\text{H}_2\text{O}/\text{metanol}$ antes de ser liofilizada.

2. El producto redisuuelto en metanol fue analizado por ESI-MS, utilizando las mismas condiciones que en el punto 1A.

3. La fracción aislada fue purificada por cromatografía líquida a alta presión en fase reversa (HPLC), utilizando un HPLC Shimadzu formado por dos bombas modelo LC-10AD, un inyector automático modelo SIL-10A y un detector UV/Vis diode-array Shimadzu CBM-10A conectado a un ordenador Pentium Deskpro Q.

Para la separación se utilizó una columna Nucleosil C_{18} (25x0,4cm) con un relleno de octadecilsilica de 5 μm de diámetro de partícula y 120 Å de tamaño de poro, manteniendo un flujo de 1ml/minuto, utilizando gradientes lineales de 0% a 100% de B en A en 30 minutos y después 10 minutos de 100% B, siendo A: AcONH_4 0,01M, pH 7,0 y B: CH_3CN .

La detección se hizo de forma continua a lo largo de todo el espectro del Ultravioleta-Visible, siendo 534 nm la longitud de onda de interés.

4. La fracción en estudio fue analizada por cromatografía semipreparativa HPLC/ESI-MS; para ello se utilizó una columna Nucleosil C₁₈ (25x1cm) y se operó con un HPLC Shimadzu LC-9A, manteniendo un flujo de 3 ml/minuto; los eluyentes y gradientes fueron los mismos que en el punto 3. El eluyente de la columna estaba conectado a un detector de longitud de onda variable (micro UVIS 20, Carlo Erba Instrument).

El producto eluido fue dividido con un divisor de flujo Micro-Tech Scientific (1:50) para poder utilizar un flujo de 20µl/minuto dentro del sistema de electrospray (ESI-MS); el resto de la elución fue recogida manualmente en diferentes fracciones.

Los espectros de masa fueron adquiridos por un espectrómetro de masas VG-Quattro de triple cuadrupolo (Micromass Instruments), en las mismas condiciones de trabajo que las explicadas en el punto 1A, a una velocidad de 1 segundo sobre el rango de masas m/z 50-1.500 y se guardaron y procesaron utilizando el software Masslynx, versión 1.03.

Como la muestra tubo que ser inyectada en varias veces, al final se juntaron las fracciones correspondientes al producto que eluía de la columna y que según el ESI-MS se correspondía a la m/z 324,4 y se eliminó el solvente por liofilización.

* Esta muestra se volvió a analizar por ESI-MS con introducción directa, para comprobar su contenido, utilizando como solvente H₂O/CH₃CN (1:1 ^{v/v}) o H₂O/CH₃CN (1:1 ^{v/v})+ 1% ácido fórmico. La obtención del espectro fue en las mismas condiciones que en el caso del HPLC/ESI-MS.

5. Finalmente, para poder caracterizar el producto, la muestra fue disuelta en CD₃OD y se procedió a su análisis por RMN-H¹ a 500MHz.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams GA, Young R.** Constitution of extracellular and capsular polysaccharides of *Serratia marcescens*. *Ann NY Acad Sci.* 1966;133:527-45.
- Agarwal B, Rao CV, Bhendwal S, Ramey WR, Shirin H, Reddy BS, Holt PR.** Lovastatin augments sulindac-induced apoptosis in colon cancer cells and potentiates chemopreventive effects of sulindac. *Gastroenterology.* 1999;117:838-47.
- Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES.** CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res.* 1997;57:615-9.
- Akimenko VK, Trutko SM.** Physiological role of the oversynthesis of intermediates and he biosynthesis of metabolites for microorganism-producers. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 1991;27:17-35.
- Allen EG.** Conditions of the colour change of prodigiosin. *Nature.* 1967;216:929-31.
- Antonsson B, Martinou JC.** The bcl-2 protein family. *Exp Cell Res.* 2000;256:50-57.
- Arab S, Murakami M, Dirks P, Boyd B, Hubbard SL, Lingwood CA, Rutka JT.** Verotoxins inhibit the growth of and induce apoptosis in human astrocytoma cells. *J Neurocol.* 1998;40:137-50.
- Arab S, Rutka J, Lingwood C.** Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, long-term elimination of human astrocytoma xenografts in nude mice. *Oncol Res.* 1999;11:33-9.
- Armand JP, Cunningham D, van Cutsem E, Misset JL, Kohne CH.** Clinical advances with topoisomerase I inhibitors in gastrointestinal malignancies. *Anti-Cancer Drug.* 1999;10:5-12.
- Ascaso R, Marvel J, Collins MK, Lopez-Rivas A.** Interleukin-3 and Bcl2 cooperatively inhibit etoposide-induced apoptosis in a murine pre-B cell line. *Eur J Immunol.* 1994;24:537-41.
- Asch H, Winston J, Edge S, Stomper P, Asch B.** Down-regulation of gelsolin expression in human breast ductal carcinoma in situ with and without invasion. *Breast Cancer Res Treat.* 1999;55:179-88.
- Assoian R, Zhu X.** Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9:1997.
- Aucken HM, Pitt TL.** Antibiotic resistance and putative virulence factors of *Serratia marcescens* with respect to O and K serotypes. *J Med Microbiol.* 1998;47:1105-13.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K.** *Current protocols in molecular biology.* Vol. 2 USA: Greene publishing associates & Wiley-Interscience; 1987.
- Ayscough KR, Stryker J, Pokala N, Sanders M, Crews P, Drubin DG.** High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor lantruculin-A. *J Cell Biol.* 1997;137:399-416.
- Azuma T, Watanabe N, Yagisawa H, Hirata H, Iwamura M, Kobayashi Y.** Induction of apoptosis of activated murine splenic T cells by cycloprodigiosin hydrochloride, a novel immunosuppressant. *Immunopharmacol.* 2000;46:29-37.

Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene*. 1998;17:3261-70.

Bannerji R, Byrd JC. Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Oncol*. 2000;12:22-9.

Bartlett WT, O'Donovan GA, Neff RD. Effect of gamma radiation on *Serratia marcescens*. Studies on the radiosensitivity of prodigiosin production. *Radiat Res*. 1970;43:196-203.

Bauer G, Bebb C, Berard M, et al. *Apoptosis and its modulation by drugs*. Handbook of experimental pharmacology. Vol. 142 Berlin: Springer; 2000. Cameron R, Feuer G, eds.

Bellosillo B, Dalmau M, Colomer D, Gil J. Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 1997;89:3378-84.

Bellosillo B, Piqué M, Barragán M, Castaño E, Villamor N, Colomer D, Montserrat E, Pons G, Gil J. Aspirin and Salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 1998;92:1406-14.

Bergey DH, Harrison FC, Breed RS, Hammer BW, Huntoon FM. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 1 ed Baltimore: Williams & Wilkins; 1923.

Bizio B. Lettera di Bartolomeo Bizio al chiarissimo canonico Angelo Bellani sopra il fenomeno della polena porporina. *J Bacteriol*. 1924;9:527.

Blazevic DJ, Daschner FD, Farrar WE, Hedges RW, Morris MJ, Neu HC, Hussain-Qadri SM, Rubin SJ, Simberkoff MS, Traub WH, von Graevenitz A, Williams RP, Young VM. *The genus Serratia* Florida: CRC Press, Inc; 1980. von Graevenitz A, Rubin S, eds.

Bloom PD, Boedeker EC. Mucosal immune responses to intestinal bacterial pathogens. *Semin Gastrointest Dis* 1996;7:151-66.

Boger DL, Patel M. Total synthesis of prodigiosin, prodigiosene, and desmethoxyprodigiosin: Diels-Alder reactions of heterocyclic azadienes and development of an effective palladium (II)-promoted 2,2'-bipyrrrole coupling procedure. *J Org Chem*. 1988;53:1405-15.

Bonnett, R. Oxygen activation and tetrapyrroles. *Essays biochem*. 1981;17:1-51.

Bowen ID, Bowen SM, Jones AH. The structural and physiological basis of apoptosis and mitosis. *Mitosis and apoptosis. Matters of life and death*. London: Chapman & Hall; 1998.

Bracey TS, Miller JC, Preece A, Paraskeva C. Gamma-radiation-induced apoptosis in human colorectal adenoma and carcinoma cell lines can occur in the absence of wild type p53. *Oncogene*. 1995;10:2391-6.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

Breed CS, Breed ME. The genus *Serratia* Bizio. *Zentralbl Bakteriell Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt*. 1927;2, 71, 435.

- Brimmell MR, Mendiola R, Mangion JD, Packham GD.** Bax frameshift mutations in cell lines derived from human haemopoietic malignancies are associated with resistance to apoptosis and microsatellite instability. *Oncogene*. 1998;16:1803-12.
- Brinkmann U.** Recombinant immunotoxins: protein engineering for cancer therapy. *Mol Med Today*. 1996;2:439-46.
- Brown JM, Wouters BG.** Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res*. 1999;59:1391-99.
- Bubb M, Spector I, Berhsadsky A, Korn E.** Swinholide A is a microfilament disrupting marine toxin that stabilizes actin dimers and severs actin filaments. *J Biol Chem*. 1995;270:3463-66.
- Buchanan RE.** Studies in the nomenclature and classification of the bacteria. V. Subgroups and genera of the *Bacteriaceae*. *J Bacteriol*. 1918;3:27.
- Bunting MI.** A description of some color variants produced by *Serratia marcescens*, strain 274. *J Bacteriol*. 1940;40:57.
- Bunting MI, Robinow CF, Bunting H.** Factors affecting the elaboration of pigment and polysaccharide by *Serratia marcescens*. *J Bacteriol*. 1949;58:114.
- Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B.** Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest*. 1999;104:263-69.
- Cameron R, Feuer G.** Incidence of apoptosis and its pathological and biochemical manifestations. In: Cameron R, Feuer G, eds. *Apoptosis and its modulation by drugs*. Vol. 142. Berlin: Springer-Verlag; 2000a:1-35.
- Cameron R, Feuer G.** Molecular cellular and tissue reactions of apoptosis and their modulation by drugs. In: Cameron R, Feuer G, eds. *Apoptosis and its modulation by drugs*. Vol. 142. Berlin: Springer-Verlag; 2000b:37-57.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B.** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;72:3666-70.
- Cascallo M, Calbo J, Gelpi JL, Mazo A.** Modulation of drug cytotoxicity by reintroduction of wild-type p53 gene (Ad5CMV-p53) in human pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther*. 2000;7:545-56.
- Castaño E, Dalmau M, Barragan M, Pueyo G, Bartrons R, Gil J.** Aspirin induces cell death and caspase-dependent phosphatidylserine externalization in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Br J Cancer*. 1999;81:294-99.
- Castro AJ.** Antimalarial activity of prodigiosin. *Nature*. 1967;213:903-4.
- Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI, Roth KA, Gruss P.** Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell*. 1998;94:727-37.

Chandra J, Niemer I, Gilbreath J, Kliche KO, Andreeff M, Freireich EJ, Keating M, McConkey DJ. Proteasome inhibitors induce apoptosis in glucocorticoid-resistant chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Blood*. 1998;92:4220-4229.

Chen E, Haas M. Frequent mutations in the p53 tumor suppressor gene in human leukemia T-cell lines. *Mol Cell Biol*. 1990;10:5502-09.

Chen Y, Zychlinsky A. Apoptosis induced by bacterial pathogens. *Microb Pathogenesis*. 1994;17:203-12.

Chen B, de Witte PA. Photodynamic therapy efficacy and tissue distribution of hypericin in a mouse P388 lymphoma tumor model. *Cancer Lett*. 2000;150:111-7.

Chen HJ, Hwang CL, Wang CH, Hwang J. Degradation of DNA topoisomerase I by a novel trypsin-like serine protease in proliferating human T lymphocytes. *J Biol Chem*. 2000;275:13109-17.

Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. Conversion of Bcl2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*. 1997;278:1966-8.

Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1996;271:4961-5.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science*. 1997;275:1122-6.

Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*. 1995;268:233-9.

Clow A, Greenhalf W, Chaudhuri B. Under respiratory growth conditions, Bcl-x(L) and Bcl-2 are unable to overcome yeast cell death triggered by a mutant Bax protein lacking the membrane anchor. *Eur J Biochem*. 1998;258:19-28.

Cooper JA. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*. 1987;105:1473-77.

Cotter TG. Induction of apoptosis in cells of the immune system by cytotoxic stimuli. *Semin Immunol*. 1992;4:399-405.

Cruz-Camariño R, Sánchez-Zúñiga AA. Complex protein-prodigiosin in *Serratia marcescens*. *Nature*. 1968;218:567-8.

Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Gene Dev*. 1998;12:1551-70.

Dahlman A, Wile AG, Burns RG, Mason GR, Johnson FM, Berns MW. Laser photoradiation therapy of cancer. *Cancer Res*. 1983;43:430-4.

Davis RJ. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem Sci*. 1994;19:470-3.

Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase. In: Downes C, Wolf C, Lane D, eds. *Cellular responses to stress*. Vol. 64. London: Portland Press; 1999:1-12.

- De Feudis P, Vignati S, Rossi C, Mincioni T, Giavazzi R, D'Incalci M, Broggin M.** Driving p53 response to Bax activation greatly enhances sensitivity to taxol by inducing massive apoptosis. *Neoplasia*. 2000;2:202-7.
- De Toni JB, Trevisan V.** *Schizomycetaceae* Naeg. *Sylloge Funnorum*. 1889;81:923.
- Ding MJ, Williams RP.** Biosynthesis of prodigiosin by white strains of *Serratia marcescens* isolated from patients. *J Clin Microbiol*. 1983;17:476-80.
- Donehower LA, Harvey ML, Slagle BJ, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A.** Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992;356:215-21.
- Duan H, Dixit VM.** RAIDD is a new 'death' adaptor molecule. *Nature*. 1997;385:86-9.
- Dunbar BS.** *Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques* New York: Plenum Press; New York; 1990.
- Duska LR, Hamblin MR, Miller JL, Hasan T.** Combination photoimmunotherapy and cisplatin: effects on human ovarian cancer ex vivo. *J Natl Cancer I*. 1999;91:1557-63.
- Ermoleva ZV, Vaisberg GE, Braude AE, Ravich IV, Golosova TV, Pasternak NA.** Effect of bacterial polysaccharides on tumor growth *in vivo*. *Antibiotiki (Moscow)*. 1965;10:134.
- Fanger GR, Gerwins P, Widmann C, Jarpe MB, Johnson GL.** MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev*. 1997;7:67-74.
- Feng JS, Webb JW, Tsang JC.** Enhancement of sodium dodecyl sulfate of pigment formation in *Serratia marcescens*. *Appl Environ Microb*. 1982;43:850-54.
- Ferrante K, Winograd B, Canetta R.** Promising new developments in cancer chemotherapy. *Cancer Chemoth Pharm*. 1999;43:S61-8.
- Foote CS.** Mechanisms of photosensitized oxidation. There are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. *Science*. 1968;162:963-70.
- Foote CS.** Mechanisms of photooxygenation. *Prog Clin Biol Res*. 1984;170:3-18.
- Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J.** Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*. 1994;78:139-49.
- Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM.** Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med*. 1996;2:574-7.
- Fuchs RL, McPherson SA, Drahos DJ.** Cloning of a *Serratia marcescens* gene encoding chitinase. *Appl Environ Microb*. 1986;51:504-9.
- Fulda S, Sieverts H, Friesen C, Herr I, Debatin KM.** The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res*. 1997;57:3823-9.

García-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. Inhibition of human caspase by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem.* 1998;273:32608-32613.

Gaughran ER. From superstition to science: the history of a bacterium. *Transactions NY Acad Sci.* 1969;31:3-24.

Gerber NN. Prodigiosin-like pigments. *Crc Crit Rev Microbiol.* 1975;3:469-85.

Gibbs J, Oliff A. The potential of farnesyltransferase inhibitors as cancer chemotherapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:143-66.

Gibson AA, Harwood FG, Tillman DM, Houghton JA. Selective sensitization to DNA-damaging agents in a human rhabdomyosarcoma cell line with inducible wild-type p53 overexpression. *Clin Cancer Res.* 1998;4:145-52.

Goldschmidt MC, Williams RP. Thiamine-induced formation of the monopyrrole moiety of prodigiosin. *J Bacteriol.* 1968;96:609-16.

Goldwasser F, Bae I, Fornace AJ Jr, Pommier Y. Differential GADD45, p21CIP1/WAF1, MCL-1 and Topoisomerase II gene induction and secondary DNA fragmentation after camptothecin-induced DNA damage in two mutant p53 human colon cancer cell lines. *Oncol Res.* 1996;8:317-23.

Gottlieb RA, Nordberg J, Skowronski E, Babior BM. Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(654-8).

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998;281:1309-1312.

Grimont PAD, Grimont F, Dulong de Rosnay HLC, Sneath PHA. Taxonomy of the genus *Serratia*. *J Gen Microbiol.* 1977;98:39.

Grimont F, Grimont PAD. The genus *Serratia*. *The procaryots*, 1993.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Gene Dev.* 1999;13:1899-911.

Guillouf C, Wang TS, Liu J, Walsh CE, Poirier GG, Moustacchi E, Rosselli F. Fanconi anemia C protein acts at a switch between apoptosis and necrosis in mitomycin C-induced cell death. *Exp Cell Res.* 1999;246:384-94.

Gururajanna B, Al-Katib AA, Li YW, Aranha O, Vaitkevicius VK, Sarkar FH. Molecular effects of taxol and caffeine on pancreatic cancer cells. *Int J Mol Med.* 1999;4:501-7.

Guseva SA, Tishchenko LM. Effect of prodigiosin on the antibody-dependent cytotoxicity of neutrophils in chronic myeloid leukemia. *Voprosy Onkologii.* 1989;35:30-4.

Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jegou N, Asselain B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 1994;106:42-8.

Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* 1994;265:808-11.

- Han SB, Kim HM, Kim YH, Lee CW, Jang ES, Son KH, Ki SU, Kim YK.** T-cell specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia marcescens*. *Int J Immunopharmacol.* 1998;20:1-13.
- Hannun YA.** Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood.* 1997;89:1845-53.
- Hearn WR, Elson MK, Williams RH, Medina-Castro J.** Prodigiosene [5-(2-pyrryl)-2,2'-dipyrrylmethene] and some substituted prodigiosenes. *J Org Chem.* 1970;35:142-6.
- Heinemann B, Howard AJ, Palocz HJ.** Influence of dissolved oxygen levels on production of L-asparaginase and prodigiosin by *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol.* 1970;19:800-4.
- Hejazi A, Falkiner FR.** *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol.* 1997;46:903-12.
- Hermeking H, Funk JO, Reichert M, Ellwart JW, Eick D.** Abrogation of p53-induced cell cycle arrest by c-Myc: evidence for an inhibitor of p21WAF1/CIP1/SDI1. *Oncogene.* 1995;11:1409-15.
- Hildebrand A, Pohl M, Bhakdi S.** *Staphylococcus aureus* α -toxin: dual mechanisms of binding to target cells. *J Biol Chem.* 1991;266:17195-200.
- Hines D, Saurugger P, Inhker G, Benedik M.** Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol.* 1988;170:4141-6.
- Hirumura K, Pippin JW, Fero ML, Roberts JM, Shankland SJ.** Modulation of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}. *J Clin Invest.* 1999;103:597-604.
- Ho YS, Tsai PW, Yu CF, Liu HL, Chen RJ, Lin JK.** Ketoconazole-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human colorectal and hepatocellular carcinoma cell lines. *Toxicol Appl Pharm.* 1998;153:39-47.
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC.** Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acid Res.* 1994;22:3551-5.
- Holst-Hansen C, Brünner N.** MTT-cell proliferation assay. . *Cell biology: a laboratory handbook.* Vol. 1; 1998.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PA, Staley JT, Williams ST.** *Bergey's manual of determinative bacteriology.* Ninth ed, Baltimore (USA); 1994. Williams & Wilkins, ed.
- Homburg CH, de Haas M, von dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D.** Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood.* 1995;85:532-40.
- Hsu H, Xiong J, Goeddel DV.** The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell.* 1995;81:495-504.
- Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV.** TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity.* 1996;4:387-96.
- Huang C, Ma W, Li J, Hecht SS, Dong Z.** Essential role of p53 in phenethyl isothiocyanate-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1998;58:4102-06.

Huang L, Pardee AB. beta-lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Mol Med.* 1999;5:711-20.

Hueber AO, Zornig M, Lyon D, Suda T, Nagata S, Evan GI. Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science.* 1997;278:1305-9.

Hunter T. Signaling-2000 and beyond. *Cell.* 2000;100:113-27.

Inada T, Ichikawa A, Kubota T, Ogata Y, Moosa AR, Hoffman RM. 5-FU-induced apoptosis correlates with efficacy against human gastric and colon cancer xenografts in nude mice. *Anticancer Res.* 1997;17:1965-71.

Israel A. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB?. *Trends Cell Biol.* 2000; 10:129-33.

Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Oncologist.* 1999;4:332-9.

Izquierdo M. *Biología molecular del cáncer* Madrid: Síntesis S.A.; 1995.

Janmey PA, Chaponnier C. Medical aspects of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 1995;7:111-7.

Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem.* 1996;271:17920-6.

Jiang H, Granville DJ, McManus BM, Levy JG, Hunt DW. Selective depletion of a thymocyte subset in vitro with an immunomodulatory photosensitizer. *Clin Immunol.* 1999;91:178-87.

Johannes C, Obe G. Induction of chromosomal aberrations with benzon nuclease in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutation Res.* 1994;325:113-6.

Jonas D, Schultheis B, Klas C, et al. Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes. *Infect Immun.* 1993;61:1715-21.

Jones JDG, Grady KL, Suslow TV, Bedbrook JR. Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. *EMBO J.* 1986;5(3):467-73.

Jordan MA, Wilson L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10:123-30.

Jun CD, Park SJ, Choi BM, Kwak HJ, Park YC, Kim MS, Park RK, Chung HT. Potentiation of the activity of nitric oxide by the protein kinase C activator phorbol ester in human myeloid leukemic HL-60 cells: association with enhanced fragmentation of mature genomic DNA. *Cell Immunol.* 1997;176:41-9.

Kallunki T, Su B, Tsigelny I, Sluss HK, Derijard B, Moore G, Davis R, Karin M. JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.* 1994;8:2996-3007.

Karlinskii VM, Pozdniakova VP. Effectiveness of treating chronic cholecystitis by prodigiosan electrophoresis. *Antibiotiki (Moscow).* 1975;20:86.

- Kataoka T, Magae J, Nariuchi H, Yamasaki M, Nagai K.** Enhancement by concanavalin A of the suppressive effect of prodigiosin 25-C on proliferation of murine splenocytes. *J Antibio.* 1992;45:1303-12.
- Kataoka T, Muroi M, Ohkuma S, Waritani T, Magae J, Takatsuki A, Kondo S, Yamasaki M, Nagai K.** Prodigiosin 25-C uncouples vacuolar type H(+)-ATPase, inhibits vacuolar acidification and affects glycoprotein processing. *FEBS Lett.* 1995a;359:53-9.
- Kataoka T, Magae J, Yamasaki M, Nagai K.** Prodigiosin 25-C perturbs permeation of acetate in a cultured cell line. *Biosci Biotech Biochem.* 1995b;59:1891-5.
- Kato S, Muro M, Akifusa S, Hanada N, Semba I, Fujii T, Kowashi Y, Nishihara T.** Evidence for apoptosis of murine macrophages by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *Infect Immun.* 1995;63:3914-19.
- Kawahara A, Kobayashi T, Nagata S.** Inhibition of Fas-induced apoptosis by Bcl-2. *Oncogene.* 1998;17:2549-54.
- Kawauchi K, Shibutani K, Yagisawa H, Kamata H, Nakatsuji S, Anzai H, Yokoyama Y, Ikegami Y, Moriyama Y, Hirata H.** A possible immunosuppressant, cycloprodigiosin hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*. *Biochem Biophys Res Com.* 1997;237:543-7.
- Keenan KP, Sharpnack DD, Collins H, Formal SB, O'Brien AD.** Morphologic evaluation of the effects of Shiga toxin and E coli Shiga-like toxin on the rabbit intestine. *Am J Path.* 1986;125:69-80.
- Kelsen DP.** Adjuvant and neoadjuvant therapy for gastric cancer. *Semin Oncol.* 1996;23:379-389.
- Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV.** Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* 1994;73:2013-16.
- Khwaja A.** Akt is more than just a Bad kinase. *Nature.* 1999;401:33-4.
- Kobayashi N, Ichikawa Y.** A protein associated with prodigiosin formation in *Serratia marcescens*. *Microbiol Immunol.* 1989;33:257-63.
- Kobayashi N, Ichikawa Y.** Separation of the prodigiosin-localizing crude vesicles which retain the activity of protease and nuclease in *Serratia marcescens*. *Microbiol Immunol.* 1991;35:607-14.
- Kochi SK, Collier RJ.** DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res.* 1993;208:296-302.
- Kollmannsberger C, Mross K, Jakob A, Kanz L, Bokemeyer C.** Topotecan - A novel topoisomerase I inhibitor: pharmacology and clinical experience. *Oncology.* 1999;56:1-12.
- Komatsu N, Oda T, Muramatsu T.** Involvement of both caspase-like proteases and serine proteases in apoptotic cell death induced by ricin, modeccin, diphtheria toxin, and pseudomonas toxin. *J Biochem.* 1998;124:1038-44.

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

Konopleva M, Zhao S, Xie Z, Segall H, Younes A, Claxton DF, Estrov Z, Kornblau SM, Andreeff M. Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 1999;457:217-36.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood.* 1994;84(14):15-20.

Korsmeyer SJ. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.* 1999;59:1693-700.

Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 1997;278:294-8.

Koya RC, Fujita H, Shimizu S, Ohtsu M, Takimoto M, Tsujimoto Y, Kuzumaki N. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *J Biol Chem.* 2000;275:15343-9.

Kraft E. Beitrage zur biologie des *B. Prodigiosus* und zum chemischen verhalten seines pigments (Ph.D. Thesis). University of Wurzburg, Germany; 1902.

Krammer PH, Behrmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin KM. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol.* 1994;6:279-89.

Kyriakis JM. Making the connection: coupling of stress-activated ERK/MAPK (extracellular-signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) core signalling modules to extracellular stimuli and biological responses. In: Downes C, Wolf C, Lane D, eds. *Cellular responses to stress.* London: Portland Press; 1999.

Laboisse CL, Augeron C, Couturier-Turpin MH, Gespach C, Cheret AM, Potet F. Characterization of a newly established human gastric cancer cell line HGT-1 bearing histamine H₂-receptors. *Cancer Res.* 1982;42:1541-1548.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-5.

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA-Cancer J Clin.* 1999;49:8-31.

Langman M, Boyle P. Chemoprevention of colorectal cancer. *Gut.* 1998;43:578-85.

Lavin MF, Watters D, Song Q. Role of protein kinase activity in apoptosis. *Experientia.* 1996;52:979-94.

LeBien TW. Fates of human B-cell precursors. *Blood.* 2000;96:9-23.

- Lee MH, Kataoka T, Magae J, Nagai K.** Prodigiosin 25-C suppression of cytotoxic T cells *in vitro* and *in vivo* similar to that of concanamycin B, a specific inhibitor of vacuolar type H⁺-ATPase. *Biosci Biotech Biochem.* 1995;59:1417-21.
- Lee MH, Yamashita M, Tsuji R, Yamasaki M, Kataoka T, Magae J, Nagai K.** Suppression of T cell stimulating function of allogeneic antigen presenting cells by prodigiosin 25-C. *J Antibiot.* 1998;51:92-4.
- Letoffe S, Nato F, Goldberg ME, Wandersman C.** Interactions of HasA, a bacterial haemophore, with haemoglobin and with its outer membrane receptor HasR. *Mol Microbiol.* 1999;33:546-55.
- Levee MG, Dabrowska MI, Lelli JL Jr, Hinshaw DB.** Actin polymerization and depolymerization during apoptosis in HL-60 cells. *Am J Physiol.* 1996;271:1981-92.
- Li G, Tang L, Zhou X, Tron V, Ho V.** Chemotherapy-induced apoptosis in melanoma cells is p53 dependent. *Melanoma Res.* 1998;8:17-23.
- Li G, Bush JA, Ho VC.** p53-dependent apoptosis in melanoma cells after treatment with camptothecin. *J Invest Dermatol.* 2000;114:514-9.
- Lin B, Williams-Skipp C, Tao Y, Schleicher MS, Cano LL, Duke RC, Scheinman RI.** NK- κ B functions as both a proapoptotic and antiapoptotic regulatory factor within a single cell type. *Cell Death Differ.* 1999;6:570-82.
- Lindgren SW, Stojiljkovic I, Heffron F.** Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:4197-201.
- Liu X, Li P, Widlak P, Zou H, Luo X, Garrard WT, Wang X.** The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:8461-6.
- Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY.** Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:6803-8.
- Lohrum MAE, Vousden KH.** Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell Biol.* 2000;10:197-202.
- Lokich J.** Infusional 5-FU: historical evolution, rationale, and clinical experience. *Oncology.* 1998;12:19-22.
- Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE.** p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell.* 1993;74:957-67.
- Lu Z, Liu D, Hornia A, Devonish W, Pagano M, Foster DA.** Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol.* 1998;18:839-45.
- Lutzker SG, Levine AJ.** A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells is activated by either DNA damage or cellular differentiation. *Nature Med.* 1996;2:804-10.
- Majno G, Joris I.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. *Am J Pathol.* 1995;146:3-15.

Mangan DF, Taichman NS, Lally ET, Wahl SM. Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. *Infect Immun.* 1991;56:3267-72.

Mansat V, Laurent G, Levade T, Bettaieb A, Jaffrezou JP. The protein kinase C activators phorbol esters and phosphatidylserine inhibit neutral sphingomyelinase activation, ceramide generation, and apoptosis triggered by daunorubicin. *Cancer Res.* 1997;57:5300-4.

Martins LM, Earnshaw WC. Apoptosis: alive and kicking in 1997. *Trends Cell Biol.* 1997;7:111-114.

Matsuyama T, Murakami T, Fujita M, Fujita S, Yano I. Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. *J Gen Microbiol.* 1986;132:865-75.

Matsuyama T, Bhasin A, Harshey RM. Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. *J Bacteriol.* 1995;177:987-91.

Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nature Cell Biol.* 2000;2:318-25.

McArthur HL, Agarwal ML, Bacchetti S. Induction of fragility at the human RNU2 locus by cytosine arabinoside is dependent upon a transcriptionally competent U2 small nuclear RNA gene and the expression of p53. *Somat Cell Molec Gen.* 1997;23:379-89.

McCubrey JA, Stratford-May W, Duronio V, Mufson A. Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia.* 2000;14:9-21.

McQuillen K. The physical organization of nucleic acid and protein synthesis. In: Pollock M, Richmond M, eds. *Function and structure in micro-organisms*. London: Cambridge University Press; 1965.

Meijerink JP, Mensink EJ, Wang K, Sedlak TW, Sloetjes AW, de Witte T, Waksman G, Korsmeyer SJ. Hematopoietic malignancies demonstrate loss-of-function mutations of BAX. *Blood.* 1998;91:2991-7.

Meiss G, Friedhoff P, Hahn M, Gimadutdinow O, Pingoud A. Sequence preferences in cleavage of dsDNA and ssDNA by the extracellular *Serratia marcescens* endonuclease. *Biochemistry.* 1995;34:11979-88.

Melo PS, Durán N, Haun M. Cytotoxicity of prodigiosin and benznidazole on V79 cells. *Toxicol Lett.* 2000;116:237-42.

Mew D, Wat CK, Towers GH, Levy JG. Photoimmunotherapy: treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates. *J Immunol.* 1983;130:1473-7.

Mgbonyebi O, Russo J, Russo I. Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res.* 1999;59:1903-10.

Mody RS, Heidarynejad V, Patel AM, Dave PJ. Isolation and characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in prodigiosin biosynthesis. *Curr Microbiol.* 1990;20:95-103.

Monack DM, Raupach B, Hromockyj AE, Falkow S. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:9833-38.

- Monreal J, Reese ET.** The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can J Microbiol.* 1969;15:689-96.
- Montserrat E, Bosch F, Rozman C.** B-cell chronic lymphocytic leukemia: recent progress in biology, diagnosis, and therapy. *Ann Oncol.* 1997;8:93-101.
- Moors M Jr, Nguyen NY, Liu TY.** Reproducible high yield sequencing of proteins electrophoretically separated and transferred to an inert support. *J Biol Chem.* 1988;263:6005-8.
- Morimoto H, Bonavida B.** Diptheria toxin and pseudomonas A toxin mediated apoptosis. *J Immunol.* 1992;149:2089-94.
- Morrison DA.** Prodigiosin synthesis in mutants of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol.* 1966;91:1599-604.
- Mortellaro A, Songia S, Gnocchi P, Ferrari M, Fornasiero C, D'Alessio R, Isetta A, Colotta F, Golay J.** New immunosuppressive drug PNU156804 blocks IL-2-dependent proliferation and NF-kappa B and AP-1 activation. *J Immunol.* 1999;162:7102-9.
- Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth.* 1983;65:55-63.
- Mowart MRA.** p53 in tumor progression: life, death, and everything. In: Press A, ed. *Advances in cancer research*; 2000.
- Muller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofmann WJ, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR.** Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest.* 1997;99:403-13.
- Muñoz A.** *Cáncer. Genes y nuevas terapias* Madrid: Hélice; 1997.
- Murata M, Nagai M, Fujita M, Ohmori M, Takahara J.** Calphostin C synergistically induces apoptosis with VP-16 in lymphoma cells which express abundant phosphorylated Bcl-2 protein. *Cell Mol Life Sci.* 1997;53:737-43.
- Murray NR, Fields AP.** Atypical protein kinase C iota protects human leukemia cells against drug-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272:27521-4.
- Nesbit CE, Fan S, Zhang H, Prochownik EV.** Distinct apoptotic responses imparted by c-myc and max. *Blood.* 1998;92:1003-10.
- Nielsen LL, Lipari P, Dell J, Gurnani M, Hajian G.** Adenovirus-mediated p53 gene therapy and paclitaxel have synergistic efficacy in models of human head and neck, ovarian, prostate, and breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1998;4:835-46.
- Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N.** Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 1998;17:3237-45.
- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, Huang DC.** Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.* 1998;17:384-95.
- O'Connor L, Huang DC, O'Reilly L, Strasser A.** Apoptosis and cell division. *Curr Opin Cell Biol.* 2000;12:257-63.

O'Hagan RC, Schreiber-Agus N, Chen K, David G, Engelman JA, Schwab R, Alland L, Thomson C, Ronning DR, Sacchettini JC, Meltzer P, DePinho RA. Gene-target recognition among members of the myc superfamily and implications for oncogenesis. *Nature Genetics*. 2000;24:113-9.

O'Rear J, Alberti L, Harshey RM. Mutations that impair swarming motility in *Serratia marcescens* 274 include but are not limited to those affecting chemotaxis or flagellar function. *J Bacteriol*. 1992;174:6125-37.

Ohkuma S, Sato T, Okamoto M, Matsuya H, Arai K, Kataoka T, Nagai K, Wasserman HH. Prodigiosins uncouple lysosomal vacuolar-type ATPase through promotion of H⁺/Cl⁻ symport. *Biochem J*. 1998;334:731-41.

Ohtsubo M, Gamou S, Shimizu N. Antisense oligonucleotide of WAF1 gene prevents EGF-induced cell-cycle arrest in A431 cells. *Oncogene*. 1998;16:797-802.

Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase in the cellular response to DNA damage, apoptosis, and disease. *Am J Hum Genet*. 1999;64:1282-8.

Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E, Radinsky R. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol*. 1995;15:3032-40.

Palomar J, Montilla R, Fusté MC, Viñas M. The role of O antigen in susceptibility of *Serratia marcescens* to non-immune serum. *Microbios*. 1993;76:189-96.

Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*. 1997;276:111-3.

Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem*. 1998;273:5841-5.

Park JH, Levitt L. Overexpression of mitogen-activated protein kinase (ERK1) enhances T-cell cytokine gene expression: role of AP1, NF-AT, and NF-KB. *Blood*. 1993;82:2470-7.

Paruchuri DK, Harshey RM. Flagellar variation in *Serratia marcescens* is associated with color variation. *J Bacteriol*. 1987;169:61-5.

Peeters M, Haller DG. Therapy for early-stage colorectal cancer. *Oncology*. 1999;13:307-15; 320-21.

Pérez JM, Camazón M, Álvarez-Valdés A, Álvarez-Valdés A, Quiroga AG, Kelland LR, Alonso C, Navarro-Ranninger MC. Synthesis, characterization and DNA modification induced by a novel Pt(IV)-bis(monoglutarate) complex which induces apoptosis in glioma cells. *Chem-Biol Interact*. 1999;117:99-115.

Phillips I, King A. *Serratia marcescens* in hospital practice. *Lancet*. 1977;1:538.

Philpott DJ, Yamaoka S, Israel A, Sansonetti PJ. Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol*. 2000; 165:903-14.

- Pindur U, Lemster T.** Antitumour drug design: DNA-binding ligands, which inhibit the topoisomerase I. *Pharmazie*. 1998;53:79-86.
- Piqué M, Barragán M, Dalmau M, Bellosillo B, Pons G, Gil J.** Aspirin induces apoptosis through mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett*. 2000;480:193-196.
- Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J.** Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer*. 1999;83:18-29.
- Raff MC.** Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. 1992;356:397-400.
- Rapoport H, Holden KG.** The synthesis of prodigiosin. *J Am Chem Soc*. 1962;84:635.
- Reed JC.** Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol*. 1994;124:1-6.
- Reed JC.** Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst Mitt*. 1996;97:72-100.
- Reed JC.** Bcl-2 family proteins. *Oncogene*. 1998;17:3225-36.
- Reed JC.** Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr Opin Oncol*. 1999;11:68-75.
- Reyl-Desmars F, Laboisse C, Lewin MJ.** A somatostatin receptor negatively coupled to adenylate cyclase in the human gastric cell line HGT-1. *Regul Peptides*. 1986;16:207-15.
- Righetti SC, Rerego P, Corna E, Pierotti MA, Zunino F.** Emergence of p53 mutant cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells following drug exposure: spontaneously mutant selection. *Cell Growth Differ*. 1999;10:473-8.
- Rincón M, Conze D, Weiss L, Diehl NL, Fortner KA, Yang D, Flavell RA, Enslen H, Whitmarsh A, Davis RJ.** Conference highlight: do T cells care about the mitogen-activated protein kinase signalling pathways? *Immunol Cell Biol*. 2000a;78:166-75.
- Rincón M, Flavell RA, Davis RA.** The JNK and P38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune responses. *Free Radical Bio Med*. 2000b;28:1328-37.
- Rizzo V, Morelli A, Pinciroli V, Sciangula D, D'alessio R.** Equilibrium and kinetics of rotamer interconversion in immunosuppressant prodigiosin derivatives in solution. *J Pharm Sci*. 1999;88:73-8.
- Rjazantseva IN, Andreeva IN, Ogorodnikova TI.** Effect of various growth conditions on pigmentation of *Serratia marcescens*. *Microbios*. 1994;79:155-61.
- Rokem JS, Weitzman P.** Prodigiosin formation by *Serratia marcescens* in a chemostat. *Enzyme Microb Technol*. 1987;9:153-5.
- Rook G.** Tumours and Coley's toxins. *Nature*. 1992;357:545.
- Rosenkranz AA, Jans DA, Sobolev AS.** Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunol Cell Biol*. 2000;78:452-64.
- Ross PJ, Rao S, Cunningham D.** Chemotherapy of oesophago-gastric cancer. *Path Oncol Res*. 1998;4:87-95.

- Roth MM.** The photosensitizing ability of prodigiosin. *Photochem Photobiol.* 1967;6:923-6.
- Rothenberg ML, Blanke CD.** Topoisomerase I inhibitors in the treatment of colorectal cancer. *Semin Oncol.* 1999;26:632-9.
- Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW.** The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nature Struct Biol.* 1996;3:619-25.
- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR.** A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell.* 1994;78:1027-37.
- Rowan S, Fisher DE.** Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia.* 1997;11:457-65.
- Royce ME, Pazdur R.** Novel chemotherapeutic agents for gastrointestinal cancers. *Curr Opin Oncol.* 1999;11:299-304.
- Rozman C, Montserrat E.** Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 1995;333:1052-57.
- Rudel T, Bokoch GM.** Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science.* 1997;276:1571-4.
- Ruoslahti E.** Stretching is good for a cell. *Science.* 1997;276:1345-6.
- Sakazaky R.** Genus IX. *Serratia* Bizio 1823. In: Buchanan R, Gibbons N, eds. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* 8 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1974:326.
- Sánchez V, Lucas M, Sanz A, Goberna R.** Decreased protein kinase C activity is associated with programmed cell death (apoptosis) in freshly isolated rat hepatocytes. *Biosci Report.* 1992;12:199-206.
- Sato T, Konno H, Tanaka Y, Kataoka T, Nagai K, Wasserman HH, Ohkuma S.** Prodigiosins as a new group of H^+/Cl^- symporters that uncouple proton translocators. *J Biol Chem.* 1998;273:21455-62.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME.** Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998;17:1675-87.
- Schievella AR, Chen JH, Graham JR, Lin LL.** MADD, a novel death domain protein that interacts with the type 1 tumor necrosis factor receptor and activates mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1997;272:12069-75.
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME.** Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem.* 1998;254:439-59.
- Scott LJ, Goa KL.** Verteporfin. *Drug Aging.* 2000;16:139-48.
- Seger R, Krebs EG.** The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995;9:726-35.

- Senderowicz AM, Kaur G, Sainz E, Laing C, Inman WD, Rodriguez J, Crews P, Malspeis L, Grever MR, Sausville EA.** Jaspilakinolide's inhibition of the growth of prostate carcinoma cells *in vitro* with disruption of the actin cytoskeleton. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87:46-51.
- Shevchenko VP.** Possibility of using prodigiosin to increase the efficacy of combined treatment of breast cancer. *Klin Khirurgiia.* 1987;5:9-12.
- Silverman MP, Muñoz EF.** Effect of iron and salt on prodigiosin synthesis in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol.* 1973;114:999-1006.
- Singhal PC, Kapasi AA, Reddy K, Franki N, Gibbons N, Ding G.** Morphine promotes apoptosis in Jurkat cells. *J Leukocyte Biol.* 1999;66:650-8.
- Sinicrope FA, Sugarman SM.** Role of adjuvant therapy in surgically resected colorectal carcinoma. *Gastroenterology.* 1995;109:984-93.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ.** Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 1999;144:281-92.
- Sluss HK, Barrett T, Derijard B, Davis RJ.** Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol Cell Biol.* 1994;14:8376-84.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76-85.
- Smoot DT.** How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? Direct mechanisms. *Gastroenterology.* 1997;113:S31-4, S50.
- Sohur US, Chen CL, Hicks DJ, Yull FE, Kerr LD.** Nuclear factor-kappaB/Rel is apoptogenic in cytokine withdrawal-induced programmed cell death. *Cancer Res.* 2000; 60:1202-5.
- Solé M, Rius N, Francia A, Lorén JG.** The effect of pH on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Lett Appl Microbiol.* 1994;19:341-4.
- Songia S, Mortellaro A, Taverna S, Fornasiero C, Scheiber EA, Erba E, Colotta F, Mantovani A, Isetta AM, Golay J.** Characterization of the new immunosuppressive drug undecylprodigiosin in human lymphocytes. *J Immunol.* 1997;158:3987-95.
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES.** Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell.* 1998;1:949-57.
- Srivastava RK, Sasaki CY, Hardwick JM, Longo DL.** Bcl-2-mediated drug resistance: inhibition of apoptosis by blocking nuclear factor of activated T lymphocytes (NFAT)-induced Fas ligand transcription. *J Exp Med.* 1999;190:253-65.
- Stadheim TA, Kucera GL.** Extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity is required for TPA-mediated inhibition of drug-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Com.* 1998;245:266-71.
- Stanger BZ, Leder P, Lee TH, Kim E, Seed B.** RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell.* 1995;81:513-23.

Starnes CO. Coley's toxins in perspective. *Nature*. 1992;357:11-2.

Stournaras C, Stiakaki E, Koukouritaki SB, Theodoropoulos PA, Kalmanti M, Fostinis Y, Gravanis A. Altered actin polymerization dynamics in various malignant cell types: evidence for differential sensitivity to cytochalasin B. *Biochem Pharmacol*. 1996;52:1339-46.

Szewczyk B, Summers DF. Preparative elution of proteins blotted to Immobilon membranes. *Anal Biochem*. 1988;168:48-53.

Takahashi A, Musy PY, Martins LM, Poirier GG, Moyer RW, Earnshaw WC. CrmA/SPI-2 inhibition of an endogenous ICE-related protease responsible for lamin A cleavage and apoptotic nuclear fragmentation. *J Biol Chem*. 1996;271:32487-90.

Tapon N, Hall A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9:86-92.

Taylor PW. Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gramnegative bacteria. *Microbiol Rev*. 1983;47:46-83.

Theriot JA. Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J Cell Biol*. 1997;136:1165-8.

Thiede C, Kim TD, Neubauer A. Use of p53 as cancer cell target for gene therapy. In: Cameron R, Feuer G, eds. *Apoptosis and its modulation by drugs*. Vol. 142. Berlin: Springer-Verlag; 2000.

Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281:1312-6.

Ting AT, Pimentel-Muinos FX, Seed B. RIP mediates tumor necrosis factor receptor 1 activation of NF-kappaB but not Fas/APO-1-initiated apoptosis. *EMBO J*. 1996;15:6189-96.

Tishchenko LM, Guseva SA. Prodigiosan treatment of patients with acute myeloblastic leukemia. *Vrachebnoe Delo*. 1987;1:69-72.

Toge T. Effectiveness of immunochemotherapy for gastric cancer: a review of the current status. *Semin Surg Oncol*. 1999;17:139-43.

Tomei LD, Kanter P, Wenner CE. Inhibition of radiation-induced apoptosis in vitro by tumor promoters. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;155:324-31.

Torigoe T, Millan JA, Takayama S, Taichman R, Miyashita T, Reed JC. Bcl2 inhibits T-cell-mediated cytolysis of a leukemia cell line. *Cancer Res*. 1994;54:4851-54.

Tsang JC, Feng JS. Effect of polymyxin B on the synthesis of prodigiosin and its precursors in *Serratia marcescens*. *J Antibiot*. 1983;36:1564-66.

Tsuji RF, Yamamoto M, Nakamura A, Kataoka T, Magae J, Nagai K, Yamasaki M. Selective immunosuppression of prodigiosin 25-C and FK506 in the murine immune system. *J Antibiot*. 1990;43:1293-301.

Tsuji RF, Magae J, Jamashita M, Nagai K, Yamasaki M. Immunomodulating properties of prodigiosin 25-C, an antibiotic which preferentially suppresses of cytotoxic T cells. *J Antibiot*. 1992;45:1295-302.

Tsujimoto Y, Finger L, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. 1984;226:1097-9.

Tsujimoto Y, Jaffe EA, Cossman J, Gorham J, Nowell PC, Croce CM. Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature*. 1985;315:340-3.

Tsunoda T, Tanimura H, Hotta T, Tani M, Iwahashi M, Tanaka H, Matsuda K, Yamaue H. In vitro antitumor effect of topoisomerase-I inhibitor, CPT-11, on freshly isolated human gastric and colorectal cancer. *Anticancer Res*. 1999;19:5451-5.

Uruburu F. *Colección española de cultivos tipo. Catálogo de cepas.* Catálogo de cepas, 3ª ed Valencia: Department of Microbiology, UV, Spain; 1990. (C Dawson CB, MD G^a-López, F Uruburu, ed.).

Valledor AF, Xaus J, Comalada M, Soler C, Celada A. Protein kinase C epsilon is required for the induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Immunol*. 2000;164:29-37.

van Cutsem E, Peeters M, Verslype C, Filez L, Haustermans K, Janssens J. The medical treatment of colorectal cancer: actual status and new developments. *Hepato-Gastroenterol*. 1999;46:709-16.

Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell Biol*. 1999;1:E209-216.

Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*. 1994;76:777-79.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999;96:245-54.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184:39-51.

Vigorito E, Plaza S, Mir L, Mongay L, Viñas O, Serra-Pages C, Vives J. Contributions of p53 and PMA to gamma-irradiation induced apoptosis in Jurkat. *Hematol Cell Ther*. 1999;41:153-61.

Viñas M, Lorén JG, Guinea J. Particulate-bound pigment of *Serratia marcescens* and its association with the cellular envelopes. *Microbios Lett*. 1983;24:19-26.

Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, GhayurT, Hackett MC, Hammill LD, et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*. 1994;78:343-52.

Wang CY, Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nature Med*. 1999;5:412-7.

Wasserman HH, Petersen AK, Xia M, Wang J. Pyrrole-singlet oxygen reactions leading to α,α' -bipyrroles. Synthesis of prodigiosin and analogs. *Tetrahedron Lett*. 1999;40:7587-89.

Watson A, Merritt AJ, Jones LS, Askew JN, Anderson E, Becciolini A, Balzi M, Potten CS, Hickman JA. Evidence of reciprocity of bcl-2 and p53 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Br J Cancer*. 1996;73:889-95.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995;81:323-30.

Wen LP, Fahrni JA, Troie S, Guan JL, Orth K, Rosen GD. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem*. 1997;272:26056-61.

Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood*. 1999;93:3587-600.

Williams RP, Gott CL, Qadri MH, Scott RH. Influence of temperature of incubation and type of growth medium on pigmentation in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol*. 1971;106:438-43.

Williams RP, Qadri SMH. The pigment of *Serratia*. In: von Graevenitz A, Rubin A, eds. *The genus Serratia*. Florida: CRC Press, Inc.; 1980.

Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, et al. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*. 1994;370:270-5.

Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, Nechushtan A, Xi XG, Youle RJ. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*. 1997;139:1281-92.

Woo KR, Shu WP, Kong L, Liu BC. Tumor necrosis factor mediates apoptosis via Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ dependent endonuclease with protein kinase C as a possible mechanism for cytokine resistance in human renal carcinoma cells. *J Urol*. 1996;155:1779-83.

Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, López-Soriano F, Argilés JM, Bogdan C, Celada A. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood*. 2000;95:3823-31.

Yamamoto C, Takemoto H, Kuno K, Yamamoto D, Tsubura A, Kamata K, Hirata H, Yamamoto A, Kano H, Seki T, Inoue K. Cycloprodigosin hydrochloride, a new H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines *in vitro* and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Hepatology*. 1999;30:894-902.

Yamamoto D, Uemura Y, Tanaka K, Nakai K, Yamamoto C, Takemoto H, Kamata K, Hirata H, Hioki K. Cycloprodigosin hydrochloride, H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis and differentiation in HL-60 cells. *Int J Cancer*. 2000a;88:121-28.

Yamamoto D, Kiyozuka Y, Uemura Y, Yamamoto C, Takemoto H, Hirata H, Tanaka K, Hioki K, Tsubura A. Cycloprodigosin hydrochloride, a H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human breast cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000b;126:191-97.

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 1997;275:1129-32.

- Yoshida J, Takamura S, Nishio M.** Characterization of a streptococcal antitumor glycoprotein (SAGP). *Life Sci.* 1998;62:1043-53.
- Yu VL.** *Serratia marcescens*: historical perspective and clinical review. *N Engl J Med.* 1979;300:887-93.
- Yu Y, Little JB.** p53 is involved in but not required for ionizing radiation-induced Caspase-3 activation and apoptosis in human lymphoblast cell lines. *Cancer Res.* 1998;58:4277-81.
- Zamble DB, Jacks T, Lippard SJ.** p53-Dependent and -independent responses to cisplatin in mouse testicular teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:6163-8.
- Zeng ZS, Sarkis AS, Zhang ZF, Klimstra DS, Charytonowicz E, Guillem JG, Cordon-Cardo C, Cohen AM.** p53 nuclear overexpression: an independent predictor of survival in lymph node-positive colorectal cancer patients. *J Clin Oncol.* 1994;12:2043-50.
- Zhang D, Berry MD, Paterson IA, Boulton AA.** Loss of mitochondrial membrane potential is dependent on the apoptotic program activated: prevention by R-2HMP. *J Neuosci Res.* 1999;58:284-92.
- Zhang Y, Griffith EC, Sage J, Jacks T, Liu JO.** Cell cycle inhibition by the anti-angiogenic agent TNP-470 is mediated by p53 and p21WAF1/CIP1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:6427-32.
- Zhuang S, Lynch MC, Kochevar IE.** Activation of protein kinase C is required for protection of cells against apoptosis induced by singlet oxygen. *FEBS Lett.* 1998;437:158-162.
- Zigmond SH.** Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:66-73.
- Zychlinsky A, Santonetti P.** Apoptosis in bacterial pathogenesis. *J Clin Invest.* 1997;100:63-65.

APÉNDICE



Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines

¹Beatriz Montaner, ¹Sira Navarro, ²Maria Piqué, ³Marta Vilaseca, ⁴Marc Martinell, ⁴Ernest Giralt, ²Joan Gil & *¹Ricardo Pérez-Tomás

¹Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Unitat de Proliferació i Diferenciació Cel·lular, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Departament de Ciències Fisiològiques II, Unitat de Bioquímica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ³Laboratori d'Espectrometria de Masses, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain and ⁴Departament de Química Orgànica, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

1 The effects of supernatant from the bacterial strain *Serratia marcescens* 2170 (CS-2170) on the viability of different haematopoietic cancer cell lines (Jurkat, NSO, HL-60 and Ramos) and nonmalignant cells (NIH-3T3 and MDCK) was studied. We examined whether this cytotoxic effect was due to apoptosis, and we purified the molecule responsible for this effect and determined its chemical structure.

2 Using an MTT assay we showed a rapid (4 h) decrease in the number of viable cells. This cytotoxic effect was due to apoptosis, according to the fragmentation pattern of DNA, Hoechst 33342 staining and FACS analysis of the phosphatidylserine externalization. This apoptosis was blocked by using the caspase inhibitor Z-VAD.fmk, indicating the involvement of caspases.

3 Prodigiosin is a red pigment produced by various bacteria including *S. marcescens*. Using mutants of *S. marcescens* (OF, WF and 933) that do not synthesize prodigiosin, we further showed that prodigiosin is involved in this apoptosis. This evidence was corroborated by spectroscopic analysis of prodigiosin isolated from *S. marcescens*.

4 These results indicate that prodigiosin, an immunosuppressor, induces apoptosis in haematopoietic cancer cells with no marked toxicity in nonmalignant cells, raising the possibility of its therapeutic use as an antineoplastic drug.

British Journal of Pharmacology (2000) **131**, 585–593

Keywords: Apoptosis; cancer cell lines; chemotherapy; immunosuppressor; prodigiosin

Abbreviations: cPrGHCl, cycloprodigiosin hydrochloride; ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry; HBC, 4-hydroxy-2,2'-bipyrrole-5-carboxaldehyde; LPS, lipopolysaccharide; MAP, 2-methyl-3-n-amylopyrrole; MBC, 4-methoxy-2,2'-bipyrrole-5-carboxaldehyde; MTT, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PG, peptone glycerol; PI, propidium iodide; UP, uncedylprodigiosin; Z-VAD.fmk, N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketone

Introduction

Apoptosis is a form of cell death in which cells actively participate in their own destructive processes. This process is characterized by morphological (Kerr *et al.*, 1994) and biochemical/molecular (Rowan & Fisher, 1997; Reed, 1999; Wickremasinghe & Hoffbrand, 1999) criteria. Cells undergoing apoptosis shrink and lose their normal intercellular contacts and subsequently exhibit cytoplasmic and chromatin condensation and internucleosomal cleavage of DNA. In the final stages, cells become fragmented into small apoptotic bodies, which are then eliminated by phagocytosis.

Several bacterial pathogens have been identified as mediators of apoptosis *in vitro* and during pathogenesis (Zychlinsky & Santonetti, 1997). These pathogens have developed different strategies to survive inside the host, overcome natural defences and thus cause disease. Induction of host immunosuppression by triggering apoptosis in phagocytes, like polymorphonuclear neutrophils (PMN) and macrophages, might represent an advantage in bacterial invasion, since these are the most dangerous cells for bacteria. Several pathogens like *Shigella* spp (Chen & Zychlinsky, 1994) and *Salmonella* spp (Chen *et al.*, 1996; Lindgren *et al.*, 1996;

Monack *et al.*, 1996) induce apoptosis in macrophages. Furthermore, the induction of PMN apoptosis by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* has been suggested (Kato *et al.*, 1995).

Bacterial toxins like leukotoxin, α -toxin and hemolysin form pores in the eukaryotic cell membrane and disrupt the cell *via* osmotic swelling (Mangan *et al.*, 1991; Hildebrand *et al.*, 1991; Jonas *et al.*, 1993). Other toxins like diphtheria toxin and exotoxin A inhibit protein synthesis, causing apoptosis in eukaryotic cells (Morimoto & Bonavida, 1992; Kochi & Collier, 1993). Yoshida *et al.* (1998) identified an acidic glycoprotein purified from the crude extract of *Streptococcus pyogenes* Su, which showed cell growth inhibition *in vitro* and antitumour activity *in vivo*. Verotoxin 1, the active component of the bacteriocin preparation from *Escherichia coli*, induces apoptosis in human cancer cell lines (Arab *et al.*, 1998) and eliminates human astrocytoma xenografts (Arab *et al.*, 1999). The prevention of neoplasia by agents from bacteria that inhibit cancer cell proliferation but are not toxic to healthy cells is an exciting prospect. In our laboratory, during screening of potential anticancer drugs, we observed that the supernatant from cultures in stationary phase (growth) of the bacterial strain *S. marcescens* 2170 induced death in several cancer cell lines. On the basis of this reproducible observation we pursued three objectives. First, we examined the effects of

*Author for correspondence at: Dept. Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Pavelló Central, 5a planta. LR 5.1, C/Feixa Llargà s/n, E 08907 L'Hospitalet (Barcelona), Spain. E-mail: rperez@bell.uib.es

supernatant on the viability of several haematopoietic cancer cell lines and nonmalignant cells and assessed whether this cytotoxic effect was due to apoptosis. Second, we identified the molecule contained in the supernatant of *S. marcescens* that was responsible for the induction of apoptosis. Third, we purified this molecule and determined its chemical structure. Our results confirm the molecule as an apoptotic factor with interesting anti-cancer properties.

Methods

Chemical and reagents

Meat peptone was purchased from Difco (Detroit, MI, U.S.A.). Glycerol was bought from Merck (Darmstadt, Germany). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and propidium iodide (PI) were purchased from Sigma Chemicals Co (St Louis, MO, U.S.A.). N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl ketone (Z-VAD.fmk) was obtained from Enzyme Systems Products (Dublin, CA, U.S.A.). Deionized water further purified with a Millipore Milli-Q system (Bedford, MA, U.S.A.) was used.

Bacterial strains

Serratia marcescens 2170 environmental isolated is a wild type strain that produces prodigiosin. Mutants strains of *S. marcescens*-OF, -WF and -933 were deficient in prodigiosin biosynthesis (Mody *et al.*, 1990). NR1 is a lipopolysaccharide (LPS)-deficient mutant strain of *S. marcescens* which does not have the O-antigen (Palomar *et al.*, 1993).

Bacterial cell cultures

Each bacterial strain (*S. marcescens*-2170, -OF, -WF, -933 and -NR1) was inoculated into 25 ml of peptone glycerol (PG) medium, containing 1% meat peptone and 10% glycerol in distilled water, and cultivated for 8 h at 30°C with vigorous shaking, and then transferred to 250 ml of PG medium and cultivated for 48 h at 30°C with vigorous shaking. Bacteria were then harvested by centrifugation at 6800 × *g* for 15 min at 4°C.

Supernatants from the bacterial strains were passed through a 0.22 µm filter (Nalge Nunc Int. Rochester, NY, U.S.A.) and concentrated by a centricon® Plus-20 (Millipore Iberica, Barcelona, Spain). The resulting concentrated samples (named CS-2170, CS-OF, CS-WF, CS-933 and CS-NR1) were divided into aliquots and stored at -20°C. Protein concentration of the CS were estimated by the Bradford method (Bradford, 1976), and used as a measure of the CS quantity added to the growth medium of the cell lines.

Cell lines and culture conditions

Acute human T cell leukaemia cells (Jurkat clone E6-1), myeloma cells (NSO), human promyelocytic leukaemia cells (HL-60), human Burkitt lymphoma cells (Ramos), Swiss mouse embryo cells (NIH-3T3) and MDCK (NBL-2) nonmalignant canine epithelial cells were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, U.S.A.). Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) except NIH-3T3, which was cultured in DMEM medium (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) and MDCK, which was cultured in MEM (Sigma). The three media were supplemented with 10% heat-

inactivated FBS, 100 u ml⁻¹ penicillin, 100 µg ml⁻¹ streptomycin (all from GIBCO-BRL, Paisley, U.K.), and 2 mM L-glutamine (Sigma).

Cell viability assay

Cell viability was determined by the MTT assay (Mosmann, 1983). Briefly, 20 × 10³ cells were incubated in 96-well microtiter cell culture plates, in the absence (control cells) or in the presence of increasing amounts of CS-2170, CS-OF, CS-WF, CS-933 and CS-NR1, in a final volume of 100 µl. After 4 h incubation, 10 µM of MTT (diluted in PBS) was added to each well for an additional 4 h. The blue MTT formazan precipitate was dissolved in 100 µl of isopropanol:1N HCl (24:1) and the absorbance at 550 nm was measured on a multiwell plate reader. Cell viability was expressed as a percentage of control. Data are shown as the mean ± standard deviation of triplicate cultures.

Analysis of DNA fragmentation

Analysis of DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis was performed as described previously (Bellosillo *et al.*, 1997). Briefly, 1 × 10⁶ cells per ml were exposed to 10 µg ml⁻¹ of CS-2170, CS-OF, CS-WF, CS-933 and CS-NR1 and incubated overnight (16 h). Cells were washed in PBS and resuspended in ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100). After incubating for 15 min at 4°C, cell lysates were centrifuged at 14,000 × *g* for 15 min to separate low molecular weight DNA from intact chromatin. The supernatant was treated with 0.2 mg ml⁻¹ of proteinase K in a buffer containing (mM) NaCl 150, Tris-HCl 10 pH 8.0, EDTA 40 and 1% SDS for 4 h at 37°C. The DNA preparations were phenol/chloroform extracted twice to remove proteins. DNA was precipitated with 140 mM NaCl and two volumes of ethanol at -20°C overnight. DNA precipitates were recovered by centrifugation at 14,000 × *g* for 15 min at 4°C, washed twice in cool 70% ethanol and air dried. DNA pellets were resuspended in 15 µl of TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) and treated with RNase-DNase free (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) for 1 h at 37°C. 3.2 µl of loading buffer was added to each tube and the DNA preparations were electrophoresed in 1% agarose gels which contained ethidium bromide. Gels were placed on a UV light box to visualize the DNA ladder pattern.

Hoechst staining

Cell morphology was evaluated by fluorescence microscopy following Hoechst 33342 DNA staining (Sigma Chemicals Co.). Cells (4 × 10⁵ per ml) from each cell line were incubated in the absence (control cells) or in the presence of CS-2170 (5 µg ml⁻¹) and 300 nM of prodigiosin for 6 h. Cells were then washed in PBS and resuspended in PBS plus Hoechst 33342 to a final concentration of 2 µg ml⁻¹ and incubated for 30 min at 37°C in the dark. After incubation, cells were washed in PBS and the sections were examined with a Leitz Diaplan microscope and photographed with a Wild MPS 45 Photo-automat system. Apoptotic cells were identified by features characteristic of apoptosis (e.g. nuclear condensation, formation of membrane blebs and apoptotic bodies).

Analysis of apoptosis by annexin V binding

Exposure of phosphatidylserine was quantified by surface annexin V-FITC (Bender MedSystems, Boehringer Man-

nheim) staining as described previously (Koopman *et al.*, 1994; Bellosillo *et al.*, 1998). 4×10^5 cells per ml were incubated for 4 h with 5 and $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of CS-2170. After this, cells were washed in PBS and resuspended in $200 \mu\text{l}$ binding buffer (mM: HEPES/NaOH 10 pH 7.4, NaCl 140, CaCl_2 2.5) plus $0.6 \mu\text{l}$ of annexin V-FITC Kit and incubated for 30 min at room temperature in the dark. After incubation, we added $200 \mu\text{l}$ of binding buffer and propidium iodide to a final concentration of $5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Cells were analysed using a Becton Dickinson FACS Calibur flow cytometer (Mountain View, CA, U.S.A.). Samples were acquired and analysed using Cell Quest software and data were analysed with the Paint-a-gate Pro software (Becton Dickinson).

Annexin V binds to those cells that express phosphatidylserine on the outer layer of the membrane, and propidium iodide stains the cellular DNA of those cells with a compromised cell membrane. This allows the discrimination of live cells (unstained with either fluorochrome) from early apoptotic cells (stained only with annexin V) and advanced apoptotic and necrotic cells (stained with both annexin V and propidium iodide).

Purification of prodigiosin

Prodigiosin was extracted by shaking the *S. marcescens* 2170 cells with a mixture of methanol/1N HCl (24:1). After centrifugation ($6800 \times g$ for 15 min), the solvent of the supernatant was evaporated under vacuum. Atmospheric pressure liquid chromatography of the extract was performed on silica gel with chloroform and methanol as solvents. The eluted pigmented fractions were pooled and the chloroform/methanol extract was vacuum evaporated, redissolved in H_2O and lyophilized. The isolated pigment was redissolved in methanol and analysed by electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS) using a VG-Quattro triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, VG-Biotech, U.K.). The isolated pigment was repurified by subsequent semipreparative HPLC carried out on a Shimadzu instrument (Kyoto, Japan). A Nucleosil C_{18} reversed-phase column ($250 \times 4 \text{ mm}$, $10 \mu\text{m}$) was used with a 0–100% linear gradient in 30 min (A: 0.01 M ammonium acetate, pH 7, B: 100% acetonitrile). The elution was monitored both using diode-array UV detector (SPD-M10AVP Shimadzu) and by ESI-MS. After repeated injections the pooled fractions containing the major peak were vacuum evaporated, redissolved in H_2O , lyophilized and characterized by ESI-MS and $^1\text{H-NMR}$. ESI, m/z 324.4 ($\text{M} + \text{H}^+$), ($\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}$ requires 323.4381 (MW average)). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz, p.p.m.): 10.71 (m, NH), 8.54 (m, NH), 7.08 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.83 (m, 1H), 6.30 (m, 1H), 6.25 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.43 (t, 2H), 1.58 (s, 3H), 1.2–1.4 (m, 6H), 0.91 (t, 3H). The concentration of prodigiosin was determined as described (Goldschmidt & Williams, 1968).

Results

CS-2170 decreased the viability of haematopoietic cancer cells

The effect of the concentrated supernatant from *S. marcescens* 2170 (CS-2170) on the viability of different haematopoietic cancer cell lines (Jurkat, NSO, HL-60 and Ramos) and nonmalignant cell lines (NIH-3T3 and MDCK) was studied. Cell lines were incubated for 4 h with several doses of CS-2170, ranging from 1 to $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, and then cell viability was

determined by the MTT assay. A dose-dependent decrease in the number of viable cells was observed in all the cell lines studied except NIH-3T3 and MDCK (Figure 1A). The IC_{50} was $1.45 \mu\text{g ml}^{-1}$ for Jurkat, $3.03 \mu\text{g ml}^{-1}$ for Ramos, $3.14 \mu\text{g ml}^{-1}$ for HL-60 and between 5 and $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ for NSO. We did not observe a significant decrease in the viability of the NIH-3T3 and MDCK at the doses used in the experiment or in other nonmalignant cell lines like Swiss-3T3. The viability study of these cell lines treated with prodigiosin at different times (4–24 h) did not show differences (data not shown).

CS-2170 induced apoptosis in haematopoietic cancer cells

In order to determine whether this cytotoxic effect was due to apoptosis, we analysed whether CS-2170 induces DNA fragmentation. Agarose gel electrophoresis of DNA showed the characteristic ladder pattern of apoptosis in all haematopoietic cancer cell lines incubated overnight in the presence of $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of CS-2170. However, DNA laddering was not observed in the NIH-3T3 and MDCK at this dose of CS-2170 (Figure 1B).

We corroborated these results at microscopic level using the Hoechst 33342 staining. Fluorescence microscope allowed the visualization of apoptotic cells with condensed or fragmented nuclei in Jurkat and HL-60 cells but not in NIH-3T3 cells (Figure 1C).

Furthermore, we confirmed these results by measuring apoptosis in the Jurkat cell line by FACS analysis with annexin V-FITC and propidium iodide staining (Figure 2). We incubated Jurkat cells with 0, 5 and $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of CS-2170. The mean values of the early apoptotic populations ($\text{IP}^-/\text{Annexin V}^+$ cells) were 4 ± 2 , 34 ± 8 and $45 \pm 3\%$, respectively.

To demonstrate the involvement of caspase activation in the apoptotic effect, we analysed whether the caspase inhibitor Z-VAD.fmk prevented apoptosis (García-Calvo *et al.*, 1998). When cells were incubated with 0, 5 and $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of CS-2170 in the presence of $50 \mu\text{M}$ Z-VAD.fmk, the mean values of the early apoptotic population were 2 ± 0.2 , 3 ± 0.4 and $5 \pm 2\%$ respectively. These results show that Z-VAD.fmk inhibits the apoptotic action of CS-2170. Furthermore, Z-VAD.fmk blocked DNA fragmentation (data not shown).

Identification from CS-2170 of the molecule responsible of apoptosis in haematopoietic cancer cells

Samples of CS-2170 were heated to 100°C for 15 min or subjected to different protease treatments with trypsin, proteinase K, and protease V8 in order to eliminate active proteins from the sample. In all cases, the samples continued inducing apoptosis (data not shown).

S. marcescens is a Gram-negative bacillus containing LPS, which is responsible for the biological activity of endotoxin and is located in the outer membrane of the bacteria. LPS can be discharged from the outer membrane to the culture medium. In order to rule out LPS as the molecule involved in the apoptosis induced by CS-2170, we used the *S. marcescens* NR1 mutant which is LPS deficient. Both CS-2170 and CS-NR1 induced similar DNA laddering pattern (Figure 3), indicating that LPS is not responsible for the apoptotic action.

Samples from mutants defective in prodigiosin biosynthesis (Figure 4) were examined to clarify the involvement of this pigment in the apoptosis activity observed. Prodigiosin (2-methyl-3-pentyl-6-methoxyprodigiosene) is synthesized in

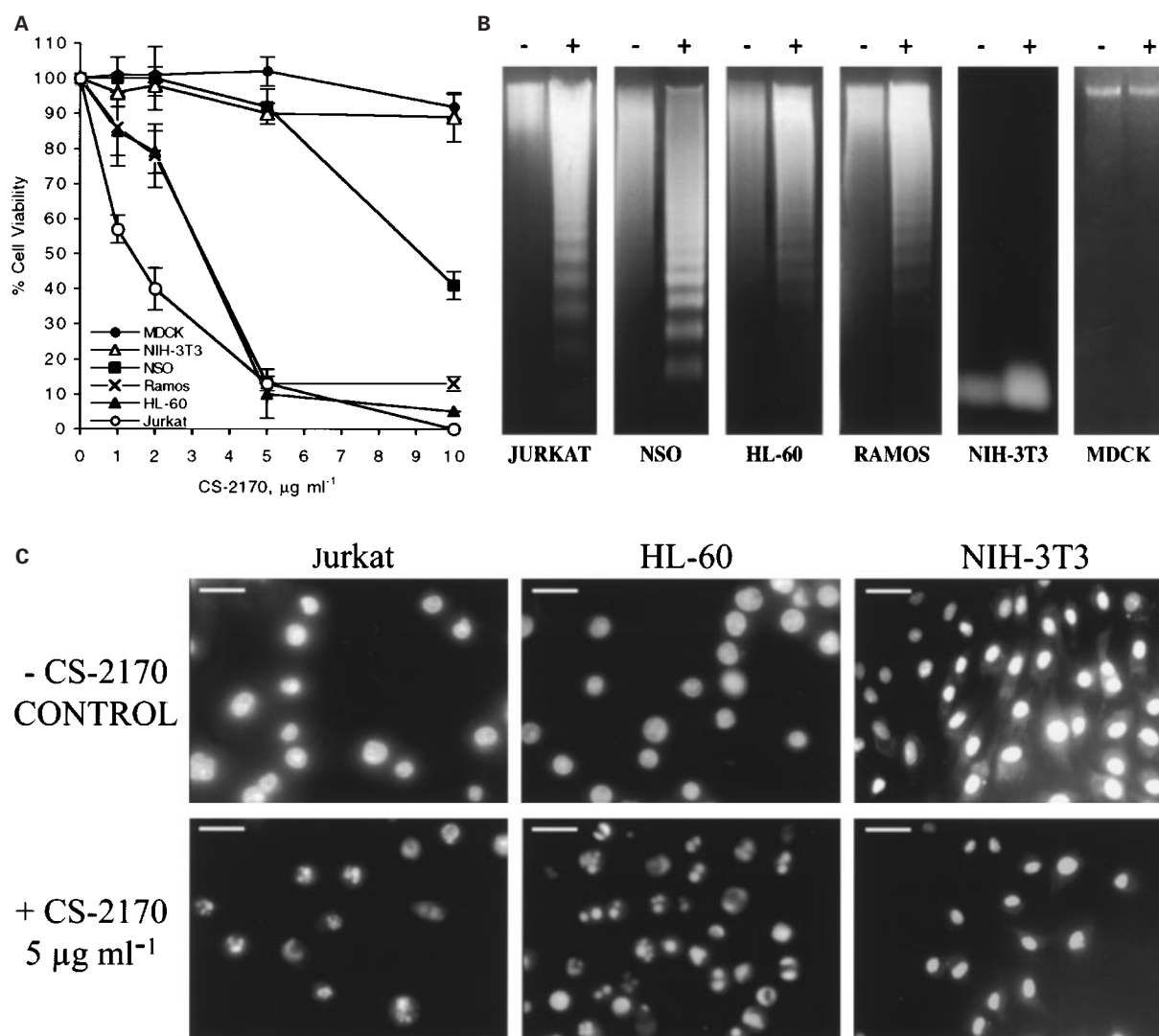


Figure 1 CS-2170 induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. (A) Dose-response of the effect of CS-2170 on cell viability. Haematopoietic cancer cells (Jurkat, NSO, HL-60 and Ramos) and nonmalignant cell lines (MDCK and NIH-3T3) were incubated for 4 h with 1–10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of CS-2170. Cell viability was determined by the MTT assay as described in Methods and it is expressed as a percentage with respect to control cells. (B) DNA fragmentation induced by CS-2170 was observed in the agarose gel electrophoresis as described in Methods. Jurkat, NSO, HL-60, Ramos, MDCK and NIH-3T3 cells were untreated (–) or incubated for 16 h with 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of CS-2170 (+). (C) Fluorescence microscopic analysis of Jurkat, HL-60 and NIH-3T3 nuclei with Hoechst 33342 staining. Cells were untreated (–CS-2170) or treated with 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of CS-2170 for 6 h (bar = 10 μm).

S. marcescens by the coupling of 2-methyl-3-n-amylypyrrole (MAP) with 4-methoxy-2,2'-bipyrrrole-5-carboxaldehyde (MBC). Mutant OF does not form MBC, but forms 4-hydroxy-2,2'-bipyrrrole-5-carboxaldehyde (HBC) instead, which couples with MAP to form norprodigiosin (2-methyl-3-pentyl-6-hydroxyprodigiosene). Mutant WF does not form HBC or MBC but forms the volatile pyrrole MAP. Mutant 933 does not form MAP but forms MBC (Mody *et al.*, 1990) Figure 4. Only CS-2170 and CS-OF induced a significant decrease in the viability of Jurkat cells (Figure 5A), and the characteristic DNA ladder pattern of apoptosis (Figure 5B). CS-WF and CS-933 decreased cell viability but with less efficiency than CS-2170 and CS-OF and with no evidence of DNA laddering (Figure 5B). Furthermore, the addition of purified prodigiosin to CS-WF and CS-933 allowed the induction of apoptosis in Jurkat cells (data not shown). These evidences indicate that prodigiosin and norprodigiosin (produced by OF mutant) are involved in this apoptosis.

Purification and characterization of prodigiosin from CS-2170 as the apoptotic factor synthesized from S. marcescens 2170

Furthermore, the apoptotic factor was purified by methanol/HCl extraction followed by silica gel chromatography and semipreparative reverse-phase HPLC. Electrospray ionization mass spectrometry gave a molecular weight of 323.4, consistent with the expected value for prodigiosin ($\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}$). The structure of prodigiosin was further confirmed by high-field $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. Jurkat and NIH-3T3 cell lines were incubated with 60 to 1200 nM of prodigiosin for 4 h, and cell viability was determined by MTT assay. Prodigiosin decreased viability of Jurkat cells. The IC_{50} was higher for the NIH-3T3 cells (Figure 6A). The DNA fragmentation pattern and was observed in Jurkat cells but not in NIH-3T3 cells (Figure 6B). The nuclei shown a strong blue fluorescence and were condensed and fragmented in Jurkat cells (Figure 6C). Furthermore, we confirmed these results by measuring

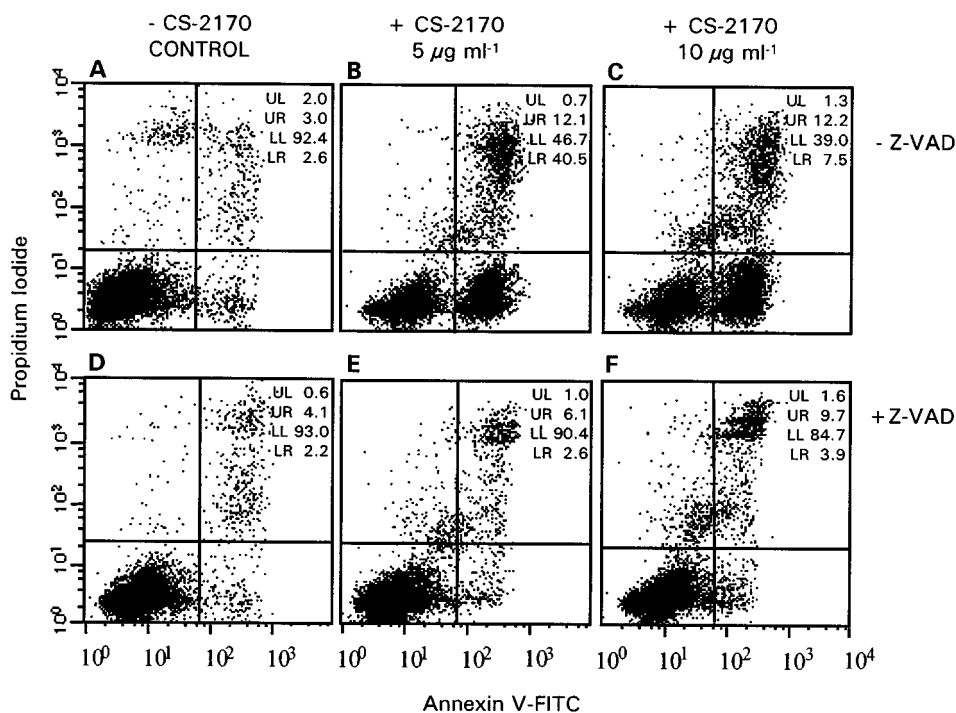


Figure 2 Involvement of caspases in induction of phosphatidylserine externalization by CS-2170. A representative annexin-V/IP assay with Jurkat is shown. This assay reveals the early phosphatidylserine translocation to the surface of apoptotic cells by incubating the cells with FITC-labelled annexin V and the latest stages of apoptotic or necrotic processes were detected with the vital dye propidium iodide (PI). Cells staining were analysed using the Becton Dickinson FACS Calibur flow cytometer as described in Methods. (A) Control cells. (B, C) Cells were incubated for 4 h with 5 and 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of CS-2170 respectively. (D) Cells were incubated with 50 μM Z-VAD.fmk. (E, F). Cells were incubated with 5 and 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of CS-2170 respectively in the presence of 50 μM Z-VAD.fmk.

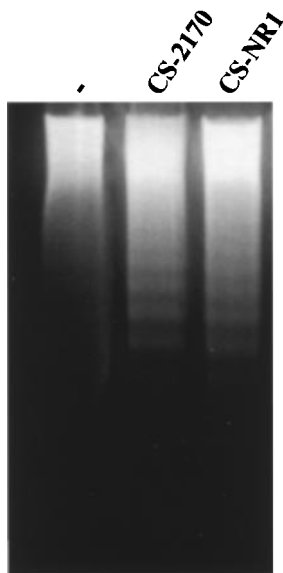


Figure 3 DNA fragmentation induced by CS-2170 and CS-NR1. Jurkat cells were untreated (-) or incubated overnight (16 h) with 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of CS-2170 and CS-NR1. DNA was extracted and subjected to agarose gel electrophoresis as described in Methods.

apoptosis in Jurkat cells by FACS analysis with annexin V-FITC and propidium iodide staining (Figure 6D). We incubated the cells with 0, and 300 nM of prodigiosin. The mean values of the early apoptotic populations ($\text{IP}^-/\text{Annexin V}^+$ cells) were 3 ± 0.7 and $38 \pm 2\%$, respectively.

Discussion

Apoptosis is involved in the action of several cancer-chemotherapeutic agents. In the last few years, the selection of new drugs associated with apoptosis that would be expected to be effective against tumours with high proliferation like leukemias and lymphomas has been introduced into screening for new anticancer drugs (Cameron & Feuer, 2000). Our findings demonstrate that prodigiosin released from *S. marcescens* 2170 to the culture medium induced apoptosis in four haematopoietic cancer cell lines (Jurkat, NSO, HL-60 and Ramos) but not in nonmalignant cells (NIH-3T3 and MDCK). Furthermore, prodigiosin is equally active in other cancer cell lines like SW-620, DLD-1 and HGT-1 (all of gastrointestinal origin) (Montaner *et al.*, manuscript in preparation), and indicates that prodigiosin may have potential as new antineoplastic candidate.

S. marcescens is a ubiquitous bacterium inhabiting water, soil, plants, insects and vertebrates, and it has various characteristics including the pigment prodigiosin (Hejazi & Falkner, 1997). We decided to study the possible involvement of prodigiosin in this apoptosis for different reasons: (a) in our culture conditions the supernatant from *S. marcescens* 2170 was always red, the characteristic colour of prodigiosin; (b) prodigiosin should be stable at 100°C and protease-resistant (both properties are in accordance with our previous experiments); (c) immunosuppressive activity has been described for prodigiosin family members (Tsuji *et al.*, 1992; Kawauchi *et al.*, 1997; Songia *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1998); and (d) the immunosuppressive effects of prodigiosin family members may be due to their apoptotic effects as Kawauchi *et al.*, (1997) and, recently, Azuma *et al.* (2000) suggested.

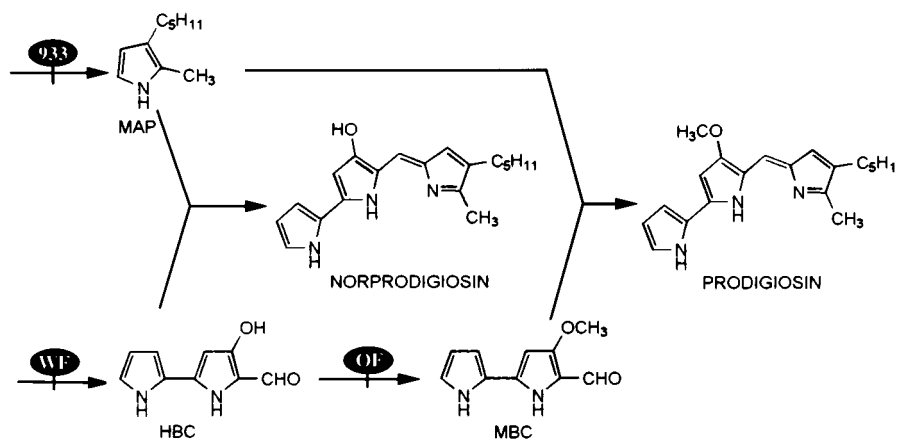


Figure 4 Scheme of prodigiosin biosynthesis by *S. marcescens*. OF, WF and 933 mutants of the prodigiosin biosynthesis are indicated.

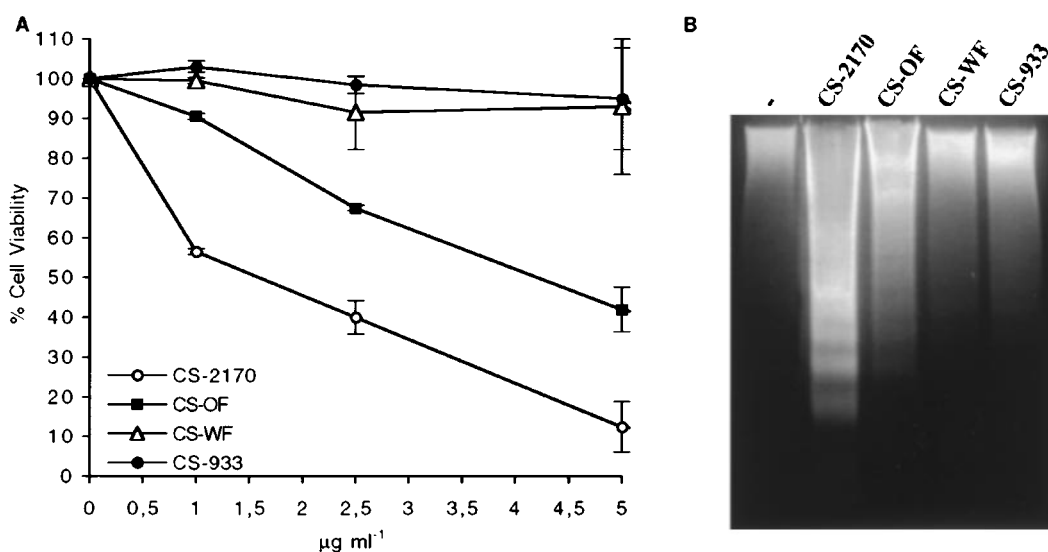


Figure 5 Effect of CS from different mutants in prodigiosin biosynthesis. (A) Dose-response of the effect of CS-2170, CS-OF, CS-WF and CS-933 on cell viability. Jurkat cells were incubated for 4 h with 1–5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of CS-2170, CS-OF, CS-WF and CS-933. Cell viability was determined by the MTT assay as described in Methods. (B) DNA fragmentation induced by CS-2170, CS-OF, CS-WF and CS-933 was analysed by agarose gel electrophoresis as described in Methods. Jurkat cells were untreated (–) or incubated overnight with 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of CS-2170, CS-OF, CS-WF and CS-933.

Prodigiosin is produced by *S. marcescens*, *Pseudomonas magnesorubra*, *Vibrio psychroerythrus* and other bacteria (Gerber, 1975; Paruchuri & Harshey, 1987). Microscopic observations of *S. marcescens* colonies showed that prodigiosin pigment was localized in vesicles (extracellular and cell associated) or intracellular granules (Matsuyama *et al.*, 1986; Kobayashi & Ichikawa, 1991). This pigment is synthesized in a bifurcated pathway, in which mono- and bipyrrrole precursors are synthesized separately and then coupled to form prodigiosin (Boger & Patel, 1988). Although, we can not rule out the possibility that CS-2170 has other minor proapoptotic components, our results using different mutant strains of *S. marcescens* indicate that prodigiosin and/or norprodigiosin, with very similar chemical structure, are involved in the apoptotic activity (Figure 4). Identification by spectroscopic analysis of prodigiosin released from *S. marcescens* to the culture medium, allow us to demonstrate that it is responsible for the induction of apoptosis in haematopoietic cancer cells. Recently, Han *et al.* (1998) described a T-cell specific immunosuppression associated to prodigiosin; however, they

showed that prodigiosin did not cause significant decrease in the splenic lymphocyte viability for 24 h of incubation at concentrations from 1 to 1000 nM, similar to our results in nonmalignant NIH-3T3 cells (Figure 6A).

Prodigiosin 25-C (UP) and cycloprodigiosin hydrochloride (cPrGHCl), two members of the prodigiosin family, synthesized by *Streptomyces* spp and *Pseudoalteromonas denitrificans* respectively have been identified to have immunosuppressive activity (Tsuji *et al.*, 1992; Kawachi *et al.*, 1997; Songia *et al.*, 1997). UP inhibits equally well both T and B human lymphocyte proliferation, but not transformed leukaemic cell lines (Songia *et al.*, 1997); Songia *et al.* (1997) suggested that cell-cycle related proteins such as retinoblastoma (Rb) and cyclin-dependent Kinase-2 and -4 (Cdk-2 and Cdk-4) are the target molecules of UP to induce growth arrest in G₁ phase in human T and B lymphocytes. Recently, Mortellaro *et al.* (1999) reported that a synthetic analogue of UP, PNU156804, has a biological effect indistinguishable from UP and efficiently inhibits the activation of NF- κ B and AP-1 transcription factors. Inhibition of NF- κ B substantially enhances the

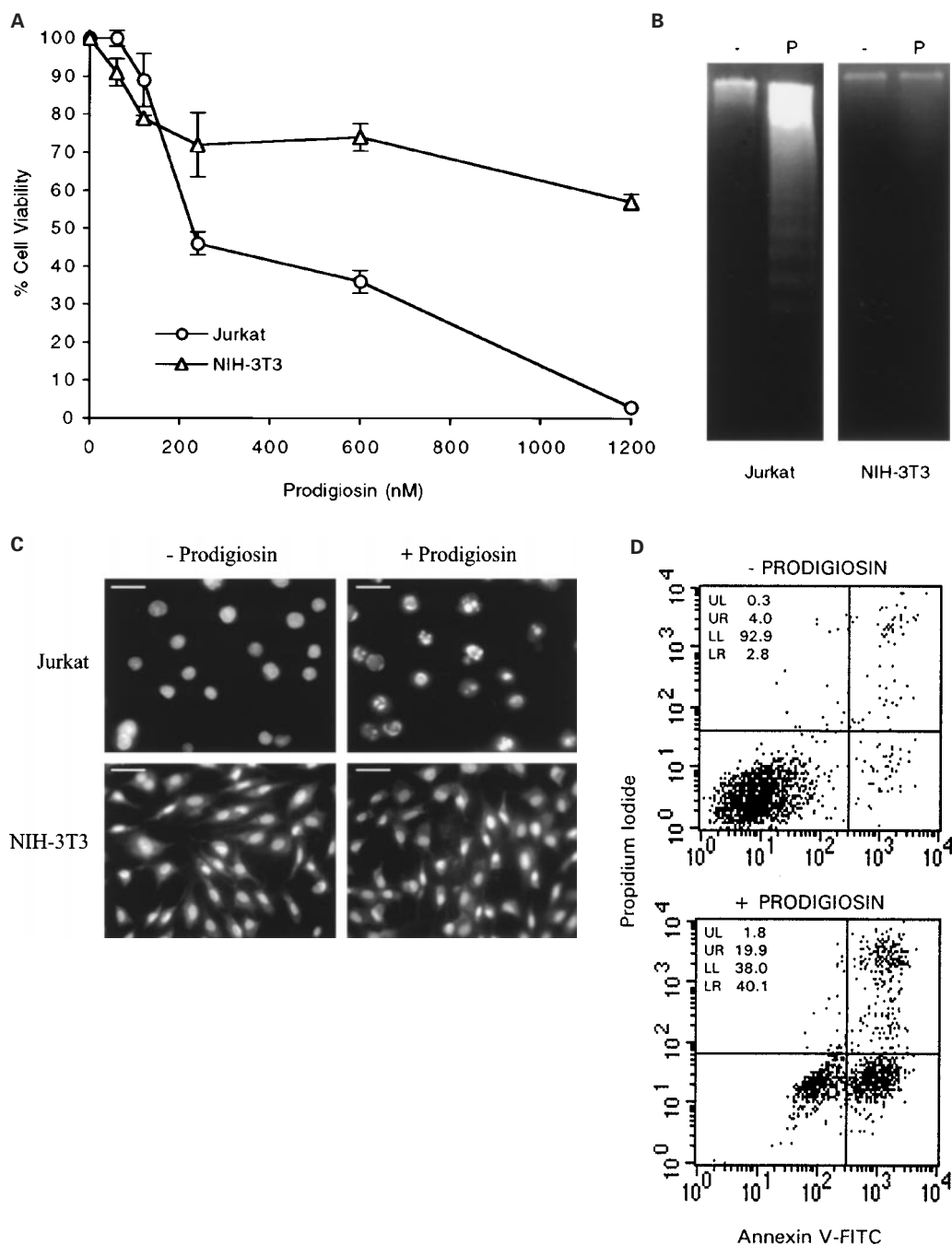


Figure 6 Purified prodigiosin induces apoptosis in Jurkat cells. (A) Dose-response of the effect of prodigiosin on cell viability. Jurkat and NIH-3T3 cell lines were incubated with 60 to 1200 nM of prodigiosin for 4 h. Cell viability was determined by the MTT assay as described in Methods and it is expressed as a percentage with respect to control cells. (B) DNA fragmentation induced by prodigiosin. 1×10^6 Jurkat and NIH-3T3 cells in 1 ml were untreated (–) or incubated (P) with 300 nM of prodigiosin for 16 h. DNA was extracted and subjected to agarose gel electrophoresis as described in Methods. (C) Fluorescence microscopic analysis of Jurkat and NIH-3T3 nuclei with Hoechst 33342 staining. Jurkat and NIH-3T3 cells were untreated (–Prodigiosin) or treated (+Prodigiosin) with 300 nM of prodigiosin for 6 h (bar = 10 μ m). (D) Detection of apoptosis in Jurkat cells detected by annexin-V/PI assay after 4 h exposure to 300 nM of prodigiosin.

apoptotic potential of cancer therapies (Wang *et al.*, 1999). However, Kawauchi *et al.* (1997) and Azuma *et al.* (2000) suggested that apoptosis is the mechanism of action of cPrGHCl to induce suppression of T cell proliferation. The molecule cPrGHCl inhibits proliferation and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines, showing IC_{50} values from 276 to 592 nM, compared with 8395 nM in isolated normal rat hepatocytes, at 72 h (Yamamoto *et al.*, 1999). Our results show an IC_{50} for prodigiosin of 225 nM in Jurkat in a shorter assay (4 h). However, the mechanisms underlying the

apoptotic effect of prodigiosin are unknown. cPrGHCl inhibits vacuolar ATPase (Tsuji *et al.*, 1992), and, like other vacuolar ATPase inhibitors, it acidifies the cytoplasm and apoptosis (Gottlieb *et al.*, 1996). The results presented in this report show that prodigiosin-induced apoptosis is blocked by Z-VAD.fmk, indicating that these caspases are involved in prodigiosin-induced apoptosis in haematopoietic cancer cell lines.

Interestingly, prodigiosin induces apoptosis in Jurkat and HL-60 cells, both of which are p53 deficient (Chen & Haas, 1990). This evidence indicates that prodigiosin-induce apop-

tosis by a p53-independent mechanism. Oncogenesis is often associated with defects in p53. As prodigiosin-induced apoptosis is p53-independent, this could mean an advantage over other chemotherapeutic drugs (Brown & Wouters, 1999; Bunz *et al.*, 1999).

The elucidation of the mechanisms involved in the apoptotic action of prodigiosin and its evaluation as a possible anticancer drug warrants further investigation.

References

- ARAB, S., MURAKAMI, M., DIRKS, P., BOYD, B., HUBBARD, S., LINGWOOD, D. & RUTKA, J. (1998). Verotoxins inhibit the growth of and induce apoptosis in human astrocytoma cells. *J. Neurol. Oncol.*, **40**, 137–150.
- ARAB, S., RUTKA, J. & LINGWOOD, C. (1999). Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, long-term elimination of human astrocytoma xenografts in nude mice. *Oncol. Res.*, **11**, 33–39.
- AZUMA, T., WATANABE, N., YAGISAWA, H., HIRATA, H., IWAMURA, M. & KOBAYASHI, Y. (2000). Induction of apoptosis of activated murine splenic T cells by cycloprodigiosin hydrochloride, a novel immunosuppressant. *Immunopharmacology*, **46**, 29–37.
- BELLOSILLO, B., DALMAU, M., COLOMER, D. & GIL, J. (1997). Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, **89**, 3378–3384.
- BELLOSILLO, B., PIQUÉ, M., BARRAGÁN, M., CASTAÑO, E., VILLAMOR, N., COLOMER, D., MONTSERRAT, E., PONS, G. & GIL, J. (1998). Aspirin and Salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, **92**, 1406–1414.
- BOGER, D.L. & PATEL, M. (1988). Total synthesis of prodigiosin, prodigiosene, and desmethoxyprodigiosin: Diels-Alder reactions of heterocyclic azadienes and development of an effective palladium (II)-promoted 2,2'-bipyrrrole coupling procedure. *J. Org. Chem.*, **53**, 1405–1415.
- BRADFORD, 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.
- BROWN, J.M. & WOUTERS, B.G. (1999). Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res.*, **59**, 1391–1399.
- BUNZ, F., HWANG, P.M., TORRANCE, C., WALDMAN, T., ZHANG, Y., DILLEHAY, L., WILLIAMS, J., LENGAUER, C., KINZLER, K.W. & VOGELSTEIN, B. (1999). Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J. Clin. Invest.*, **104**, 263–269.
- CAMERON, R. & FEUER, G. (2000). Molecular cellular and tissue reactions of apoptosis and their modulation by drugs. In: *Handbook of experimental pharmacology*, Vol. 142, ed. Cameron, R.G. & Feuer, G., Germany, Springer.
- CHEN, L.M., KANIGA, K. & GALAN, J.E. (1996). *Salmonella spp.* are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol. Microbiol.*, **21**, 1101–1115.
- CHEN, E. & HAAS, M. (1990). Frequent mutations in the p53 tumor suppressor gene in human leukemia T-cell lines. *Mol. Cell Biol.*, **10**, 5502–5509.
- CHEN, L.M., KANIGA, K. & GALAN, J.E. (1996). *Salmonella spp.* are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol. Microbiol.*, **21**, 1101–1115.
- CHEN, Y. & ZYCHLINSKY, A. (1994). Apoptosis induced by bacterial pathogens. *Microb. Pathogenesis*, **17**, 203–212.
- GARCÍA-CALVO, M., PETERSON, E.P., LEITING, B., RUEL, R., NICHOLSON, D.W. & THORNBERRY, N.A. (1998). Inhibition of human caspase by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J. Biol. Chem.*, **273**, 32608–32613.
- GERBER, N.N. (1975). Prodigiosin-like pigments. *Crc. Crit. Rev. Microbiol.*, **3**, 469–485.
- GOLDSCHMIDT, M.C. & WILLIAMS, R.P. (1968). Thiamine-induced formation of the monopyrrole moiety of prodigiosin. *J. Bacteriol.*, **96**, 609–616.
- GOTTLIEB, R.A., NORDBERG, J., SKOWRONSKI, E. & BABIOR, B.M. (1996). Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 654–658.
- HAN, S.B., KIM, H.M., KIM, Y.H., LEE, C.W., JANG, E.S., SON, K.H., KIM, S.U. & KIM, Y.K. (1998). T-cell specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia marcescens*. *Int. J. Immunopharmacol.*, **20**, 1–13.
- HEJAZI, A. & FALKNER, F.R. (1997). *Serratia marcescens*. *J. Med. Microbiol.*, **46**, 903–912.
- HILDEBRAND, A., POHL, M. & BHAKDI, S. (1991). *Staphylococcus aureus* α -toxin: dual mechanisms of binding to target cells. *J. Biol. Chem.*, **266**, 17195–17200.
- JONAS, D., SCHULTHEIS, B., KLAS, C., KRAMMER, P.H. & BHAKDI, S. (1993). Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes. *Infect. Immunol.*, **61**, 1715–1721.
- KATO, S., MURO, M., AKIFUSA, S., HANADA, N., SEMBA, I., FUJII, T., KOWASHI, Y. & NISHIHARA, T. (1995). Evidence for apoptosis of murine macrophages by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *Infect. Immunol.*, **63**, 3914–3919.
- KAWAUCHI, K., SHIBUTANI, K., YAGISAWA, H., KAMATA, H., NAKATSUJI, S., ANZAI, H., YOKOYAMA, Y., IKEGAMI, Y., MORIYAMA, Y. & HIRATA, H. (1997). A possible immunosuppressant, cycloprodigiosin hydrochloride, obtained from *Pseudomonas denitrificans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **237**, 543–547.
- KERR, J.F.R., WINTERFORD, C.M. & HARMON, B.V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, **73**, 2013–2026.
- KOBAYASHI, N. & ICHIKAWA, Y. (1991). Separation of the prodigiosin-localising crude vesicles which retain the activity of protease and nuclease in *Serratia marcescens*. *Microbiol. Immunol.*, **35**, 607–614.
- KOCHI, S.K. & COLLIER, R.J. (1993). DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis. *Exp. Cell Res.*, **208**, 296–302.
- KOOPMAN, G., REUTELINGSPERGER, C.P., KUIJTEN, G.A., KEEHNEN, R.M., PALS, S.T. & VAN OERS, M.H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, **84**, 1415–1420.
- LINDGREN, S.W., STOJILKOVIĆ, I. & HEFFRON, F. (1996). Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 4197–4201.
- MANGAN, D.F., TAICHMAN, N.S., LALLY, E.T. & WAHL, S.M. (1991). Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. *Infect. Immunol.*, **56**, 3267–3272.
- MATSUYAMA, T., MURAKAMI, T., FUJITA, M., FUJITA, S. & YANO, I. (1986). Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. *J. General Microbiol.*, **132**, 865–875.
- MODY, R.S., HEIDARYNEJAD, V., PATEL, A.M. & DAVE, P.J. (1990). Isolation and characterisation of *Serratia marcescens* mutants defective in prodigiosin biosynthesis. *Curr. Microbiol.*, **20**, 95–103.
- MONACK, D.M., RAUPACH, B., HROMOCKYJ, A.E. & FALKOW, S. (1996). *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 9833–9838.
- MORIMOTO, H. & BONAVIDA, B. (1992). Diphtheria toxin and pseudomonas A toxin mediated apoptosis. *J. Immunol.*, **149**, 2089–2094.
- MORTELLARO, A., SONGIA, S., GNOCCHI, P., FERRARI, M., FORNASIERO, C., D'ALESSIO, R., ISETTA, A., COLOTTA, F. & GOLAY, J. (1999). New immunosuppressive drug PNU156804 blocks IL-2-dependent proliferation and NF-kappa B and AP-1 activation. *J. Immunol.*, **162**, 7102–7109.

- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, **65**, 55–63.
- PALOMAR, J., MONTILLA, R., FUSTÉ, M.C. & VIÑAS, M. (1993). The role of O-antigen in susceptibility of *Serratia marcescens* to non-immune serum. *Microbios*, **76**, 189–196.
- PARUCHURI, D.K. & HARSHEY, R.M. (1987). Flagellar variation in *Serratia marcescens* is associated with color variation. *J. Bacteriol.*, **169**, 61–65.
- REED, J.C. (1999). Mechanisms of apoptosis avoidance in cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, **11**, 68–75.
- ROWAN, S. & FISHER, D.E. (1997). Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia*, **11**, 457–465.
- SONGIA, S., MORTELLARO, A., TAVERNA, S., FORNASIERO, C., SCHEIBER, E.A., ERBA, E., COLOTTA, F., MANTOVANI, A., ISETTA, A.M. & GOLAY, J. (1997). Characterisation of the new immunosuppressive drug undecylprodigiosin in human lymphocytes. *J. Immunol.*, **158**, 3987–3995.
- TSUJI, R.F., MAGAE, J., JAMASHITA, M., NAGAI, K. & YAMASAKI, M. (1992). Immunomodulating properties of prodigiosin 25-C, an antibiotic which preferentially suppresses of cytotoxic T cells. *J. Antibiot.*, **45**, 1295–1302.
- WANG, C., CUSACK, J.J., LIU, R. & BALDWIN, A.J. (1999). Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- κ B. *Nature Med.*, **5**, 412–417.
- WICKREMASINGHE, R.G. & HOFFBRAND, A.V. (1999). Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood*, **93**, 3587–3600.
- YAMAMOTO, C., TAKEMOTO, H., KUNO, K., YAMAMOTO, D., TSUBURA, A., KAMATA, K., HIRATA, H., YAMAMOTO, A., KANO, H., SEKI, T. & INOUE, K. (1999). Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines in vitro and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Hepatology*, **30**, 894–902.
- YOSHIDA, J., TAKAMURA, S. & NISHIO, M.M. (1998). Characterization of a streptococcal antitumor glycoprotein (SAGP). *Life Sci.*, **62**, 1043–1053.
- ZYCHLINSKY, A. & SANTONETTI, P. (1997). Apoptosis in bacterial pathogenesis. *J. Clin. Invest.*, **100**, S63–S65.

(Received May 4, 2000

Revised June 26, 2000

Accepted July 20, 2000)

Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells

Beatriz Montaner, Ricardo Pérez-Tomás*

*Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Cancer Biology Research Group,
Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet (Barcelona) Spain*

Received 6 April 2000; accepted 17 October 2000

Abstract

Prodigiosin is a red pigment produced by various bacteria including *Serratia marcescens*. Colorectal cancer is one of the most frequent malignancies and one of the most frequent causes of cancer death in the Western world. Its treatment is far from satisfactory and the challenge to oncologists is to find novel chemical entities with less toxicity and greater effectiveness than those used in current chemotherapy. Here we characterize the apoptotic action of prodigiosin in colon cancer cells. DLD-1 and SW-620 human colon adenocarcinoma cells, NRK and Swiss-3T3 nonmalignant cells were assayed by the MTT assay, fragmentation pattern of DNA, Hoechst 33342 staining and study of PARP cleavage by Western blot, in order to characterize the prodigiosin-induced apoptosis. Prodigiosin was purified and its structure was confirmed. Metastatic SW-620 cells were more sensitive to prodigiosin (IC_{50} : 275 nM) than DLD-1. We did not observe a significant decrease in the viability of NRK cells. We confirmed that prodigiosin induces apoptosis in both cancer cell lines by the characteristic DNA laddering pattern and condensed nuclei or apoptotic bodies identified by fluorescence microscopy. These results indicate that prodigiosin induces apoptosis in colon cancer cells. © 2001 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Apoptosis; Cancer-cell-lines; Chemotherapy; Colon; Prodigiosin

Introduction

Colorectal cancer is the fourth commonest form of cancer in men, representing 8.9 % of all new cancers per year worldwide. To reduce the risks of this disease, chemotherapeutic agents, including antioxidants and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), are used as immune modulators or promoters of cell differentiation or apoptosis [1–3]. Nevertheless, surgery is the only option available to patients with colorectal cancer, and adjuvant chemo-

* Corresponding author. Dept. Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica. Pavelló Central, 5^a planta. LR 5.1. C/ Feixa Llarga s/n.08907 L'Hospitalet (Barcelona). Spain. Tel.: 34-93-4024288; fax: 34-93-4024213/9082.

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

therapy is applied to decrease recurrence and thereby metastasis. The current treatment for these patients is fluoropyrimidines such as 5-fluorouracil (5-FU) alone or in combination with other drugs like leucovorin, oxaliplatin or folinic acid [4–7]. They induce apoptosis in colorectal tumor cells [8,9] although the benefits in terms of tumor regression or symptom improvement are limited.

Apoptosis, also known as programmed cell death, is responsible for deletion of cells in normal tissues during development, tissue homeostasis and protection against pathogens [10,11]. Apoptosis malfunctions can have health implications like in cancer. A variety of morphological and biochemical studies can be used to identify the apoptotic process, which is fundamentally different from necrosis or degenerative cell death. The morphology of cells during the development of apoptosis is associated with compaction and margination of nuclear chromatin, condensation of the cytoplasm, and partition of nucleus and cytoplasm into membrane bound-vesicles, many containing nuclear fragments. Furthermore, biochemical mechanisms are involved in the fragmentation in the internucleosomal linker regions, in multiple units compromising 180–200 base pairs of the nuclear DNA, giving a characteristic pattern when the DNA is analyzed by gel electrophoresis [12].

The identification of novel targets and development of more specific chemotherapeutic agents are two of the most important goals of research in cancer therapy. Several bacterial pathogens have been identified as mediators of apoptosis *in vitro* and during pathogenesis [13–17]. A family of natural red pigments called prodigiosins are synthesized from different bacteria. Cycloprodigiosin hydrochloride (cPrG·HCl), uncedylprodigiosin (UP) and prodigiosin are three members of this family for which immunosuppressive and apoptotic activities have recently been described [18–20]. Prodigiosin is produced by *Serratia marcescens* following a bifurcated biosynthesis pathway, in which mono- and bipyrrrole precursors are obtained separately and then coupled to form the linear tripyrrrole red pigment [21] during the stationary phase of bacterial growth [22].

In the present study, we have analyzed the effect of prodigiosin in different colon cancer cell lines. We quantified the loss of viability by employing the MTT assay; we also stained their DNA with Hoechst 33342 for morphological identification of apoptotic cells; finally, we studied the ladder pattern of DNA after agarose gel electrophoresis and the PARP cleavage by Western immunoblotting, biochemical features of apoptotic cells.

Our results indicate that prodigiosin induces apoptosis in colon cancer cells lines, and is thus the reference compound of a growing family of drugs with potential utility in cancer chemotherapy.

Methods

Chemical and reagents

Meat peptone was purchased from Difco (Detroit, Michigan, USA). Glycerol was bought from Merck (Darmstadt, Germany). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), proteinase K, trypsin and protease V8 were purchased from Sigma Chemicals Co (St Louis, MO, USA). Deionized water further purified with a Millipore Milli-Q system (Bedford, MA) was used.

Cell lines and culture conditions

Colon human adenocarcinoma (DLD-1 cell line), colon human adenocarcinoma from lymph node metastasis (SW-620 cell line) and normal rat kidney (NRK-52E) were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Swiss mouse embryo cell line (Swiss-3T3) was a gift from E. Rozengurt (Imperial Cancer Research Foundation, London, UK). DLD-1 cells were cultured in RPMI 1640 medium; SW-620 NRK and Swiss-3T3 were cultured in DMEM medium. Both media were purchased from Biological Industries (Beit Haemek, Israel) and supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine (all from GIBCO BRL, Paisley, UK), at 37°C, 5% CO₂ in air.

The experiments were performed when cells were in the log phase of growth.

Bacteria strain and culture conditions

S. marcescens 2170 environmental isolate is a wild type strain that produces prodigiosin. Prodigiosin (2-methyl-3-pentyl-6-methoxyprodigiosene) is made by the coupling of 2-methyl-3-n-amylypyrrole (MAP) with 4-methoxy-2,2'-bipyrrrole-5-carboxaldehyde (MBC) [23]. *S. marcescens* 2170 was inoculated into 25 ml of peptone glycerol (PG) medium, containing 1% meat peptone and 10% glycerol in distilled water, and cultivated for 8 hours at 30°C with vigorous shaking, and then transferred to 250 ml of PG medium and cultivated for 48 hours at 30°C with vigorous shaking. Bacteria were then harvested by centrifugation at $6,800 \times g$ for 15 minutes at 4°C.

Supernatant from the bacterial strain was passed through a 0.22 µm filter (Nalge Nunc Int. Rochester, NY, USA) and concentrated by a Centricon[®] Plus-20 (Millipore Iberica, Barcelona, Spain). The resulting concentrate was divided into aliquots and stored at –80°C.

In order to denature and hydrolyze the active peptides and proteins, the supernatant was heated to 100°C for 15 minutes or subjected to protease treatments with proteinase K (50 µg/ml in 10mM Tris-HCl pH 7.8, 5mM EDTA and 0.5% SDS), trypsin (50µg/ml in 100nM NaHCO₃ pH 7.5) and protease V8 (5units/ml in 0.2% SDS), and incubated overnight (16 hours) at 37°C.

Isolation and purification of prodigiosin

Prodigiosin was measured using the difference in absorption of the concentrated supernatant at 534 and 655 nm. A difference in absorbancy of 1.0 between the two wavelengths is equivalent to 19.3 µg of prodigiosin per ml [24].

Furthermore, prodigiosin purification was performed as described previously [25]. Briefly, prodigiosin was extracted from pigmented suspensions with acidic methanol (1 ml of 1N HCl:24 ml of methanol) and then centrifuged ($6,800 \times g$ for 15 minutes) and the solvent of the supernatant was evaporated under vacuum. Atmospheric pressure liquid chromatography of the extract was performed on silica gel with chloroform and methanol as solvents. The eluted fractions were pooled and the chloroform/methanol extract was vacuum evaporated, redissolved in H₂O and lyophilized. The isolated pigment was redissolved in methanol and analyzed by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) using a VG-Quattro triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, VG-Biotech, UK). The isolated pigment was re-

purified by subsequent semipreparative HPLC carried out on a Shimadzu instrument (Kyoto, Japan). A Nucleosil C₁₈ reversed-phase column (250 × 4 mm, 10 μm) was used with a 0% to 100% linear gradient in 30 minutes (A: 10 mM ammonium acetate, pH 7.0, B: 100% acetonitrile). The elution was monitored both using diode-array UV detector (SPD-M10AVP Shimadzu) and by ESI-MS. After repeated injections the pooled fractions containing the major peak were vacuum evaporated, redissolved in H₂O, lyophilized and characterized by ESI-MS and ¹H-NMR. ESI, m/z 324.4 (M+H)⁺, (C₂₀H₂₅N₃O requires 323.4381 (MW average)). ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz, ppm); 10.71 (m, NH), 8.54 (m, NH), 7.08 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.83 (m, 1H), 6.30 (m, 1H), 6.25 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.43 (t, 2H), 1.58 (s, 3H), 1.2–1.4 (m, 6H), 0.91 (t, 3H).

Cell viability assay

Cell viability was determined by the MTT assay [26]. Briefly, 20 × 10³ cells were incubated in 96-well microtiter cell culture plates, in the absence (control cells) or in the presence of 400 to 1600 nM of prodigiosin in a final volume of 100 μl. After 8 hours incubation, 10 μM of MTT (diluted in PBS) was added to each well for an additional 4 hours. The blue MTT formazan precipitate was dissolved in 100 μl of isopropanol:1N HCl (24:1) and the absorbance at 550 nm was measured on a multiwell plate reader. Cell viability was expressed as a percentage of control. Data are shown as the mean value ± s.e.m. of triplicate cultures.

Electrophoresis and western blot analysis of PARP cleavage

To analyze the PARP (poly-(ADP-ribose)-polymerase) cleavage by Western blot, 1 × 10⁶ cells per ml were exposed to 1100 nM of prodigiosin and incubated for 8 hours. Cells were washed in PBS and lysed with Laemmli sample buffer [27] and 50 μg protein extracts were electrophoresed on 12% polyacrylamide gel and transferred to Immobilon-P (Millipore) membrane. Membranes were blocked in 5% dry milk diluted in TBS-T (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20), for 1 hour and then incubated for 2 hours at room temperature (RT) with rabbit polyclonal antibody anti-poly-(ADP-ribose)-polymerase, diluted 1:1000 in 5% dry milk-TBS-T (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany, ref. 1 835 238), which recognizes both the native enzyme (116kD) and the cleavage product (85kD) [28]. Membranes were washed 3 × 5 minutes in 5% dry milk-TBS-T and antibody binding was detected using peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad, United Kingdom, ref. 170-6515) diluted 1:1000 in 5% dry-milk-TBS-T, for 1 hour at RT. Membranes were washed in TBS-T 3 × 5 minutes, and peroxidase was then developed by incubating the membrane with 2.25mM luminol (Sigma) and 0.45mM p-iodophenol (Fluka, Buchs, Switzerland) in 50mM Tris-HCl pH 9.0 plus 0.03% H₂O₂ for 1 minute at RT and enhanced chemiluminescence in an autoradiography film.

Analysis of DNA fragmentation

Analysis of DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis was performed as described previously [25]. Briefly, 1 × 10⁶ cells per ml were exposed to 1100 nM of prodigiosin and incubated 8 hours. Cells were washed in PBS and resuspended in ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100). After incubating for 15 minutes

at 4°C, cell lysates were centrifuged at $14,000 \times g$ for 15 minutes and the supernatant was treated with 0.2 mg/ml of proteinase K in a buffer containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 mM EDTA and 1% SDS, for 4 hours at 37°C. The DNA preparations were phenol/chloroform extracted twice to remove proteins. DNA was precipitated with 140 mM NaCl and two volumes of ethanol at -20°C overnight. DNA precipitates were recovered by centrifugation at $14,000 \times g$ for 10 minutes at 4°C, washed twice in cool 70% ethanol and air dried. DNA pellets were resuspended in 15 μl of TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) and treated with DNase-free RNase (Boehringer Mannheim) for 1 hour at 37°C. 3.2 μl of loading buffer was added to each tube and the DNA preparations were electrophoresed in 1% agarose gels which contained ethidium bromide. Gels were placed on an UV light box to visualize the DNA ladder pattern.

Hoechst staining

Cell morphology was evaluated by fluorescence microscopy following Hoechst 33342 DNA staining (Sigma). Cells (4×10^5 per ml) from each cell lines were incubated in the absence (control cells) or in the presence of 1100 nM of prodigiosin for 5 hours. Cells were then washed in PBS and resuspended in PBS plus Hoechst 33342 to a final concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 30 minutes at 37°C in the dark. After incubation, cells were centrifuged and resuspended in PBS plus propidium iodide to a final concentration 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and incubated for 10 minutes at room temperature in the dark. Cells were then centrifuged again, washed in PBS, examined with a Leitz Diaplan microscope and photographed with a Wild MPS 45 Photoautomat system. Apoptotic cells were identified by nuclear condensation, formation of membrane blebs and apoptotic bodies. Necrotic cells showed clumping of chromatin without marked changes in its distribution, organelles and membranes disintegration, maintaining the overall configuration of the cell).

Statistical analysis

All data points shown are mean value \pm s.e.m. of n independent experiments. The data points from triplicates of an individual experiment were averaged, and the data points shown are the mean of these averages from n experiments. Statistical significance of differences was assessed by ANOVA (Fisher's PLSD test). Differences between untreated and treated cells with prodigiosin are indicated by * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Results

Isolation and purification of prodigiosin from S. marcescens 2170

We used the concentrated supernatant from *S. marcescens* 2170 as a source of apoptotic activity in human colon cancer cell lines. In order to characterize the active principle that induced apoptosis, we performed the following experiments. Supernatant from *S. marcescens* 2170 was heated to 100°C for 15 minutes or subjected to different protease treatments with proteinase K, trypsin, and protease V8 in order to eliminate active proteins from the sample. In all cases, the samples continued inducing apoptosis, which ruled out the involvement of peptides and/or proteins in this effect (data not shown).

We decided to study the possible involvement of prodigiosin in apoptosis in human colon cancer cell lines since apoptotic activity had been described in rat hepatocellular cancer cell lines for other member of the prodigiosins family [19] as well as in haematopoietic cancer cell lines [25]. Results of previous studies indicated that prodigiosin should be stable at 100°C and protease-resistant.

Prodigiosin was purified from *S. marcescens* 2170 by methanol/HCl extraction followed by silica gel chromatography and semipreparative reverse-phase HPLC. ESI-MS gave a molecular weight of 323.4 Da, consistent with the expected value for prodigiosin (C₂₀H₂₅N₃O) (Fig. 1). The structure of prodigiosin (Fig. 1 *Inset*) was further confirmed by high-field ¹H-NMR spectroscopy (data not shown).

Prodigiosin decreased the viability of colon cancer cells

The effect of prodigiosin on the viability of different human colon cancer cell lines (DLD-1 and SW-620) and nonmalignant cells (NRK-52E and Swiss-3T3) was studied. Cell lines were incubated for 8 hours with several doses of prodigiosin, ranging from 400 to 1600 nM, and cell viability was then determined by the MTT assay. A significant dose-dependent decrease in the number of viable cells was observed in SW-620, with an IC₅₀ of 275 nM (Fig. 2). When SW-620 cells were exposed to prodigiosin for 8 hours, and washed in PBS and fresh growth medium without prodigiosin was added, the number of viable cells was the same as the values shown in fig. 2 suggesting that the effect of prodigiosin was irreversible

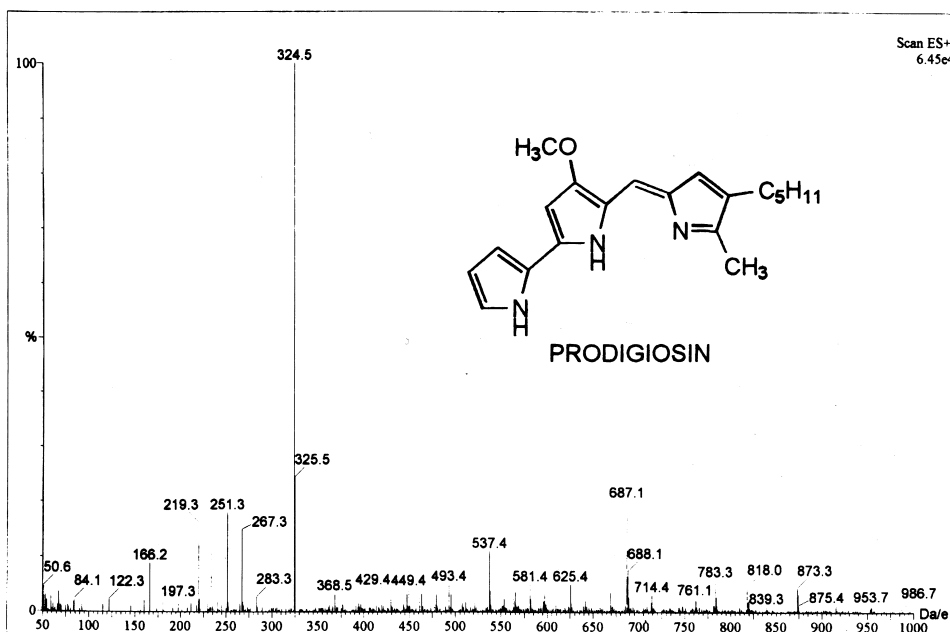


Fig. 1. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) shows the prodigiosin isolated from *S. marcescens* giving a molecular weight of 323.4 Da. *Inset* shows the structure of prodigiosin (2-methyl-3-pentyl-6-methoxyprodigiosene).

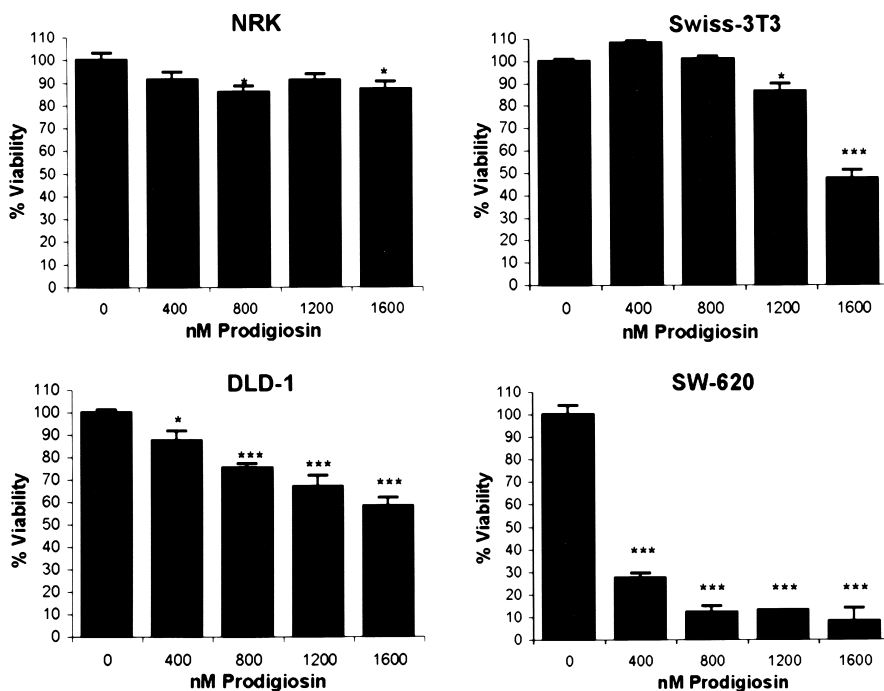


Fig. 2. Effect of prodigiosin on colon cancer and nonmalignant cell lines. Cell viability in prodigiosin-treated cells. The data were obtained from the treat of NRK, Swiss-3T3, DLD-1 and SW-620 cell lines with 400 to 1600 nM of prodigiosin for 8 hours. Number of viable cells was determined by the MTT assay and is expressed as a percentage with respect to control cells. Data are shown as the mean value \pm s.e.m. of three independent experiments performed in triplicate. Statistical significance of differences between untreated and treated cells with prodigiosin at different doses was assayed by ANOVA (Fisher's PLSD). * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

(data no shown). DLD-1 was less sensitive to prodigiosin exposure, although showed a constant decrease in its viability. However, we did not observe an important decrease in the viability of the NRK cells, or in other nonmalignant cell lines like Swiss-3T3 that showed a slight reduction in the number of viable cells. However 90% of Swiss-3T3 cells were viable in presence of 1200 nM of prodigiosin; the IC_{50} was 1550 nM, five times higher than in SW-620. The time course (8 to 24 hours) of the cytotoxic effect of prodigiosin on these cell lines was found to be the same as at 8 hours (data no shown).

Prodigiosin induced apoptosis and activation of caspases in colon cancer cells

In order to determine whether this cytotoxic effect was due to apoptosis, we analyzed whether prodigiosin induced DNA fragmentation. Agarose gel electrophoresis of DNA showed the characteristic ladder pattern of apoptosis in all cancer cell lines incubated 8 hours in the presence of 1100 nM of prodigiosin. (Fig. 3A). PARP cleavage was analyzed on protein extracts from cells incubated 8 hours with 1100 nM of prodigiosin by Western blot as an early specific marker of caspase activity. In prodigiosin-treated cells, both the native PARP (116kD) and the cleavage product (85kD) were observed (Fig. 3B).

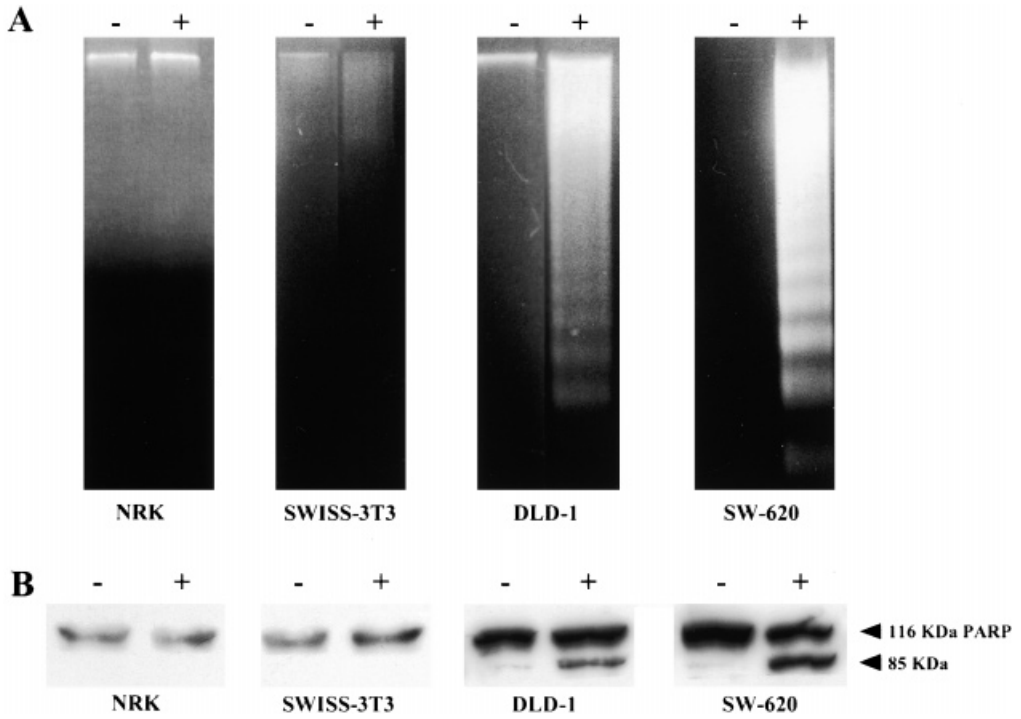


Fig. 3. (A) Induction of apoptosis by prodigiosin. NRK, Swiss-3T3, DLD-1 and SW-620 cell lines were untreated (-) or incubated (+) for 8 hours with 1100 nM of prodigiosin. The fragmented DNA was extracted and analyzed by agarose gel electrophoresis. (B) PARP cleavage was analyzed on protein extracts from these cells by Western blot as described in the Materials and Methods. The position of the native PARP (116kD) and the proteolytic fragment (85 kD) is indicated.

We corroborated these results at microscopic level using the Hoechst 33342 staining. In contrast to untreated cells, the apoptotic nuclei of SW-620 and DLD-1 gave stronger blue fluorescence and were condensed and fragmented. However nuclei of Swiss-3T3 cells only showed “bean appearance” (Fig. 4).

Discussion

This study shows that prodigiosin released from *S. marcescens* 2170 to the culture medium induced apoptosis in colon cancer cell lines (SW-620 and DLD-1) but not in nonmalignant cell lines (NRK and Swiss-3T3) at the same doses. DNA fragmentation, proteolytic cleavage of PARP and distinctive morphological changes in the nucleus typified this event. This rapid and potent effect in cancer cell lines makes prodigiosin an interesting new antineoplastic candidate.

The use of fluoropyrimidines (e.g. 5-FU), alone or in combination with other drugs, is the mainstay of colorectal cancer therapy [4–7], although approximately 60%–70% of patients with advanced colorectal carcinoma do not achieve objective clinical responses with 5-FU-based chemotherapy. Furthermore, a significant subset of patients with resected disease will

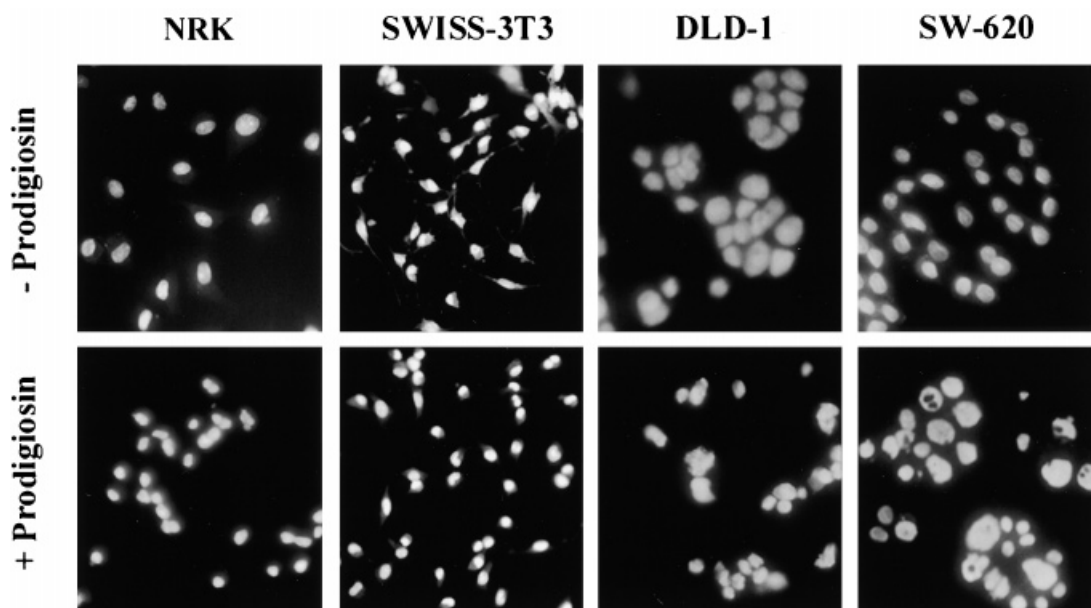


Fig. 4. Fluorescence microscopic analysis of NRK, Swiss-3T3, DLD-1 and SW-620 nuclei with Hoechst 33342 staining. Cells were untreated (–Prodigiosin) or treated (+Prodigiosin) with 1100 nM of prodigiosin for 5 hours (original magnification 100 \times).

relapse despite 5-FU-based adjuvant treatment [4]. These observations underscore the need for new, more effective cytotoxic agents. In the present experimental investigation, we demonstrated that the metastatic SW-620 cells showed higher sensitivity to prodigiosin, with a significant decrease in the number of viable cells. Nevertheless, DLD-1 showed a constant decrease in the number of viable cells but was less sensitive to the drug. Furthermore, we confirm that prodigiosin induces apoptosis in both cancer cells but not in nonmalignant cells at these doses, which makes this molecule a new candidate for further research as an anticancer drug.

The molecule cPrG·HCl inhibits proliferation and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cell lines, showing IC_{50} values from 276 to 592 nM, compared with 8395 nM in isolated normal rat hepatocytes, at 72 hours [19]. Our results show an IC_{50} for prodigiosin of 275 nM in SW-620 in a shorter assay (8 hours). Other authors report a reduction of up to 81.3% in the tumor weight of hepatocarcinoma xenografts in nude mice treated with cPrG·HCl.

The colon cancer cell lines used here were sensitive to prodigiosin, which induced apoptosis as shown by DNA fragmentation analysis and by morphological evidence using Hoechst 33342 staining. Furthermore, we demonstrated by PARP cleavage analysis that this apoptosis involves the activation of caspases.

Although the mechanism of the apoptotic effect of prodigiosin is unknown, Yoshida et al. show that cPrG·HCl, like other prodigiosins, promotes H^+/Cl^- symport, induces acidification of the cytosol and thus apoptosis [17, 29, 30]. Another hypothesis of the mechanism of action of prodigiosin was proposed by Songia et al. [18]. They found that UP arrested the

proliferation of human lymphocytes by inhibiting phosphorylation of retinoblastoma (Rb) and suppressing cyclin-dependent kinase-2 and -4. Recently, Mortellaro et al. [31] reported that a synthetic analogue of UP, PNU156804, has a biological effect indistinguishable from UP and efficiently inhibits the activation of NF- κ B and AP-1 transcription factors.

The multifunctional protein p53 plays a role in tumor suppression. Mutation of this gene and its allelic loss at chromosome 17p have been shown to be an adverse prognostic marker in colorectal cancers [32, 33]. p53 has a profound influence on the responses to therapeutic agents, and cells with targeted p53 deletion are resistant to apoptosis induced by 5-FU, the standard treatment in metastatic colorectal cancer [9, 34]. Here we show that prodigiosin induces apoptosis in SW-620 and DLD-1, both of which have mutant or defective p53 [35]. Bcl-2 overexpression has been reported to suppress apoptotic cell death in a high proportion of adenomas and colorectal cancers [36]. Furthermore, the expression of this survival factor may explain the resistance of colorectal tumours to chemotherapeutic treatment [37]. We showed that SW-620 cells, which retain the Bcl-2 expression [37], were sensitive to prodigiosin, indicating that prodigiosin-induced apoptosis was p53-independent and it was not protected by Bcl-2, which could mean an advantage over other chemotherapeutic drugs [25].

Our results demonstrate that prodigiosin is a potent apoptotic factor on colon cancer cells, and nominally non-toxic to nonmalignant cells. This suggests its use as a possible anticancer drug, although the mechanisms of its apoptotic action remain to be determined, and assays *in vivo* will be necessary.

Acknowledgments

The authors thank Dr. M. Viñas (Microbiology Dept. University of Barcelona) for the generous gift of bacterial strains and Dr. E. Giralt, Marc Martinell and Dr. M. Vilaseca (Organic Chemistry Dept. and Mass Spectrometry Unit. University of Barcelona) for excellent technical assistance in purify prodigiosin and helpful discussion and Dr. J. Gil for reviewing the manuscript and Jordi Capella for technical assistance. This work was supported by the Marató de TV3.

References

1. Langman M, Boyle P. Chemoprevention of colorectal cancer. *Gut* 1998;43 (4):578–85.
2. Agarwal B, Rao CV, Bhendwal S, Ramey WR, Shirin H, Reddy BS, Holt PR. Lovastatin augments sulindac-induced apoptosis in colon cancer cells and potentiates chemopreventive effects of sulindac. *Gastroenterology* 1999;117 (4):838–47.
3. Castaño E, Dalmau M, Barragan M, Pueyo G, Bartrons R, Gil J. Aspirin induces cell death and caspase-dependent phosphatidylserine externalization in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *British Journal of Cancer* 1999;81 (2):294–99.
4. Sinicrope FA, Sugarman SM. Role of adjuvant therapy in surgically resected colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1995;109 (3):984–93.
5. Royce ME, Pazdur R. Novel chemotherapeutic agents for gastrointestinal cancers. *Current Opinion in Oncology* 1999;11 (4):299–304.
6. van Cutsem E, Peeters M, Verslype C, Filez L, Haustermans K, Janssens J. The medical treatment of colorectal cancer: actual status and new developments. *Hepato-Gastroenterology* 1999;46 (26):709–16.

7. Peeters M, Haller D. Therapy for early-stage colorectal cancer. *Oncology* 1999;13 (3):307–15; 320–1.
8. Hannun YA. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* 1997;89 (6):1845–53.
9. Bunz F, Hwang PM, Torrance C, Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Williams J, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *Journal of Clinical Investigation* 1999;104 (3):263–69.
10. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356 (6368):397–400.
11. Vaux DL, Haeccker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994;76 (5):777–9.
12. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73 (8):2013–26.
13. Zychlinsky A, Santonetti P. Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis. *Journal of Clinical Investigation* 1997;100 (3):493–5.
14. Lindgren S, Stojiljkovic I, Heffron F. Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93 (9):4197–201.
15. Chen LM, Kaniga K, Galan JE. *Salmonella* spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Molecular Microbiology* 1996;21 (5):1101–15.
16. Monack DM, Raupach B, Hromockyj AE, Falkow S. *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93 (18):9833–38.
17. Yoshida J, Takamura S, Nishio M. Characterization of a streptococcal antitumor glycoprotein (SAGP). *Life Sciences* 1998;62 (12):1043–53.
18. Songia S, Mortellaro A, Taverna S, Fornasiero C, Scheiber EA, Erba E, Colotta F, Mantovani A, Isetta AM, Golay J. Characterization of the new immunosuppressive drug undecylprodigiosin in human lymphocytes. *Journal of Immunology* 1997;158 (8):3987–95.
19. Yamamoto C, Takemoto H, Kuno K, Yamamoto D, Tsubura A, Kamata K, Hirata H, Yamamoto A, Kano H, Seki T, Inoue K. Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines in vitro and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Hepatology* 1999;30 (4):894–902.
20. Azuma T, Watanabe N, Yagisawa H, Hirata H, Iwamura M, Kobayashi Y. Induction of apoptosis of activated murine splenic T cells by cycloprodigiosin hydrochloride, a novel immunosuppressant. *Immunopharmacology* 2000;46 (1):29–37.
21. Boger D, Patel M. Total synthesis of prodigiosin, prodigiosene, and desmethoxyprodigiosin: Diels-Alder reactions of heterocyclic azadienes and development of an effective palladium (II)-promoted 2,2'-bipyrrrole coupling procedure. *Journal of Organic Chemistry* 1988;53:1405–15.
22. Rokem J, Weitzman P. Prodigiosin formation by *Serratia marcescens* in a chemostat. *Enzyme & Microbial Technology* 1987;9:153–5.
23. Mody R, Heidarynejard V, Patel A, Dave P. Isolation and characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in prodigiosin biosynthesis. *Current Microbiology* 1990;20:95–103.
24. Goldschmidt MC, Williams RP. Thiamine-induced formation of the monopyrrole moiety of prodigiosin. *Journal of Bacteriology* 1968;96 (3):609–16.
25. Montaner B, Navarro S, Piqué M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E, Gil J, Pérez-Tomás R. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in hematopoietic cancer cell lines. *British Journal of Pharmacology* 2000; 131 (3):585–93.
26. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983;65 (1–2):55–63.
27. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227 (259):680–5.
28. Bellosillo B, Dalmau M, Colomer D, Gil J. Involvement of CED-3/ICE proteases in the apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 1997;89 (9):3378–84.
29. Sato T, Konno H, Tanaka Y, Kataoka T, Nagai K, Wasserman HH, Ohkuma S. Prodigiosins as a new group of H⁺/Cl⁻ symporters that uncouple proton translocators. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273 (34): 21455–62.

30. Ohkuma S, Sato T, Okamoto M, Matsuya H, Arai K, Kataoka T, Nagai K, Wasserman HH. Prodigiosins uncouple lysosomal vacuolar-type ATPase through promotion of H⁺/Cl⁻ symport. *Biochemical Journal* 1998; 334 (Pt 3):731–41.
31. Mortellaro A, Songia S, Gnocchi P, Ferrari M, Fornasiero C, D'Alessio R, Isetta A, Colotta F, Golay J. New immunosuppressive drug PNU156804 blocks IL-2-dependent proliferation and NF-kappa B and AP-1 activation. *Journal of Immunology* 1999;162 (12):7102–9.
32. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jego N, Asselain B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994;106 (1):42–8.
33. Zeng ZS, Sarkis AS, Zhang ZF, Klimstra DS, Charytonowicz E, Guillem JG, Cordon-Cardo C, Cohen AM. p53 nuclear overexpression: an independent predictor of survival in lymph node—positive colorectal cancer patients. *Journal of Clinical Oncology* 1994;12 (10):2043–50.
34. Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Research* 1999;59 (7):1391–99.
35. Huang L, Pardee AB. Beta-lapachone induces cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Molecular Medicine* 1999;5 (11):711–20.
36. Watson AJ, Merritt AJ, Jones LS, Askew JN, Anderson E, Becciolini A, Balzi M, Potten CS, Hickman JA. Evidence of reciprocity of bcl-2 and p53 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *British Journal of Cancer* 1996;73 (8):889–95.
37. Hague A, Moorghen M, Hicks D, Chapman M, Paraskeva C. BCL-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Oncogene* 1994;9 (11):3367–70.

Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1

Carmen Díaz-Ruiz[#], Beatriz Montaner[#] and Ricardo Pérez-Tomás^{*}

Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Cancer Biology Research Group, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet (Barcelona) Spain.

[#] These two authors contributed equally

Summary. Gastric cancer is one of the most frequent malignancies and its treatment is far from satisfactory. The challenge to oncologists is the characterization of novel chemical entities with greater effectiveness. Treatment of human gastric carcinoma cell line (HGT-1) with prodigiosin synthesized by the bacteria *Serratia marcescens* showed a constant decrease in viability by apoptosis. Morphological analysis of prodigiosin-treated cells demonstrated that prodigiosin induces cell shrinkage, chromatin condensation, reorganization of actin microfilament architecture, and detachment of cells from the cell culture substrate. The results suggest that prodigiosin induces apoptosis in gastric cancer cells.

Keywords: Apoptosis, Cancer cell lines, Chemotherapy, Prodigiosin

Introduction

Oesophageal and gastric cancers pose a number of challenges for oncologists, gastroenterologists and surgeons. Surgical resection is the most effective treatment in gastric cancer. Nevertheless, in the United States and

Europe, curative resections are possible in only 50 % to 60 % of newly diagnosed gastric cancer patients (Kelsen, 1996). The current chemotherapy treatment for these patients is 5-fluorouracil (5-FU), which alone or in combination with other drugs like cisplatin (Lokich, 1998; Ross et al., 1998), induces apoptosis in tumor cells (Inada et al., 1997).

Apoptosis is characterized by internucleosomal DNA degradation, chromatin condensation and distinct histological features (Kerr et al., 1994). Unlike necrotic death, apoptosis is an active process involving the programmed activation of signalling cascades that are necessary to induce cell death. Apoptosis plays an important role in development and tissue homeostasis, and provides defence against viral infection and oncogenesis (Raff, 1992; Vaux et al., 1994). The importance of apoptosis as an anti-cancer agent has been demonstrated in many tumour cells types in response to a broad range of drugs (Hannun, 1997; Cameron and Feuer, 2000). The identification of novel targets and development of new, more specific chemotherapeutic agents are two of the most important goals of research on cancer therapy. Several bacterial pathogens have been identified as mediators of apoptosis *in vitro* and during pathogenesis (Zychlinsky and Santonetti, 1997). Bacterial toxins like leukotoxin, α -toxin and haemolysin form pores in the eukaryotic cell membrane and disrupt the cell via osmotic swelling (Mangan et al., 1991; Hildebrand et al.,

Offprint requests to Dr. Ricardo Pérez-Tomás, Dept. Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Campus Bellvitge, Universitat de Barcelona, Pavelló Central, 5a planta. LR 5.1, C/ Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet (Barcelona), Spain. email: rperez@bell.ub.es

Prodigiosin-induced apoptosis in gastric cancer

1991; Jonas et al., 1993). Other toxins like diphtheria toxin and exotoxin A inhibit protein synthesis, causing apoptosis in eukaryotic cells (Morimoto and Bonavida, 1992; Kochi and Collier, 1993). Verotoxin 1, the active component of the bacteriocin preparation from *Escherichia coli*, induces apoptosis in human cancer cell lines (Arab et al., 1998) and eliminates human astrocytoma xenografts (Arab et al., 1999).

A family of natural red pigments called prodigiosins are synthesised from different bacteria. Cycloprodigiosin hydrochloride (cPrG-HCl), undecylprodigiosin (UP) are members of this family for which immunosuppressive and apoptotic activities have been described (Kawauchi et al., 1997; Songia et al., 1997). Very recently, screening for anticancer agents *in vitro* in our laboratory led to the discovery that prodigiosin produced by *Serratia marcescens* 2170 triggered apoptosis in different cancer cell lines, behaving as a rapid, potent and selective drug (Montaner et al., "accepted for publication"). The fact that the antiproliferative effect of prodigiosin is p53-independent (Montaner et al., "accepted for publication") makes prodigiosin an interesting new antineoplastic candidate to study in cell culture cancer models. We decided to study the effect of prodigiosin in a human gastric cancer cell culture model for the following reasons: a) gastric cancer is the second cause of annual mortality worldwide, with over 600,000 deaths in 1990 (Pisani et al., 1999), b) gastric cancer cells have a low sensitivity to chemotherapy agents (Toge, 1999) and c) at present, chemotherapeutic choices are limited to 5-FU and the benefits in terms of tumor regression or improvement of symptoms are limited.

The purpose of this study was to analyse the effect of prodigiosin in the human gastric carcinoma cell line (HGT-1). We quantified the loss of viability by MTT assay; we also stained DNA with Hoechst 33342 for morphological identification of apoptotic cells and we studied the ladder pattern of DNA after agarose gel electrophoresis, which is a biochemical feature of apoptotic cells. Finally, we examined whether prodigiosin affected the actin cytoskeleton during apoptosis, and whether such an effect was reversible.

Materials and methods

Chemical and Reagents

Meat peptone was purchased from Difco (Detroit, Michigan, USA). Glycerol was bought from Merck (Darmstadt, Germany). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and Hoechst 33342 were purchased from Sigma Chemicals Co (St Louis, MO, USA). Deionized water further purified with a Millipore Milli-Q system (Bedford, MA) was used.

Cell lines and culture conditions

HGT-1 (clone 6) human gastric carcinoma cell line was a generous gift from C.L. Laboisie (Laboisie et al., 1982). Cells were cultured in DMEM, purchased from Biological Industries (Beit Haemek, Israel) and supplemented with 10% of heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 2mM L-glutamine (all from GIBCO BRL, Paisley, UK), at 37°C, 5% CO₂ in air.

Bacteria strain and culture conditions

S. marcescens 2170 environmental isolate is a wild-type strain that produces the characteristic pigment prodigiosin. *S. marcescens* 2170 was inoculated into 25 ml of peptone glycerol (PG) medium, containing 1% meat peptone and 10% glycerol in distilled water, and cultivated for 8 h at 30 °C with vigorous shaking, and 1 ml was then transferred to 250 ml of PG medium and cultivated for 48 h at 30 °C with vigorous shaking. Bacteria were then harvested by centrifugation at 6,800 x g for 15 minutes at 4 °C. Prodigiosin was extracted by shaking the pellet with acidic methanol (methanol:1N HCl (24:1)) and centrifuged at 2000 X g for 5 minutes at room temperature. The supernatant was evaporated under vacuum and the pigment was re-dissolved in DMSO, divided into aliquots and stored at -20°C.

Isolation and purification of prodigiosin

Prodigiosin was measured using the difference in absorption of the concentrated supernatant at 534 and 655 nm. A difference in absorbency of 1.0 between the two wavelengths is equivalent to 19.3 µg of prodigiosin per ml (Goldschmidt and Williams, 1968).

Furthermore, prodigiosin was purified as described previously (Montaner et al., "accepted for publication"). Briefly, after evaporation under

Prodigiosin-induced apoptosis in gastric cancer

vacuum of the acidic methanol solvent, atmospheric pressure liquid chromatography of the extract was performed on silica gel with chloroform and methanol as solvents. The eluted fractions were pooled and the chloroform/methanol extract was vacuum evaporated, re-dissolved in H₂O and lyophilized. The isolated pigment was re-dissolved in methanol and analyzed by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) using a VG-Quattro triple mass spectrometer (Micromass, VG-Biotech, UK). The isolated pigment was re-purified by subsequent semi-preparative HPLC on a Shimadzu instrument (Kyoto, Japan). A Nucleosil C₁₈ reversed-phase column (250 x 4 mm, 10µm) was used with a 0 % to 100 % linear gradient in 30 minutes (A: 10 mM ammonium acetate, pH 7.0, B: 100 % acetonitrile). The elution was monitored both using diode-array UV detector (SPD-M10AVP Shimadzu) and by ESI-MS. After repeated injections the pooled fractions containing the major peak were vacuum evaporated, re-dissolved in H₂O, lyophilized and characterized by ESI-MS and ¹H-NMR. ESI, m/z 324.4 (M+H)⁺, (C₂₀H₂₅N₃O requires 323.4381 (MW average)). ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz, ppm); 10.71 (m, NH), 8.54 (m, NH), 7.08 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.83 (m, 1H), 6.30 (m, 1H), 6.25 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.43 (t, 2H), 1.58 (s, 3H), 1.2-1.4 (m, 6H), 0.91 (t, 3H).

Cell viability assay

Cell viability was determined by the MTT assay (Mosmann, 1983). Briefly, 20x10³ cells were incubated in 96-well microtiter cell culture plates, in the absence (control cells) or in the presence of 0.5 to 4.0 µM of prodigiosin in a final volume of 100 µl. After 4 h. incubation, 10 µM of MTT (diluted in PBS) was added to each well for an additional 4 h. The blue MTT formazan precipitate was dissolved in 100 µl of isopropanol:1N HCl (24:1) and the absorbance at 550 nm was measured on a multiwell plate reader. Cell viability was expressed as a percentage of control. Data are shown as the mean value ± Standard Deviation of triplicate cultures.

Analysis of DNA Fragmentation

Analysis of DNA fragmentation by agarose gel electrophoresis was performed as described previously (Montaner et al., "accepted for publication"). Briefly, 1x10⁶ cells per 2ml were

exposed to 2µM of prodigiosin and incubated for 12 h. Cells were washed in PBS and resuspended in ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100). After incubating for 15 minutes at 4 °C, cell lysates were centrifuged at 14,000 x g for 15 min and the supernatants were treated with 0.2 mg/ml of proteinase K in a buffer containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 40 mM EDTA and 1% SDS, for 4 h at 37 °C. The DNA preparations were phenol/chloroform extracted twice and DNA was precipitated with 140 mM NaCl and two volumes of ethanol at -20 °C overnight. DNA precipitates were recovered by centrifugation at 14,000 x g for 10 minutes at 4 °C, washed twice in cool 70% ethanol and air dried. DNA pellets were resuspended in 15 µl of TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) and treated with DNase-free Rnase (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) for 1 h at 37 °C. 3.2 µl of 6X loading buffer was added to each tube and the DNA preparations were electrophoresed in 1% agarose gels containing ethidium bromide. Gels were placed on a UV light box to visualize the DNA ladder pattern.

Hoechst staining

Cell morphology was evaluated by fluorescence microscopy following Hoechst 33342 DNA staining. HGT-1 cells (4x10⁵ per ml) were incubated in the absence (control cells) or in the presence of 3µM of prodigiosin and incubated for 2 and 3 h. Cells were then washed in PBS and resuspended in PBS plus Hoechst 33342 to a final concentration of 2 µg/ml and incubated for 30 minutes at 37 °C in the dark. After incubation, cells were washed in PBS and the sections were examined with a Leitz Diaplan microscope and photographed with a Wild MPS 45 Photoautomat system. Apoptotic cells were identified by nuclear condensation, formation of membrane blebs and apoptotic bodies.

Analysis of actin microfilament organization

HGT-1 cells were cultured to 70% confluence over sterile coverslips introduced in plates. Cells were treated with 3µM of prodigiosin and incubated for 1, 2 and 3 h. respectively.

Coverslips with treated and non-treated cells were washed in PBS and fixed for 1h. in Bouin

Prodigiosin-induced apoptosis in gastric cancer

solution at room temperature. After several washes in PBS, cells were incubated for 5 min in 0.1% Triton X100. The coverslips were incubated with normal sheep serum for 1 h at room temperature and then for 2 h. with mouse monoclonal anti-actin (at a dilution of 1:400 in PBS-NaN₃-BSA from purchased liquid antisera; clone C4, ICN Biomedicals, Inc. cat. # 69100). Coverslips were rinsed in PBS and incubated for 1 h. in sheep IgG anti-mouse Ig conjugated with FITC (at a dilution of 1:100 in PBS) as secondary antibody (Boehringer Mannheim. Germany). Cells were examined with microscope and filter.

Results

Isolation and purification of prodigiosin from S. marcescens 2170

Prodigiosin was purified from *S. marcescens* 2170 by methanol/HCl extraction followed by silica gel chromatography and semipreparative reverse-phase HPLC. ESI-MS gave a molecular mass of 323.4 Da, consistent with the expected value for prodigiosin (C₂₀H₂₅N₃O). The structure of prodigiosin was further confirmed by high-field ¹H-NMR spectroscopy. We used the pigment extracted with acidic methanol from *S. marcescens* 2170, re-dissolved in DMSO, as a source of apoptotic activity in the human gastric carcinoma cell line.

Prodigiosin decreased the viability of gastric cancer cells

HGT-1 cells were incubated for 4 h. with doses of prodigiosin ranging from 0.5 to 4.0 μM, and cell viability was then determined by the MTT assay. A significant dose-dependent decrease in the number of viable cells was observed, with an IC₅₀ of 3.1 μM (Fig. 1A). The viability study of this cell line treated with prodigiosin at different times (4 to 24 h.) did not show differences (data not shown).

Prodigiosin induced apoptosis in gastric cancer cells

In order to determine whether this cytotoxic effect was due to apoptosis, we analyzed whether prodigiosin induced DNA fragmentation. Agarose gel electrophoresis of DNA showed the characteristic ladder pattern of apoptosis in HGT-1

cells incubated for 12 h. in the presence of 2 μM of prodigiosin (Fig. 1B).

We corroborated these results at microscopic level using Hoechst 33342 staining. In contrast to untreated cells, the apoptotic nuclei of HGT-1 gave stronger blue fluorescence and were condensed, and occasionally we saw holes in the nuclei of dead cells (Fig. 2). These results demonstrate that prodigiosin induces changes in nuclear morphology characteristic of apoptotic cell death.

Effect of prodigiosin on the organization of actin microfilaments

HGT-1 cells grew as monolayers of closely apposed polygonal cells with epithelial morphology. Most cells were mononuclear, but bi- and multinucleated cells were also observed.

Actin immunostaining showed a typical fiber network. Actin microfilaments were seen in a parallel pattern depending on the plane of focus and more concentrated around the nucleus (Fig. 3). Sometimes, punctate structures of non-filamentous actin were seen in the extensions of lamellipodia. Immunostaining appeared more intense at the point of contact between cells.

Treatment with 2 μM of prodigiosin caused progressive morphological changes. Within the first hour, cells which had previously been almost completely confluent had retracted and the plasma membrane started to ruffle (Fig. 3). By the second hour of treatment confluent cells had also begun to shrink, the cytoplasm almost disappeared and become rounded. In about 3 h, cells detached from plates and typical apoptotic bodies were seen at the boundaries of detached cells (Fig. 3).

Vesicles observed within the cytoplasm of treated cells were densely stained with anti-actin antibodies. Apoptotic bodies of rounded detached cells were stained (Fig. 3).

We also saw many rounded cells with ray-like immunostaining, indicating the formation of numerous filopodia or perhaps microvilli (data not shown). Retraction of the cytoplasm was accompanied by condensation of the immunostaining around the nucleus of these cells, which may have come from non-confluent regions of plates. When the cells were exposed to prodigiosin for 2 h, washed in PBS and treated with the culture medium without prodigiosin, they began to grow and attach to the substratum (data not shown). These results demonstrate that the

effect of prodigiosin on HGT-1 cells was reversible.

These results indicate that cells treated with prodigiosin detached from the substratum. This induced the reorganization of actin microfilament architecture, and cells died by apoptosis.

Discussion

We have recently reported the apoptotic effect of prodigiosin synthesized by *S. marcescens* 2170 on several human cancer cell lines like Jurkat, NSO, HL-60, Ramos (all of hematopoietic origin), SW-620, and DLD-1 (human colon origin), but not in non-malignant cells like NIH-3T3, Swiss-3T3 and MDCK (Montaner et al., "accepted for publication"). Here we extend our study of prodigiosin-induced apoptosis to the human gastric carcinoma cell line (HGT-1) and we examine the possibility that actin microfilaments could be a target of this molecule.

The prevention of neoplasia by agents of bacterial origin that inhibit cancer cell proliferation and with no appreciable toxicity for normal cells is an attractive prospect. In this connection, a family of natural red pigments called prodigiosins, which are synthesized from bacteria, have been described. Cycloprodigiosin hydrochloride (cPrG-HCl) and Prodigiosin 25-C (UP) are reported to have immunosuppressive and apoptotic effects (Kawauchi et al., 1997; Songia et al., 1997). For a third member, prodigiosin, Han et al., (1998) described T-cell specific immunosuppression but no data were reported on the involvement of prodigiosin in apoptotic cell death in human gastric carcinoma. Here we demonstrate that apoptotic cell death is induced in the human gastric carcinoma cell line HGT-1. Analysis of actin cytoskeleton in HGT-1 with FITC-conjugated actin revealed that actin filaments of cells that were not treated with prodigiosin were organized into a dense, dynamic meshwork of actin fibers, whereas the actin fibers of prodigiosin-treated cells were either disorganized, disassembled, or disrupted. These observations suggest that prodigiosin promotes the breakdown of actin microfilament and this is the first demonstration that prodigiosin causes the reorganization of actin cytoskeleton. Arguably, it may be difficult to assess whether cleavage of a particular protein substrate is part of the endogenous cell death programme, or an unrelated consequence of the lethal stimulus. However, Levee et al., (1996) suggest that reorganization of

the microfilament network is necessary for the formation of apoptotic bodies, and depolymerization of F-actin may also be necessary for apoptosis.

Mgbonyebi et al., (1999) suggest that cdk inhibitors like roscovitine may be involved in cytoskeletal regulation, by reducing the polymerization of actin microfilaments. We have demonstrated that prodigiosin causes the reorganization of actin cytoskeleton and may promote the breakdown of actin microfilaments. These findings combined with our previous observations of inhibition of cdk2 activity in prodigiosin-treated cells (unpublished data) indicate that prodigiosin follows the same mechanism as roscovitine.

During the past few years, new compounds like cytochalasins, lantrunculins, jasplakinolide, swinholide A and inhibitors of farnesyltransferase (Cooper, 1987; Senderowicz, 1995; Bubbs et al., 1995; Ayscough et al., 1997; Gibbs et al., 1997), all of natural origin, have been found to modulate actin polymerization and dynamics, often by unique mechanisms (Jordan and Wilson, 1998). These molecules, together with prodigiosin, are likely to become valuable tools for the analysis of actin dynamics and functions in cells. Because they inhibit cell proliferation, they or their derivatives have potential as chemotherapeutic agents in the treatment of cancer.

Interestingly, prodigiosin induces apoptosis in Jurkat and HL-60 cells, both of which are p53 deficient (Montaner et al., "accepted for publication"). *Bcl-2* is an important gene product in the regulation of programmed cell death, acting as a suppressor (Korsmeyer, 1999). However, prodigiosin induced apoptosis in a Jurkat cell line stably transfected with *Bcl-2* with the same efficiency as in Jurkat cells with normal *Bcl-2* expression (unpublished data). Oncogenesis is often associated with defects in p53 or with high expression of antiapoptotic genes, such as *Bcl-2* family members. As prodigiosin-induced apoptosis is p53-independent and it is not protected by *Bcl-2*, this could mean an advantage over other chemotherapeutic drugs (Bunz et al., 1999).

The elucidation of the mechanisms involved in the apoptotic action of prodigiosin and its evaluation as a possible anticancer drug warrants further investigation.

Acknowledgments. We wish to thank Dr. E. Giralt, Marc Martinell and Dr. M. Vilaseca (Organic Chemistry Dept.

Prodigiosin-induced apoptosis in gastric cancer

and Mass Spectrometry Unit. University of Barcelona) for excellent technical assistance in purify prodigiosin and helpful discussion and Jordi Capella for the medical illustration assistance.

References

- Arab S., Murakami M., Dirks P., Boyd B., Hubbard S., Lingwood D. and Rutka, J. (1998). Verotoxins inhibit the growth of and induce apoptosis in human astrocytoma cells. *J. Neurol. Oncol.* 40, 137-150.
- Arab S., Rutka J. and Lingwood C. (1999). Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, long-term elimination of human astrocytoma xenografts in nude mice. *Oncol. Res.* 11, 33-9.
- Ayscough K.R., Stryker J., Pokala N., Sanders M., Crews P. and Drubin D.G. (1997). High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor lantruculin-A. *J. Cell Biol.* 137, 399-416.
- Bubb M.R., Spector I., Berhsadsky A.D. and Korn E.D. (1995). Swinholid A is a microfilament disrupting marine toxin that stabilizes actin dimers and severs actin filaments. *J. Biol. Chem.* 270, 3463-3466.
- Bunz F., Hwang P.M., Torrance C., Waldman T., Zhang Y., Dillehay L., Williams J., Lengauer C., Kinzler K.W. and Vogelstein B. (1999). Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J. Clin. Invest.* 104, 263-69.
- Cameron R. and Feuer, G. (2000). Molecular cellular and tissue reactions of apoptosis and their modulation by drugs. In: Apoptosis and its modulation by drugs. 1 ed. Cameron R. and Feuer G. (eds). Springer-Verlag, New York. pp 37-57.
- Cooper J.A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 105, 1473-1477.
- Gibbs J. and Oliff A. (1997). The potential of farnesyltransferase inhibitors as cancer chemotherapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 143-166.
- Goldschmidt M.C. and Williams R.P. (1968). Thiamine-induced formation of the monopyrrole moiety of prodigiosin. *J. Bacteriol.* 96, 609-616.
- Han S.B., Kim H.M., Kim Y.H., Lee C.W., Jang E.S., Son K.H., Kim S.U. and Kim Y.K. (1998). T-cell specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia marcescens*. *Int. J. Immunopharmacol.* 20, 1-13.
- Hannun Y.A (1997). Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* 89, 1845-1853.
- Hildebrand A., Pohl M. and Bhakdi S. (1991). *Staphylococcus aureus* α -toxin: dual mechanisms of binding to target cells. *J. Biol. Chem.* 266, 17195-17200.
- Inada T., Ichikawa A., Kubota T. Ogata Y., Moosa A.R. and Hoffman R.M. (1997). 5-FU-induced apoptosis correlates with efficacy against human gastric and colon cancer xenografts in nude mice. *Anticancer Res.* 17, 1965-1971.
- Jonas D., Schultheis B., Klas C., Krammer P.H., Bhakdi S. (1993). Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes. *Infect. Immun.* 61, 1715-1721.
- Jordan M. A. and Wilson L. (1998). Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10, 123-130.
- Kawauchi K., Shibutani K., Yagisawa H., Kamata H., Nakatsuji S., Anzai H., Yokoyama Y., Ikegami Y., Moriyama Y. and Hirata, H. (1997). A possible immunosuppressant, cycloprodigiosin hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 237, 543-547.
- Kelsen D.P. (1996). Adjuvant and neoadjuvant therapy for gastric cancer. *Semin. Oncol.* 23, 379-389.
- Kerr J.F.R, Winterford C.M. and Harmon B.V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73, 2013-2026.
- Kochi S.K. and Collier R.J. (1993). DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis. *Exp. Cell Res.* 208, 296-302.
- Korsmeyer S.J. (1999). *BCL-2* gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.* 59, 1693-700.
- Laboisie C.L., Augeron C., Couturier-Turpin M.H., Gerspach C., Cheret A.M. and Potet F. (1982). Characterization of a newly established human gastric cancer cell line HGT-1 bearing histamine H2-receptors. *Cancer Res.* 42, 1541-1548.
- Levee M.G., Dabrowska M.I., Lelli J.L. and Hinshaw D. (1996). Actin polymerization and depolymerization during apoptosis in HL-60 cells. *Am. J. Physiol.* 271, C1981-C1992.
- Lokich J. (1998). Infusional 5-FU: historical evolution, rationale, and clinical experience. *Oncology* 12, 19-22.
- Mangan D.F., Taichman N.S., Lally E.T. and Wahl S.M. (1991). Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. *Infect. Immun.* 56, 3267-3272.
- Mgbonyebi O.P., Russo J. and Russo I. H. (1999). Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res.* 59, 1903-1910.
- Morimoto H. and Bonavida B. (1992). Diphtheria toxin and pseudomonas A toxin mediated apoptosis. *J. Immunol.* 149, 2089-2094.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.* 65, 55-63.
- Pisani P., Parkin D.M., Bray F. and Ferlay J. (1999). Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer* 83, 18-29.
- Raff M.C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397-400.
- Ross P.J., Rao S. and Cunningham D. (1998). Chemotherapy of oesophago-gastric cancer. *Path. Oncol. Res.* 4, 87-95.
- Senderowicz A.M., Kaur G., Sainz E., Laing C., Inman W.D., Rodriguez J., Crews P., Malspeis L., Grever M.R. and Sausville E.A. (1995). Jaspilkinolide's inhibition of the growth of prostate carcinoma cells *in vitro* with disruption of the actin cytoskeleton. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 46-51.

Prodigiosin-induced apoptosis in gastric cancer

Songia S., Mortellaro A., Taverna S., Fornasiero C., Scheiber E.A., Erba E., Colotta F. Mantovani A., Isetta A.M. and Golay J. (1997). Characterization of the new immunosuppressive drug undecylprodigiosin in human lymphocytes. *J. Immunol.* 158, 3987-3995.

Toge T. (1999). Effectiveness of immunochemotherapy for gastric cancer: a review of the current status. *Semin. Surg. Oncol.* 17, 139-43.

Vaux D.L., Haecker G. and Strasser, A. (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76, 777-779.

Zychlinsky A. and Santonetti P. (1997). Apoptosis in bacterial pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 100, S63-S65.

Accepted September 8, 2000

Figure legends

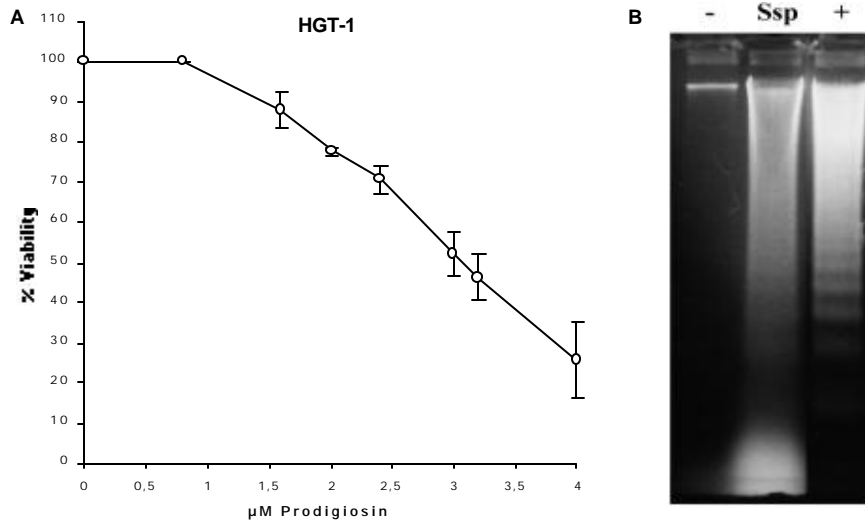


Figure 1. (A) Cell viability in prodigiosin-treated cells. The data were obtained from the treat of HGT-1 cell line with 0.5 to 4.0 μM of prodigiosin for 4 h. Cell viability was determined by the MTT assay and is expressed as a percentage with respect to control cells. The results are from the assay of three independent experiments. **(B)** Induction of DNA fragmentation by prodigiosin. HGT-1 cells were untreated (-) or incubated (+) for 12 h. with 4 μM of prodigiosin. HGT-1 cells were treated with 1 μM of staurosporine (Ssp) as a positive control. The fragmented DNA was extracted and analyzed by agarose gel electrophoresis.

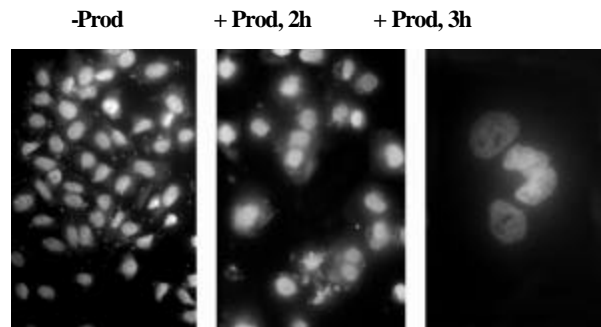


Figure 2. Fluorescence microscopic analysis of HGT-1 nuclei with Hoechst 33342 staining. Nuclear morphology of cells untreated (control) or treated with 3 μM of prodigiosin for 2 and 3 h. Apoptotic nuclei are condensed and smaller (X200, X200 and X500 respectively).

Prodigiosin-induced apoptosis in gastric cancer

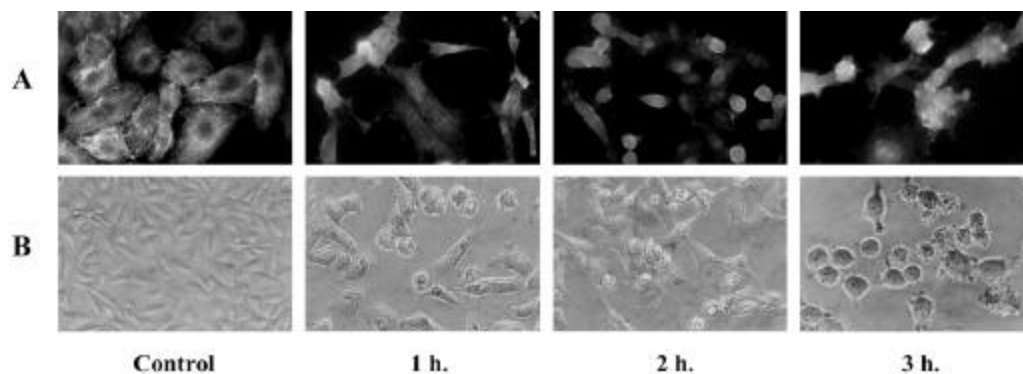


Figure 3. Morphology of cells untreated (control) or treated with 3 μ M of prodigiosin for 1, 2 and 3 h. (A) Actin immunostaining of untreated cells (control) was observed as an intense and diffuse pattern evenly distributed within the cell (X200). In treated cells the actin immunostaining was confined around the nucleus, and 3h after treatment vesicles were observed within the cytoplasm showing intense actin immunostaining. (X160, X160 and X160 respectively). (B) Confluent cells of untreated cells (control) showed a morphological changes after prodigiosin treatment; the cytoplasm had almost disappeared and the cells were smaller and rounded. After 3 h in culture, the cells had completely detached from plates and the plasma membrane was ruffled. (X60, X130, X130 and X130 respectively).

Activation of protein kinase C for protection of cells against apoptosis induced by the immunosuppressor prodigiosin

Beatriz Montaner Ramoneda, Ricardo Pérez-Tomás*

*Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Cancer Cell Biology Research Group,
Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet, Barcelona, Spain*

Received 24 April 2001; accepted 2 October 2001

Abstract

Prodigiosin (PG) is a red pigment produced by *Serratia marcescens* with immunosuppressive activity. We had recently shown that PG-induced apoptosis in several cancer cell lines including Jurkat-T cells, while acting rapidly, potently and with no marked toxicity in non-malignant cells. Here we examine the role of protein kinase C (PKC) in the regulation of apoptosis triggered by PG. We evaluated the use of phorbol-myristate acetate (PMA) in the inhibition of apoptosis induced by PG in Jurkat-T cells by using FACS analysis of the phosphatidylserine externalisation, Hoechst 33342 staining and fragmentation pattern of DNA as well as proteolysis of poly-(ADP) ribose polymerase (PARP). The anti-apoptotic effect of PMA was accompanied by phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). Pretreatment of cells with MEK inhibitor PD98059 inhibited PMA-induced phosphorylation of ERK1/2 and the cytoprotective ability of PMA. These results suggest that activation of PKC in Jurkat-T cells confer protection against apoptosis induced by PG and that ERK1/2 mediate anti-apoptotic PKC signaling. © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Apoptosis; Cancer; Chemotherapy; Protein kinase C; Phorbol ester; Prodigiosin

1. Introduction

Apoptosis, also known as programmed cell death, is responsible for the removal of cells from healthy tissue during development and tissue homeostasis [1,2]. Apoptosis malfunctions can have health implications, as in cancer. Radiation and chemotherapy have been shown to cause cell death by apoptosis [3,4].

Several bacterial pathogens have been identified as mediators of apoptosis [5]. A family of natural red pigments called PG, which are synthesized from different bacteria characterized by a common pyrrolylpyrromethane skeleton have been seen to possess interesting immunosuppressive properties [6–9] and apoptotic effects in cancer cell lines [10–17].

PKC is a well known serine/threonine protein kinases, consisting of three groups, cPKC (α , β , β_2 and γ), nPKC (δ , ϵ , η and θ) and aPKC (ζ , ι and λ), and it is involved in many cellular functions, such as proliferation and differentiation. PKC also participates in the regulation of apoptosis induced by many stimuli, such as tumor necrosis factor α (TNF α), ionising irradiation and anti-tumor drugs [18–20]. However, the regulatory effect of PKC on apoptosis is still controversial. Several reports demonstrate that activators of PKC such as the tumor-promoter PMA inhibit apoptosis [20–24], whereas others have shown that pharmacological inhibition of PKC activity inhibits apoptosis [25–28]. As with other molecules, the role of PKC depends on the cell type, the state of activation of the cell, the phase of the cell cycle and the nature of the agent being used. Further studies demonstrated that ERK1/2 mediates the anti-apoptotic signaling of PKC [29–31].

In this study, we investigated the role of ERK signaling in the regulation of apoptosis induced by PG in Jurkat-T cells. Cells treated with PG underwent phosphatidylserine translocation to the external leaflet of the cell membrane and DNA fragmentation characteristic of apoptosis. PMA, a phorbol ester that stimulates PKC activity, was protective

* Corresponding author. Tel.: +34-93-4024288; fax: +34-93-4024213.

E-mail address: rperez@bell.uib.es (R. Pérez-Tomás).

Abbreviations: cPrG-HCl, cycloprodigiosin hydrochloride; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FCS, fetal calf serum; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PARP, poly-(ADP) ribose polymerase; 4 α -PDD, 4 α -phorbol-12,13-didecanoate; PG, prodigiosin; PI, propidium iodide; PKC, protein kinase C; PMA, phorbol-myristate acetate; UP, uncedylprodigiosin.

62 against PG-induced apoptosis and this apoptotic effect was
63 reversible when PMA was used in conjunction with the
64 MEK inhibitor, PD98059. Therefore, we conclude that the
65 anti-apoptotic effects of PMA in Jurkat cells are mediated
66 in part through ERK activation.

67 2. Materials and methods

68 2.1. Chemical and reagents

69 PG was isolated and stored at -80° as described [15].
70 PMA and 4α -phorbol-12,13-didecanoate (4α -PDD) were
71 purchased from Sigma (St Louis, MO, USA), and
72 PD98059 was obtained from Alexis (Alexis Biochemicals,
73 San Diego, USA).

74 2.2. Cells and cell culture

75 Human T cell acute leukemia cells (Jurkat clone E6-1)
76 from ATCC (VA, USA) were maintained in RPMI-1640
77 medium (Biological Industries, Beit Haemek, Israel), sup-
78 plemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL
79 penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (all from GIBCO
80 BRL, Paisley, UK), and 2 mM L-glutamine (Sigma), and
81 grown at 37° in 5% CO_2 .

82 2.3. Detection of apoptosis by flow cytometric analysis

83 Jurkat cells were exposed to 55 and 275 nM PG in the
84 absence or presence of PMA (50 nM) for 4 hr. PMA was
85 added 30 min before PG administration. Exposure of
86 phosphatidylserine was quantified by surface annexin V-
87 FITC (Bender MedSystems, Boehringer Mannheim, Man-
88 nheim, Germany) staining as described previously [15].
89 Briefly, cultured cells (5×10^5 cells/mL) were washed in
90 PBS and resuspended in 200 μ L binding buffer (BB),
91 containing 10 mM Hepes/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl
92 and 2.5 mM CaCl_2 , plus 0.6 μ L of annexin V-FITC Kit and
93 incubated for 30 min at room temperature (RT) in the dark.
94 After incubation, we added 200 μ L BB and propidium
95 iodide (PI) to a final concentration of 5 μ g/mL. Cells were
96 analyzed using a Becton Dickinson FACS Calibur flow
97 cytometer (Mountain View, CA). Samples were acquired
98 and analyzed using Cell Quest software and data were
99 analyzed with the Paint-a-gate Pro software (Becton Dick-
100 inson).

101 2.4. Detection of apoptosis by DNA fragmentation

102 Jurkat cells (5×10^5 cells/mL) were exposed to 200 nM
103 PG in the absence or presence of PMA (50 nM) and/or
104 PD98059 (100 nM) for 4 hr. PMA and/or PD98059 were
105 added 30 min before PG administration. Briefly, cells were
106 incubated in ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4,
107 1 mM EDTA, 0.2% Triton X-100) for 15 min at 4° . Then,

cell lysates were centrifuged at 14,000 g for 15 min and the
supernatants were treated with 0.2 mg/mL of proteinase K
in a buffer containing 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH
8.0, 40 mM EDTA and 1% SDS, for 4 hr at 37° . The DNA
preparations were phenol/chloroform extracted and DNA
was precipitated. DNA pellets were resuspended in TE
(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) and treated with
DNase-free RNase (Boehringer Mannheim, Mannheim,
Germany) for 1 hr at 37° . Finally, samples were electro-
phoresed in a horizontal 1% agarose gel containing ethi-
dium bromide and visualized under UV illumination [15].

2.5. Electrophoresis and Western blot analysis

For detection of ERK1/2, the phosphorylation of ERK1/
2 and the PARP cleavage by Western blot, cells were
exposed to 200 nM of PG in the absence or presence of
PMA (50 nM) and/or PD98059 (100 nM) for 3 hr. PMA
and/or PD98059 were added 30 min before PG adminis-
tration. Cells were washed in PBS and lysed with Laemmli
sample buffer [32] and 50 μ g protein extracts were elec-
trophoresed on 12% polyacrylamide gel and transferred to
Immobilon-P (Millipore, MA, USA) membrane. Blots
were blocked in 5% dry milk diluted in TBS-T (50 mM
Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) for 1 hr
and then incubated overnight with mouse monoclonal
antibody (mm) or rabbit polyclonal antibody (rp) anti-
serum according to the manufacturer's instructions: anti-
phospho-ERK1/2 (New England BioLabs Inc., E10-9106,
mm, diluted 1:1000), anti-ERK1 (Santa Cruz Biotechnol-
ogies (SCB), CA, USA, K23 sc-94-G, rp, diluted 1:200),
anti-ERK2 (SCB, C14 sc-154-G, rp, diluted 1:200), and
anti-PARP (Boehringer Mannheim, ref. 1-835-238, rp,
diluted 1:1000). Secondary antibodies conjugated to
HRP were goat anti-rabbit IgG (BioRad, UK, ref. 170-
6515) or goat anti-mouse (BioRad, ref. 170-6516), diluted
1:1000 in 5% dry milk-TBS-T for 1 hr at RT. Between each
incubation, blots were washed 3×5 min in 5% dry milk-
TBS-T. After washing blots in TBS-T 3×5 min, perox-
idase was then developed by incubating the membrane with
2.25 mM luminol (Sigma) and 0.45 mM *p*-iodophenol
(Fluka, Buchs, Switzerland) in 50 mM Tris-HCl pH 9.0
plus 0.03% H_2O_2 for 1 min at RT and enhanced chemilu-
minescence in an autoradiography film.

2.6. Hoechst staining

Cell morphology was evaluated by fluorescence micro-
scopy following Hoechst 33342 DNA staining. Jurkat cells
(5×10^5 cells/mL) were exposed to 200 nM PG in the
absence or presence of PMA (50 nM) and/or PD98059
(100 nM), or in presence of 4α -PDD (50 nM) for 4 hr.
PMA, 4α -PDD and PD98059 were added 30 min before
PG administration. Cells were then washed in PBS and
incubated with Hoechst 33342 (2 μ g/mL) for 30 min at 37°
in the dark. Finally, cells were washed again and the

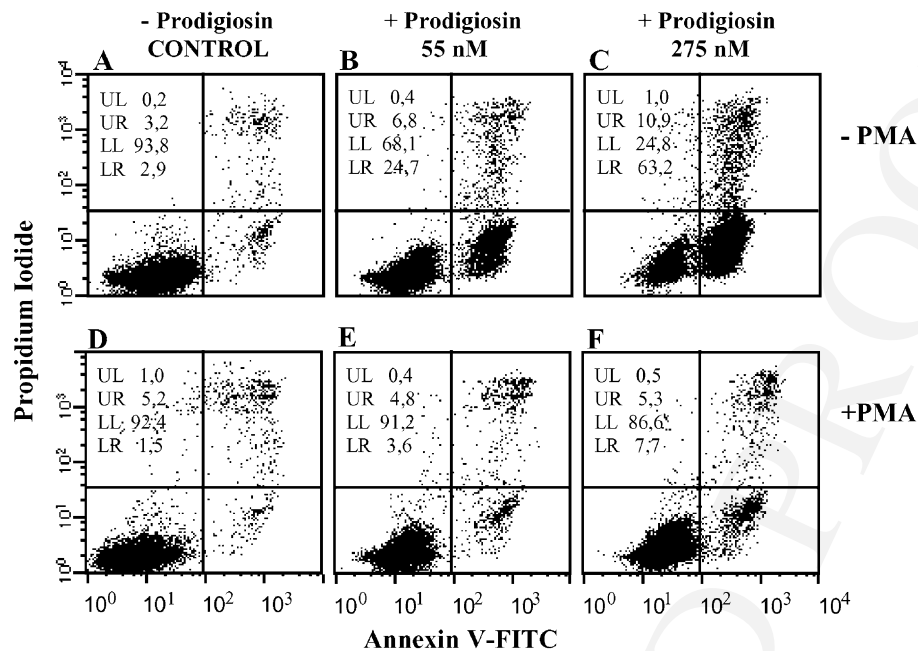


Fig. 1. Involvement of PKC in the regulation of apoptosis induced by PG. A representative annexin-V/IP assay of three independent experiments with Jurkat is shown. Cells staining was analyzed using the Becton Dickinson FACS Calibur flow cytometer as described in Section 2. (A) Control cells. (B, C) Cells were incubated with 55 and 275 nM PG, respectively. (D) Cells were incubated with 50 nM PMA. (E, F) Cells were incubated with 55 and 275 nM PG, respectively in the presence of 50 nM PMA. Cells (5×10^5 cells/mL) were exposed to 55 and 275 nM PG in the absence or presence of PMA (50 nM) for 4 hr. PMA was added 30 min before PG administration. Exposure of phosphatidylerine was quantified by surface annexin V-FITC staining.

160 sections were examined with a Leitz Diaplan microscope
 161 and photographed with a Wild MPS 45 Photoautomat
 162 system.

163 3. Results

164 It has been reported that the alteration of the PKC
 165 activity is associated with modulation of apoptosis induced
 166 by a variety of stimuli [30,33]. We were interested in
 167 determining whether PKC is involved in the regulation
 168 of apoptosis induced by PG.

169 Preliminary experiments determined that the IC_{50} was
 170 225 nM of PG that induced apoptosis in Jurkat cells [15].
 171 We incubated Jurkat cells with 0, 55 and 275 nM of PG for
 172 4 hr. The mean values of the early apoptotic populations
 173 ($IP^-/annexin V^+$ cells) were 3 ± 1 , 28 ± 4 and $64 \pm 2\%$,
 174 respectively (Fig. 1). Afterward, in order to demonstrate
 175 the effect of PKC on PG-induced apoptosis, we first
 176 examined the effect of PMA, a potent PKC activator.
 177 When cells were incubated with 0, 55 and 275 nM of
 178 PG in the presence of 50 nM of PMA, the mean values of
 179 the early apoptotic population were 2 ± 1 , 3 ± 0.4 and
 180 $6 \pm 2\%$, respectively (Fig. 1). These results show that PMA
 181 inhibits the apoptotic action of PG.

182 Since PMA activates PKC and stimulates the Raf/MEK/
 183 ERK signal transduction pathway, we postulated that this
 184 pathway contributes to PMA ability to inhibit PG-induced
 185 apoptosis. Fig. 2 shows that cells treated for 4 hr with
 186 200 nM of PG produced internucleosomal DNA fragments

or “ladders” (Fig. 2A, lane 3), whereas cells treated for
 30 min with 50 nM PMA did not (Fig. 2A, lane 4).

187
 188
 189 Since the activation of ERK has been reported to play an
 190 anti-apoptotic role in several systems [29,30,33], we won-
 191 dered whether the anti-apoptotic action conferred by PMA
 192 was due to the activation of ERK pathway. To test this
 193 possibility we investigated the effect of the specific MEK
 194 inhibitor, PD98059. This inhibitor did not induce inter-
 195 nucleosomal DNA fragmentation when used alone
 196 (Fig. 2A, lane 6). As seen in lane 4 of Fig. 2A, PMA
 197 inhibited the appearance of PG-induced DNA fragmenta-
 198 tion whereas this inhibition was reversed in cells that were
 199 pretreated with PD98059 (Fig. 2A, lane 7).

200 To investigate the signaling mechanisms responsible for
 201 PD98059’s effects on apoptosis we used Jurkat cells
 202 untreated or treated with PG in presence or absence of
 203 PMA. While control cells showed an imperceptible base-
 204 line ERK1/2 phosphorylation (Fig. 2B, lane 1) pretreat-
 205 ment of cells with PMA-induced the phosphorylation of
 206 ERK1/2 (Fig. 2B, lane 2). This phosphorylation was
 207 abolished by MEK inhibitor PD98059 (Fig. 2B, lane 7),
 208 and partially abolished by PG (Fig. 2B, lane 4). These
 209 results indicate that activation of ERK1/2 is required for
 210 mediating the anti-apoptotic effect of PKC.

211 We corroborated these results with the PARP cleavage
 212 analysis on protein extracts by Western blot as an early
 213 specific marker of caspase activity. Jurkat cells were
 214 incubated with the dose of PG indicated above, which
 215 produced a cytotoxic effect, and with PMA and PD98059
 216 alone or in combination. The result of this experiment was

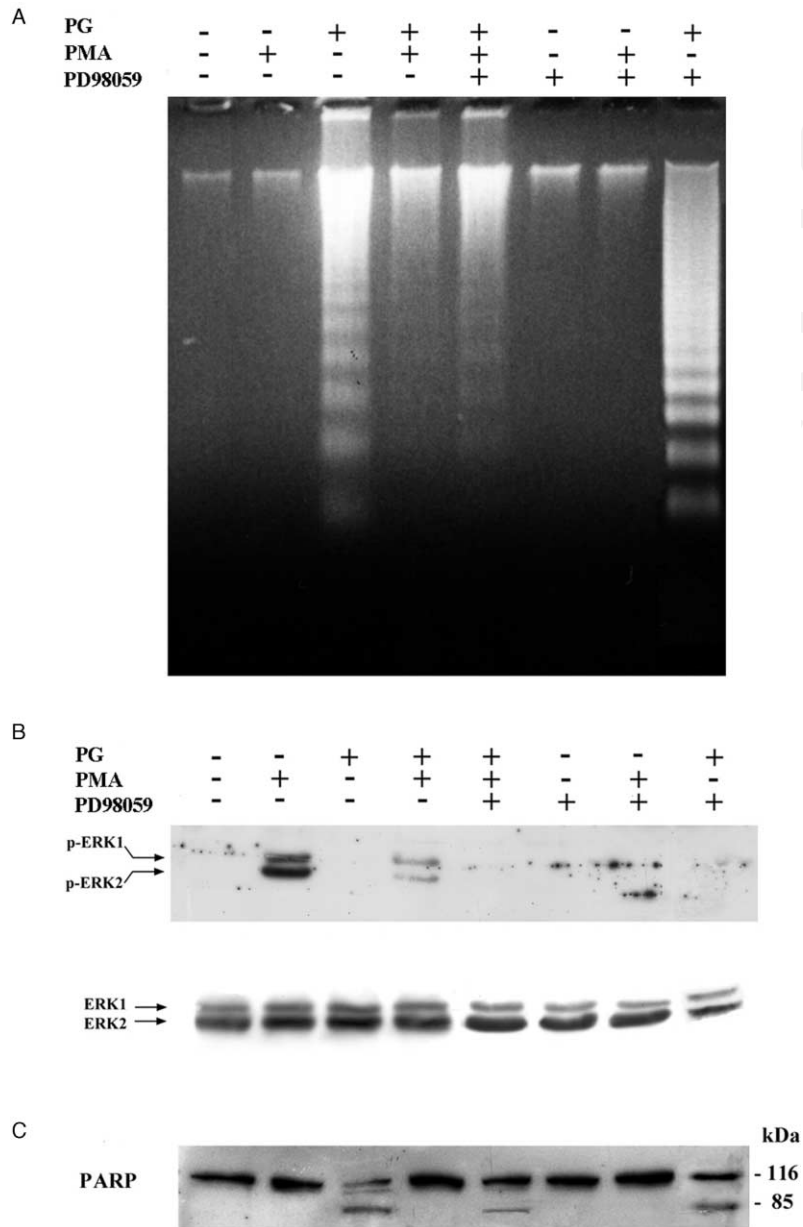


Fig. 2. Activation of PKC by PMA protects cells from PG-induced apoptosis. PD98059 inhibits PMA mediated ERK1/2 phosphorylation and abrogates the anti-apoptotic effect of PMA. (A) DNA fragmentation induced by PG was observed in the agarose gel electrophoresis. For this assay, 5×10^5 cells/mL were untreated, or treated with 200 nM of PG in the absence or presence of PMA (50 nM) and/or PD98059 (100 nM) for 4 hr. PMA and/or PD98059 were added 30 min before PG administration. (B) Phosphorylation of ERK1/2 or ERK1/2 was analyzed by Western blotting. Equal amounts of whole cell lysates (50 μ g) were electrophoresed. (C) Effect of PG on PARP cleavage. The positions of native PARP (116 kDa) and the proteolytic fragment (85 kDa) are indicated. In (B) and (C), cells (1×10^6 cells/mL) were untreated, or treated with 200 nM of PG in the absence or presence of PMA (50 nM) and/or PD98059 (100 nM) for 3 hr. PMA and/or PD98059 were added 30 min before PG administration. Results are representative of three independent experiments.

217 that only cells treated with PG showed the PARP cleavage
 218 (Fig. 2C). Furthermore, we confirmed these results at
 219 microscopic level using Hoechst 33342 staining. In con-
 220 trast to untreated cells, the apoptotic nuclei of Jurkat cells
 221 gave stronger blue fluorescence and were condensed and
 222 fragmented showing the typical apoptotic bodies (Fig. 3).
 223 However, when the cells were preincubated with PMA
 224 prior to the incubation with PG we did not observe any
 225 morphological changes indicative of apoptosis. In order to
 226 verify PKC involvement, prior to the incubation with PG

we treated Jurkat cells with 4 α -PDD, a phorbol ester
 227 derivative which does not activate PKC. The data in
 228 Fig. 3 show the typical apoptotic bodies in these cells.
 229

4. Discussion

230
 231 PG is produced by *S. marcescens* following a bifurcated
 232 biosynthesis pathway, in which mono- and bipyrrrole pre-
 233 cursors are obtained separately and then coupled to form

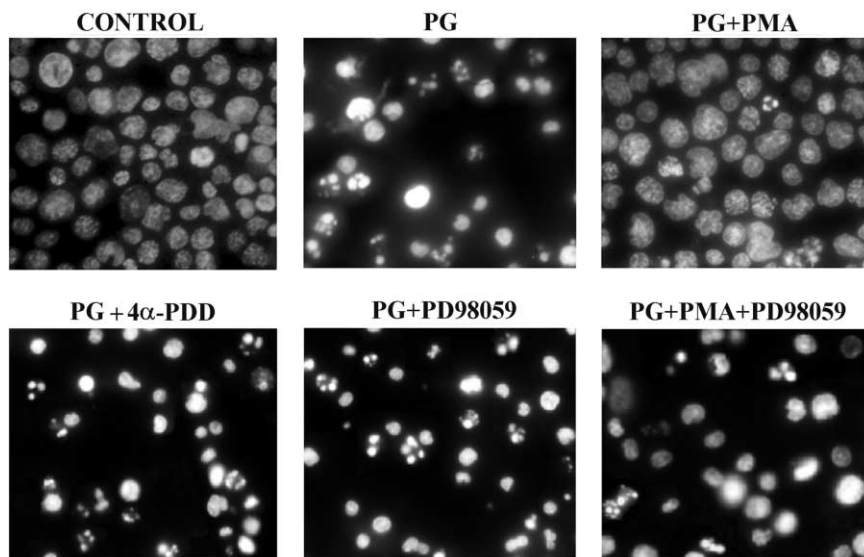


Fig. 3. Involvement of PKC in the regulation of apoptosis induced by PG. Fluorescence microscopic analysis of Jurkat nuclei with Hoechst 33342 staining. Cells (5×10^5 cells/mL) were untreated (control), treated with 200 nM of PG (PG) for 4 hr, treated with 200 nM of PG in the presence of PMA (50 nM) (PG + PMA), treated with 200 nM of PG in the presence of 4 α -PDD (50 nM) (PG + 4 α -PDD), treated with 200 nM of PG in the presence of PD98059 (100 nM) (PG + PD98059) or treated with 200 nM of PG in the presence of PMA (50 nM) and PD98059 (100 nM) (PG + PMA + PD98059). PG-treated cells showed apoptotic signs with chromatin condensation and nuclei fragmentation. The inactive phorbol ester 4 α -PDD had no effect in PG treated cells. The specific MEK inhibitor PD98059 inhibited the anti-apoptotic effect of PMA in PG treated cells. These results were reproduced three times.

234 the linear tripyrrole red pigment [34] during the stationary
 235 phase of bacterial growth [35]. Recently, screening for
 236 anticancer agents *in vitro* in our laboratory led to the
 237 discovery that PG triggered apoptosis in different cancer
 238 cell lines, while acting rapidly, potently and with no
 239 marked toxicity in non-malignant cell lines [15–17]. In
 240 this study, we have shown that activation of PKC by PMA
 241 suppresses PG-induced apoptosis in Jurkat and that the
 242 cytoprotective ability of PMA is associated with activation
 243 of ERK1/2.

244 The cytosolic pH in transformed or cancerous cells is
 245 generally regulated at neutral or even slightly more alka-
 246 line levels than normal cells [36] by a variety of pHi
 247 homeostatic machinery, including Na⁺/H⁺ exchanger,
 248 Na⁺-dependent and -independent Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers,
 249 V-ATPase, and others [37]. Moreover, Matsuyama *et al.*
 250 [38] hypothesized that changes in intramitochondrial and
 251 cytosolic pH may be the early events that modulate caspase
 252 activation during apoptosis. Therapeutic strategies exploit-
 253 ing the membrane proton gradient mentioned above have
 254 been proposed for specific tumor cell death [39,40]. Recent
 255 studies support the hypothesis that PG promote H⁺/Cl⁻
 256 symport and induce neutralization of the acidic compart-
 257 ment of cells which in turn results in acidification of the
 258 cytoplasm and thus cell cycle arrest and eventually apop-
 259 tosis [11,13,41,42]. This apoptosis triggering action by PG
 260 family members may explain why apoptosis can be inhib-
 261 ited by pretreatment of Jurkat cells with PMA, which
 262 prevents intracellular acidification through PKC-induced
 263 activation of the Na⁺/H⁺ antiport [39]. Moreover, incuba-
 264 tion of cells with imidazol, a cell permeable base, before
 265 apoptotic exposure to cycloprodigiosin hydrochloride

(cPrG-HCl) prevents intracellular acidification and sup- 266
 presses apoptosis [13]. 267

268 Our results presented here demonstrate that PMA inhi- 268
 bits PG-induced apoptosis in Jurkat cells through an ERK- 269
 dependent pathway. However, though cPrG-HCl sup- 270
 presses Jurkat proliferation as a result of apoptotic cell 271
 death, when the cells were stimulated by PMA the per- 272
 centage of dead cells increased [10]. Given these contra- 273
 dictory results it is tempting to speculate that the 274
 differences in the chemical structures of PG and cPrG-HCl 275
 are responsible for these different effects in these cells and 276
 thus the results shown by Kawauchi *et al.* [10] with 277
 cPrG-HCl plus PMA require further investigation. 278

279 It has been proposed that activation of the ERK pathway 279
 prevents apoptosis and promotes cellular survival [29,31]. 280
 This hypothesis has been supported by the results presented 281
 here, which demonstrate that PMA inhibits the PG-induced 282
 apoptosis in Jurkat cells through an ERK-dependent path- 283
 way. Furthermore, the expression of p21 selectively inhibits 284
 the stress-activated protein kinases (SAPK) group of MAP 285
 kinases activated in response to a variety of cellular stresses, 286
 including DNA damage. Interestingly, p21 does not inhibit 287
 the ERK group of MAP kinases involved in proliferation, 288
 differentiation, etc. Jurkat cell activation by PMA was 289
 accompanied by the induction of p21. This induction 290
 was almost completely abolished by PG (data not shown). 291
 Taking these results together, we considered the possibility 292
 that PMA not only activates ERK1/2 but may also induce 293
 p21, and that p21, by inhibiting SAPK, may participate in 294
 promoting cell survival. 295

296 In conclusion, the studies presented here illustrate the 296
 importance of MAP kinase signaling cascades in the 297

298 differential response to mitogens and apoptotic inducers.
 299 Specifically, ERK activity confers protection from apop-
 300 tosis in the presence of an apoptotic inducer. This was
 301 evidenced by the fact that the anti-apoptotic effects of
 302 PMA were abrogated by inhibiting PKC or MEK1, two
 303 enzymes necessary for PMA-induced ERK activation.

304 Acknowledgments

305 This work was supported by a grant from the Marató de
 306 TV3 (ref. no. 001510). The authors thank E. Giralt, Marc
 307 Martinell and M. Vilaseca (Organic Chemistry Department
 308 and Mass Spectrometry Unit, University of Barcelona) for
 309 excellent technical assistance in purifying PG, Jordi
 310 Capella for the medical illustration assistance and Con-
 311 stanza Alcaraz for library assistance.

References

313 [1] Raff MC. Social controls on cell survival and cell death.
 314 Nature 1992;356:397–400.
 315 [2] Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on
 316 apoptosis. Cell 1994;76:777–9.
 317 [3] Inada T, Ichikawa A, Kubota T, Ogata Y, Moosa AR, Hoffman RM. 5-
 318 FU-induced apoptosis correlates with efficacy against human gastric
 319 and colon cancer xenografts in nude mice. Anticancer Res 1997;
 320 17:1965–71.
 321 [4] Cameron R, Feuer G. Molecular cellular and tissue reactions of
 322 apoptosis and their modulation by drugs. In: Cameron R, Feuer G,
 323 editors. Apoptosis and its modulation by drugs. Berlin: Springer,
 324 2000. p. 37–57.
 325 [5] Zychlinsky A, Santonetti P. Apoptosis in bacterial pathogenesis. J
 326 Clin Invest 1997;100:S63–5.
 327 [6] Tsuji RF, Magae J, Jamashita M, Nagai K, Yamasaki M. Immunom-
 328 odulating properties of prodigiosin 25-C, an antibiotic which preferen-
 329 tially suppresses cytotoxic T cells. J Antibiot 1992;45:1295–302.
 330 [7] Songia S, Mortellaro A, Taverna S, Fomasiero C, Scheiber EA, Erba E,
 331 Colotta FM, Mantovani A, Isetta AM, Golay J. Characterization of the
 332 new immunosuppressive drug undecylprodigiosin in human lympho-
 333 cytes. J Immunol 1997;158:3987–95.
 334 [8] Mortellaro A, Songia S, Gnocchi P, Ferrari M, Fornasiero C,
 335 D'Alessio R, Isetta A, Colotta F, Golay J. New immunosuppressive
 336 drug PNU156804 blocks IL-2-dependent proliferation and NF-kappa
 337 B and AP-1 activation. J Immunol 1999;162:7102–9.
 338 [9] Han SB, Kim HM, Kim YH, Lee CW, Jang ES, Son KH, Ki SU,
 339 Kim YK. T cell specific immunosuppression by prodigiosin isolated
 340 from *Serratia marcescens*. Int J Immunopharmacol 1998;20:1–13.
 341 [10] Kawauchi K, Shibutani K, Yagisawa H, Kamata H, Nakatsuji S,
 342 Anzai H, Yokoyama Y, Ikegami Y, Moriyama Y, Hirata H. A
 343 possible immunosuppressant, cycloprodigiosin hydrochloride, ob-
 344 tained from *Pseudoalteromonas denitrificans*. Biochem Biophys
 345 Res Commun 1997;237:543–7.
 346 [11] Yamamoto C, Takemoto H, Kuno K, Yamamoto D, Tsubura A,
 347 Kamata K, Hirata H, Yamamoto A, Kano H, Seki T, Inoue K.
 348 Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H⁺/Cl⁻ symporter, induces
 349 apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines *in vitro*
 350 and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in
 351 nude mice. Hepatology 1999;30:894–902.
 352 [12] Azuma T, Watanabe N, Yagisawa H, Hirata H, Iwamura M,
 353 Kobayashi Y. Induction of apoptosis of activated murine splenic T

cells by cycloprodigiosin hydrochloride, a novel immunosuppressant. 354
 Immunopharmacology 2000;46:29–37. 355
 [13] Yamamoto D, Kiyozuka Y, Uemura Y, Yamamoto C, Takemoto H, 356
 Hirata H, Tanaka K, Hioki K, Tsubura A. Cycloprodigiosin 357
 hydrochloride, a H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human 358
 breast cancer cell lines. J Cancer Res Clin Oncol 2000;126:191–7. 359
 [14] Lee MH, Kataoka T, Honjo N, Magae J, Nagai K. In vivo rapid 360
 reduction of alloantigen-activated CD8⁺ mature cytotoxic T cells by 361
 inhibitors of acidification of intracellular organelles, prodigiosin 25- 362
 C and concanamycin B. Immunology 2000;99:243–8. 363
 [15] Montaner B, Navarro S, Piqué M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E, 364
 Gil J, Pérez-Tomás R. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia* 365
marcescens induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. Br 366
 J Pharmacol 2000;131:585–93. 367
 [16] Montaner B, Pérez-Tomás R. Prodigiosin-induced apoptosis in 368
 human colon cancer cells. Life Sci 2001;68:2025–36. 369
 [17] Díaz-Ruiz C, Montaner B, Pérez-Tomás R. Prodigiosin induces cell 370
 death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric 371
 cancer cell line HGT-1. Histol Histopathol 2001;16:415–21. 372
 [18] Mansat V, Laurent G, Levade T, Bettaieb A, Jaffrezou JP. The protein 373
 kinase C activators phorbol esters and phosphatidylserine inhibit 374
 neutral sphingomyelinase activation, ceramide generation, and 375
 apoptosis triggered by daunorubicin. Cancer Res 1997;57:5300–4. 376
 [19] Woo KR, Shu WP, Kong L, Liu BC. Tumor necrosis factor mediates 377
 apoptosis via Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-dependent endonuclease with protein 378
 kinase C as a possible mechanism for cytokine resistance in human 379
 renal carcinoma cells. J Urol 1996;155:1779–83. 380
 [20] Tomei LD, Kanter P, Wenner CE. Inhibition of radiation-induced 381
 apoptosis *in vitro* by tumor promoters. Biochem Biophys Res 382
 Commun 1988;155:324–31. 383
 [21] Forbes I, Zalewski P, Giannakis C, Cowled P. Induction of apoptosis 384
 in chronic lymphocytic leukemia cells and its prevention by phorbol 385
 ester. Exp Cell Res 1992;198:367–72. 386
 [22] Kanter P, Leister K, Tomei L, Wenner P, Wenner C. Epidermal growth 387
 factor and tumor promoters prevent DNA fragmentation by different 388
 mechanisms. Biochem Biophys Res Commun 1984;118:392–9. 389
 [23] McConkey D, Hartzell P, Jondal M, Orrenius S. Inhibition of DNA 390
 fragmentation in thymocytes and isolated thymocyte nuclei by agents 391
 that stimulate protein kinase C. J Biol Chem 1989;264:13399–402. 392
 [24] Rodriguez-Tarduchy G, Lopez-Rivas A. Phorbol esters inhibit 393
 apoptosis in IL-2-dependent T lymphocytes. Biochem Biophys Res 394
 Commun 1989;164:1069–75. 395
 [25] Grant S, Jarvis WD, Swerdlow PS, Turner AJ, Traylor RS, Wallace HJ, 396
 Lin PS, Pettit GR, Gewirtz DA. Potentiation of the activity of 1-beta-D- 397
 arabinofuranosylcytosine by the protein kinase C activator bryostatin 1 398
 in HL-60 cells: association with enhanced fragmentation of mature 399
 DNA. Cancer Res 1992;52:6270–8. 400
 [26] Ishii H, Gobe G. Epstein-Barr virus infection is associated with 401
 increased apoptosis in untreated and phorbol ester-treated human 402
 Burkitt's lymphoma (AW-Ramos) cells. Biochem Biophys Res 403
 Commun 1993;192:1415–23. 404
 [27] Kizaki H, Tadakuma T, Odaka C, Muramatsu J, Ishimura Y. Activation 405
 of a suicide process of thymocytes through DNA fragmentation by 406
 calcium ionophores and phorbol esters. J Immunol 1989;143:1790–4. 407
 [28] Sun Y, Pommier Y, Colburn N. Acquisition of a growth-inhibitory 408
 response to phorbol ester involves DNA damage. Cancer Res 1992; 409
 52:1907–15. 410
 [29] Stadheim TA, Kucera GL. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 411
 activity is required for TPA-mediated inhibition of drug-induced 412
 apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 1998;245:266–71. 413
 [30] Zhuang S, Lynch MC, Kochevar IE. Activation of protein kinase C is 414
 required for protection of cells against apoptosis induced by singlet 415
 oxygen. FEBS Lett 1998;437:158–62. 416
 [31] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing 417
 effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. Science 418
 1995;270:1326–31.

- 420 [32] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of
421 the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
- 422 [33] Anderson SM, Reyland ME, Hunter S, Deisher LM, Barzen KA,
423 Quissell DO. Etoposide-induced activation of c-jun N-terminal
424 kinase (JNK) correlates with drug-induced apoptosis in salivary
425 gland acinar cells. *Cell Death Diff* 1999;6:454–62.
- 426 [34] Boger DL, Patel M. Total synthesis of prodigiosin, prodigiosene, and
427 desmethoxyprodigiosin: Diels-Alder reactions of heterocyclic azadienes
428 and development of an effective palladium (II)-promoted 2,2'-
429 bipyrrrole coupling procedure. *J Org Chem* 1988;53:1405–15.
- 430 [35] Rokem JS, Weitzman P. Prodigiosin formation by *Serratia marcescens*
431 in a chemostat. *Enzyme Microb Technol* 1987;9:153–5.
- 432 [36] Stubbs M, Bhujwala ZM, Tozer GM, Rodrigues LM, Maxwell RJ,
433 Morgan R, Howe FA, Griffiths JR. An assessment of 31P MRS as a
434 method of measuring pH in rat tumors. *NMR Biomed* 1992;5:351–9.
- 435 [37] Shrode L, Tapper H, Grinstein S. Role of intracellular pH in proliferation,
436 transformation, and apoptosis. *J Bioeng Biomembr* 1997;
437 29:393–9.
- 438 [38] Matsuyama S, Llopis J, Deveraux QL, Tsien RY, Reed JC. Changes
439 in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate
440 caspase activation during apoptosis. *Nature Cell Biol* 2000;2:318–
441 25.
- 442 [39] Zanke BW, Lee C, Arab, Tannock IF. Death of tumor cells after
443 intracellular acidification is dependent on stress-activated protein
444 kinases (SAPK/JNK) pathway activation and cannot be inhibited by
445 bcl-2 expression or interleukin 1beta-converting enzyme inhibition,
446 *Cancer Res.* 58:1998;2801–8.
- 447 [40] Bortner CD, Cidlowski JA. A necessary role for cell shrinkage in
448 apoptosis. *Biochem Pharmacol* 1998;56:1549–59.
- 449 [41] Yamamoto D, Uemura Y, Tanaka K, Nakai K, Yamamoto C,
450 Takemoto H, Kamata K, Hirata H, Hioki K. Cycloprodigiosin
451 hydrochloride, H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis and differentia-
452 tion in HL-60 cells. *Int J Cancer* 2000;88:121–8.
- 453 [42] Sato T, Konno H, Tanaka Y, Kataoka T, Nagai K, Wasserman HH,
454 Ohkuma S. Prodigiosins as a new group of H⁺/Cl⁻ symporters that
455 uncouple proton translocators. *J Biol Chem* 1998;273:21455–62.



ELSEVIER

Toxicology Letters 000 (2001) 000–000

**Toxicology
Letters**

www.elsevier.com/locate/toxlet

The cytotoxic prodigiosin induces phosphorylation of p38-MAPK but not of SAPK/JNK

Beatriz Montaner, Ricardo Pérez-Tomás *

Cancer Cell Biology Research Group, Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Universitat de Barcelona, Pavelló Central, 5a planta, LR 5.1, C/Feixa Llarga s/n, E-08907 L'Hospitalet, Barcelona, Spain

Received 16 July 2001; received in revised form 18 November 2001; accepted 18 November 2001

Abstract

Prodigiosin (PG) is a red pigment produced by *Serratia marcescens*, with cytotoxic and immunosuppressive activity. It induces apoptosis in several cancer cell lines, including Jurkat-T cells. Here we examine the role of two stress-stimulated kinase cascades in this induction. Time course experiments using polyclonal antibodies showed that p38-MAPK phosphorylation began at 15 min and lasted for 3 h, whereas JNK was not phosphorylated, although both proteins were present. SB203580, a selective inhibitor of p38-MAPK, blocked its phosphorylation in PG-treated cells. Taken together, these data suggest that the PG induces phosphorylation of p38-MAPK but not of SAPK/JNK and that it increases the expression of both c-jun and c-fos oncoproteins. © 2001 Published by Elsevier Science Ireland Ltd.

Keywords: Cancer; c-jun; c-fos; Chemotherapy; JNK; MAP kinases; p38; Prodigiosin

1. Introduction

Apoptosis, also known as programmed cell death, is responsible for the removal of cells from healthy tissue during development, tissue homeostasis and protection against pathogens (Raff, 1992; Vaux et al., 1994). Apoptosis malfunctions can have health implications, as in can-

cer. Radiation and chemotherapy cause apoptosis (Inada et al., 1997; Cameron and Feuer, 2000).

Numerous, unrelated microbial pathogens engage or circumvent the host's apoptotic programme. Apoptosis is considered within the broader contexts of pathogenesis virulence, and host defence (Moss et al., 1999). A family of natural red pigments called prodigiosins, which are synthesised from various bacteria characterised by a common pyrrolyl pyrromethane skeleton, have immunosuppressive properties (Tsuji et al., 1992; Songia et al., 1997; Han et al., 1998; Mortellaro et al., 1999) and apoptotic effects in cancer cell lines (Kawauchi et al., 1997; Azuma et al., 2000; Yamamoto et al., 1999, 2000a; Lee et

Abbreviations: cPrG-HCl, cycloprodigiosin hydrochloride; EPK, extracellular response kinases; JNK, c-jun aminoterminal kinases; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PMA, phorbol-myristate acetate; PG, prodigiosin.

* Corresponding author. Tel.: +34-93-4024288; fax: +34-93-4024213/9082.

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

0378-4274/01/\$ - see front matter © 2001 Published by Elsevier Science Ireland Ltd.

PII: S0378-4274(01)00477-5

al., 2000; Melo et al., 2000; Montaner et al., 2000; Montaner and Pérez-Tomás, 2001; Díaz-Ruiz et al., 2001). The National Cancer Institute (Bethesda) found an average IC_{50} of 2.1 μ M for prodigiosin (PG) against a panel of 57 different human-cancer cells (Melvin et al., 2000).

A comparison of the in vitro cytotoxic properties of PG (2-methyl-3-pentyl-6-methoxyprodigiosene), prodigiosene and 2-methyl-3-pentylprodigiosene reveals exceptional cytotoxic potency for PG, which may be attributed to the presence of the PG C-6 methoxy substituent (Boger and Patel, 1988). The A-pyrrole ring plays a key role in both the copper nuclease activities and cytotoxic potency for the prodigiosins (Melvin et al., 2000).

Considerable attention is focused on the role of signal transduction pathways in the regulation of cell survival, particularly those related to three parallel MAPK modules. Of these, ERKs are activated by growth factor stimulation, whereas the JNK and p38-MAP kinase (p38-MAPK) are activated by various forms of environmental stress (Xia et al., 1995). Sustained overstimulation of the SAPK/JNK or p38-MAPK pathways, or both, induce apoptosis (Xia et al., 1995; Faris et al., 1998; Frasnich et al., 1998; Rincón et al., 2000). Given that PMA inhibits the PG-induced apoptosis in Jurkat cells through an ERK-dependent pathway (Montaner and Pérez-Tomás, 2002), we examined the possibility that PG triggers phosphorylation of JNK and/or p38-MAPK.

In several models, apoptosis requires intact transcriptional activity, it may be signalled by the induction of genes coding for transcriptional factors, such as *c-fos* and *c-jun* protooncogenes. Thus we examined the hypothesis that PG increases the expression of *c-fos* and *c-jun*.

2. Materials and methods

2.1. Chemical and reagents

Meat peptone was purchased from Difco (Detroit, MI, USA). Glycerol was from Merck (Darmstadt, Germany). SB203580 was from Cal-

biochem (Ref. # 559398). Deionised water further purified with a Millipore Milli-Q system (Bedford, MA) was used.

2.2. Cell lines and culture conditions

Acute human T cell leukaemia cells (Jurkat clone E6-1) were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Biological Industries, Beit Haemek, Israel) and supplemented with 10% of heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 2 mM L-glutamine (all from GIBCO BRL, Paisley, UK), at 37 °C, 5% CO₂ in air.

2.3. Bacteria strain and culture conditions

S. marcescens 2170 environmental isolate is a wild-type strain that produces the pigment PG. *S. marcescens* 2170 was cultivated in peptone glycerol medium, containing 1% meat peptone and 10% glycerol in distilled water, for 48 h at 30 °C with vigorous shaking. Bacteria were then harvested by centrifugation at 6800 \times g for 15 min at 4 °C. PG was extracted by shaking the pellet in acidic methanol (methanol–1 N HCl (24:1)) and centrifuged at 2000 \times g for 5 min at room temperature.

2.4. Isolation and purification of PG

PG was purified as described previously (Montaner et al., 2000). Briefly, after evaporation of the acidic methanol solvent under vacuum, atmospheric pressure liquid chromatography of the extract was performed on silica gel with chloroform and methanol as solvents. The isolated pigment was re-dissolved in methanol and analysed by electrospray ionisation mass spectrometry (ESI-MS) using a VG-Quattro triple mass spectrometer (Micromass, VG-Biotech, UK) and was re-purified by subsequent semi-preparative HPLC on a Shimadzu instrument (Kyoto, Japan). A Nucleosil C₁₈ reversed-phase column (250 \times 4 mm, 10 μ m) was used with a 0–100% linear gradient in 30 min (A: 10 mM ammonium acetate, pH 7.0, B:

100% acetonitrile). The elution was monitored both using diode-array UV detector (SPD-M10AVP Shimadzu) and by ESI-MS. The fractions containing the major peak were vacuum evaporated, re-dissolved in H₂O, lyophilised and characterised by ESI-MS and ¹H-NMR. ESI-MS: *m/z* 324.4 (M + H)⁺. ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz, ppm): 10.71 (m, NH), 8.54 (m, NH), 7.08 (s, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.88 (m, 1H), 6.83 (m, 1H), 6.30 (m, 1H), 6.25 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.43 (t, 2H), 1.58 (s, 3H), 1.2–1.4 (m, 6H), 0.91 (t, 3H).

PG was measured using the difference in absorption of the concentrated supernatant at 534 and 655 nm. A difference in absorbency of 1.0 between the two wavelengths is equivalent to 19.3 µg of PG per ml (Goldschmidt and Williams, 1968).

2.5. Electrophoresis and Western blot analysis

Active JNK was studied in total cell extracts by Western blot using an anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) antibody from New England Biolabs (Ref. # 9251S Beverly, MA, diluted 1:1000), and total JNK with the anti-JNK antibody from Santa Cruz (Ref. # sc-474 Santa Cruz, CA, diluted 1:200). Similarly, active p38-MAPK was studied using an anti-phospho-p38MAPK (Thr180/Tyr182) antibody from New England Biolabs (Ref. # 9211S, diluted 1:1000) and total p38-MAPK with an anti-p38-MAPK antibody from Santa Cruz (Ref. # sc-535, diluted 1:200). Furthermore, antibodies that recognised c-jun from Calbiochem (Ref. # pc06, diluted 1:500) and c-fos from Santa Cruz (Ref. # sc-52, diluted 1:200) were also used in this study. Cells were untreated or treated with 200 and 400 nM of PG in the absence or presence of SB203580 (5 µM). SB203580 was added 1 h before PG administration. Cells were washed in PBS and harvested with the lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin and 1 µg/ml aprotinin) and 50 µg protein extracts were electrophoresed on 12% polyacrylamide gels and transferred to Immobilon-P (Millipore, MA, USA) membranes. Blots were blocked in 5% dry milk diluted in TBS-T (50 mM Tris-HCl

pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20), for 1 h and then incubated overnight with the primary antibodies mentioned above according to the manufacturer's instructions. Secondary antibodies conjugated to HRP were goat anti-rabbit IgG (Ref. # 170-6515, BioRad, UK, diluted 1:1000) in 5% dry-milk-TBS-T, for 1 h at RT. Between each incubation, blots were washed 3 × 5 min in 5% dry milk-TBS-T. After washing blots in TBS-T 3 × 5 min, peroxidase was then developed by incubating the membrane with 2.25 mM luminol (Sigma Chemicals Co.) and 0.45 mM *p*-iodophenol (Fluka, Buchs, Switzerland) in 50 mM Tris-HCl pH 9.0 plus 0.03% H₂O₂ for 1 min at RT and enhanced chemiluminescence on an autoradiography film.

3. Results

We had found in preliminary experiments that the IC₅₀ of PG was 225 nM in Jurkat-T cells (Montaner et al., 2000). We also found that activation of PKC in Jurkat-T cells confers protection against apoptosis induced by PG and that ERK1/2 mediates antiapoptotic PKC signalling (Montaner and Pérez-Tomás, 2002). We were interested in determining whether PG triggers phosphorylation of JNK and/or p38-MAPK and may promote the process leading to apoptosis. The analysis was at the protein level by Western blot. Total cell extracts from an equivalent number of cells were loaded in each lane. That similar amounts of protein were loaded per lane was verified by Ponceau red staining of the unused part of the blot (data not shown).

Time course experiments using polyclonal antibody against phosphorylated-p38-MAPK on threonine 180 and tyrosine 182 form showed that p38-MAPK phosphorylation began at 15 min and lasted for 3 h (Fig. 1a). JNK phosphorylation was not detected with polyclonal antibody against phospho-SAPK/JNK on threonine 183 and tyrosine 185 (data not shown). Next, we studied whether the p38-MAPK activation by PG was blocked by pre-treatment of the cells with the pyridinyl imidazole SB203850, which selectively inhibits p38-MAPK activity by competitive inhibi-

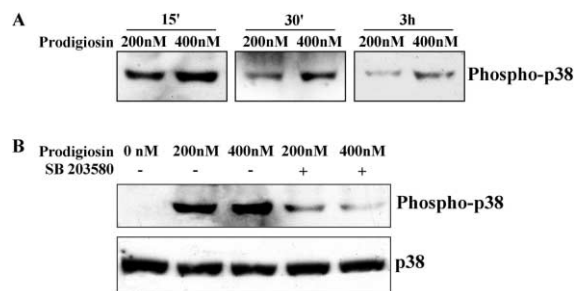


Fig. 1. PG induced p38 MAPK phosphorylation. (A) Time course analysis of p38 MAPK phosphorylation was performed immunochemically using an antibody directed against the phosphorylated regulatory domain of p38 MAPK (phospho-38). Jurkat cells were treated with 200 or 400 nM PG and lysed at the indicated time points. (B) Pre-incubation with SB203580 completely suppresses this induction to levels comparable to non-stimulated control cells. The amount of total p38 MAPK was not affected by SB203580 or PG. Cells pretreated or non-pretreated with SB203580 as indicated were exposed to PG (200 or 400 nM) for 15 min, or maintained untreated or treated with SB203580 alone. Immunoblot analyses of total proteins of p38 MAPK were performed using phospho-specific p38 MAPK antibody (phospho-38) or total p38 MAPK antibody (p38). Results are representative of three independent experiments.

tion at the ATP binding site (Young et al., 1997). The p38-MAPK phosphorylation induced by PG was almost totally reverted (Fig. 1b).

The dually phosphorylated isoforms of JNK were detected only in cells treated with PMA + ionomycin (Fig. 2), although both proteins were present (Figs. 1b and 2).

PG produced a dose-dependent increase in c-jun and c-fos proteins expression in Jurkat T cells (Fig. 3).

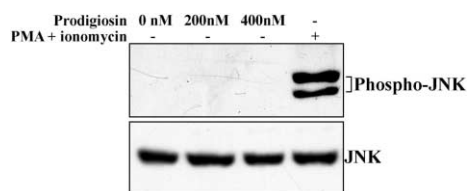


Fig. 2. PG did not induce JNK phosphorylation. Jurkat cells were treated with PG (200 or 400 nM) or TPA + ionomycin as positive control. Immunoblot analysis of total proteins of JNKs was immunodetected with phospho-specific (phospho-JNK) or total JNKs antibodies (JNK). The amount of total JNK was not affected by PG. These results were reproduced three times.

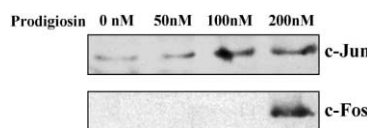


Fig. 3. PG induces c-jun and c-fos expression. Jurkat cells were untreated or treated for 3 h with 50, 100 and 200 nM PG, respectively. Cell lysates were subjected to SDS-PAGE analysis and blotted with antibodies to c-jun or c-fos (representative of three independent experiments).

4. Discussion

PG is produced by *S. marcescens* and it triggers apoptosis in cancer cell lines, with no marked toxicity in non-malignant cell lines (Montaner et al., 2000; Montaner and Pérez-Tomás, 2001; Díaz-Ruiz et al., 2001). Here we show that PG induces phosphorylation of p38 but not of JNK MAP kinase and increases the expression of both c-jun and c-fos oncoproteins.

Most cancer chemotherapeutic agents induce apoptosis. However, the signal transduction mechanisms that regulate apoptosis are not defined, although the MAPK family of proline-directed serine/threonine kinases has been implicated. Three MAPK family members have been characterised so far. Although the ERK, JNK and p38 MAP kinases are related structurally and are activated by similar kinase cascades, they respond to different extracellular stimuli (Davis, 1994). The ERKs are activated by growth factors. The phorbol ester PMA inhibits PG-induced apoptosis in Jurkat cells through an ERK-dependent pathway (Montaner and Pérez-Tomás, 2002). Prodigiosins promote H^+/Cl^- symport and induce neutralisation of the acidic compartment of cells, which leads to acidification of the cytoplasm, cell cycle arrest and apoptosis (Sato et al., 1998; Yamamoto et al., 1999, 2000a,b; Pérez-Tomás and Montaner, 2002). This apoptosis triggering action by prodigiosin family members may explain why apoptosis can be inhibited by pretreatment of Jurkat cells with PMA, which prevents intracellular acidification through PKC-induced activation of the Na^+/H^+ antiport (Bortner and Cidlowski 1998).

In parallel to the above mentioned cascade at least two other stress-stimulated cascades, the p38 and the JNK cascade, exist in mammalian cells (Goedert et al., 1997) and are associated with increased apoptosis. To date there is no evidence whether PG activates the JNK or p38 kinases pathway or both, or whether these pathways contribute to its apoptotic action. However, Yamamoto et al. (2000b) demonstrate that cycloprodigiosin hydrochloride (cPrG-HCl) activate SAPK/JNK and caspase-3, leading to apoptosis. In contrast, we did not detect SAPK/JNK phosphorylation using an anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) antibody from New England Biolabs that detected JNK phosphorylation in PMA + ionomycin treated cells (included in this study as a positive control). However, structural or methodological differences may account for these discrepancies. The p38 cascade is stimulated by heat shock, hyper- and hypoosmolarity, UV-light pro-inflammatory cytokines and chemical stress (Rolli-Derkinderen and Gaestel, 2000). p38 regulates the activity of transcription factors and controls expression of several genes at the transcriptional or post-transcriptional level. p38 activates different transcription factors. Our finding that the transcription factors c-jun and c-fos, are up-regulated in PG-treated Jurkat cells is consistent with other studies in which the immediate early gene(s) *c-jun* and *c-fos* were up-regulated by the p38 cascade (Rolli-Derkinderen and Gaestel, 2000).

These and previous data (Montaner and Pérez-Tomás, 2002), indicate that cross-talk between ERKs and p38 kinase signalling determines apoptosis.

5. Unlinked reference

Lee et al., 1994

Acknowledgements

This work was supported by the grant SAF2001-3545 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología and the Marató de TV3 (Ref. #

001510). The authors thank Dr E. Giralt, Marc Martinell and Dr M. Vilaseca (Organic Chemistry Department and Mass Spectrometry Unit, University of Barcelona) for excellent technical assistance in purifying PG; Jordi Capella for the medical illustration assistance; Constanza Alcaraz for library assistance; and Robin Rycroft for the linguistic assistance.

References

- Azuma, T., Watanabe, N., Yagisawa, H., Hirata, H., Iwamura, M., Kobayashi, Y., 2000. Induction of apoptosis of activated murine splenic T cells by cycloprodigiosin hydrochloride, a novel immunosuppressant. *Immunopharmacology* 46, 29–37.
- Boger, D.L., Patel, M., 1988. Total synthesis of prodigiosin, prodigiosene, and desmethoxyprodigiosin: Diels–Alder reactions of heterocyclic azadienes and development of an effective palladium(II)-promoted 2,2'-bipyrrrole coupling procedure. *J. Org. Chem.* 53, 1405–1415.
- Bortner, C., Cidlowski, J., 1998. A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 56, 1549–1559.
- Cameron, R., Feuer, G., 2000. Molecular cellular and tissue reactions of apoptosis and their modulation by drugs. In: Cameron, R., Feuer, G. (Eds.), *Apoptosis and its Modulation by Drugs*. Springer, Berlin, pp. 37–57.
- Davis, R.J., 1994. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* 19, 470–473.
- Díaz-Ruiz, C., Montaner, B., Pérez-Tomás, R., 2001. Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1. *Histol. Histopathol.* 16, 415–421.
- Faris, M., Kokot, N., Latinins, K., Kasibhatla, S., Green, D., Koretzky, G., Nel, A., 1998. The c-jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in Jurkat cells by up-regulating fas ligand expression. *J. Immunol.* 160, 134–144.
- Frasch, S., Nick, J., Fadok, V., Bratton, D., Worthen, G., Henson, P., 1998. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 273, 8389–8397.
- Goedert, M., Cuenda, A., Craxton, M., Jakes, R., Cohen, P., 1997. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPKs by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6): comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *EMBO J.* 16, 3563–3571.
- Goldschmidt, M., Williams, R., 1968. Thiamine-induced formation of the monopyrrole moiety of prodigiosin. *J. Bacteriol.* 96, 609–616.
- Han, S., Kim, H., Kim, Y., Lee, Ch., Jang, E., Son, K., Kim, S., Kim, Y., 1998. T-cell specific immunosuppression by

- prodigiosin isolated from *Serratia marcescens*. *Int. J. Immunopharmacol.* 20, 1–13.
- Inada, T., Ichikawa, A., Kubota, T., Ogata, Y., Moosa, A., Hoffman, R., 1997. 5-FU-induced apoptosis correlates with efficacy against human gastric and colon cancer xenografts in nude mice. *Anticancer Res.* 17, 1965–1971.
- Kawauchi, K., Shibutani, K., Yagisawa, H., Kamata, H., Nakatsuji, S., Anzai, H., Yokoyama, Y., Ikegami, Y., Moriyama, Y., Hirata, H., 1997. A possible immunosuppressant, cycloprodigiosin hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 543–547.
- Lee, J.C., Laydon, T., McDonnell, P.C., Gallagher, T.F., Kumar, S., Gree, D., McNulty, D., Blumenthal, M.J., Heys, J.R., Landvatter, S.W., Strickler, J.E., McLaughlin, M.M., Siemens, I.R., Fisher, S.M., Livi, G.P., White, J.R., Adams, J.L., Young, P.R., 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739–746.
- Lee, M., Kataoka, T., Honjo, N., Magae, J., Nagai, K., 2000. In vivo rapid reduction of alloantigen-activated CD8⁺ mature cytotoxic T cells by inhibitors of acidification of intracellular organelles prodigiosin.25C and concanamycin B. *Immunology* 99, 243–248.
- Melo, P., Durán, N., Haun, M., 2000. Cytotoxicity of prodigiosin and benzimidazole on V79 cells. *Toxicol. Lett.* 116, 237–242.
- Melvin, M., Tomlinson, J., Saluta, G., Kucera, G., Lindquist, N., Manderville, R., 2000. Double-strand DNA cleavage by cooper-prodigiosin. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 6333–6334.
- Montaner, B., Pérez-Tomás, R., 2001. Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sci.* 68, 2025–2036.
- Montaner, B., Pérez-Tomás, R., 2002. Activation of protein kinase C is required for protection of cells against apoptosis induced by the immunosuppressor prodigiosin. *Biochem. Pharmacol.*, in press.
- Montaner, B., Navarro, S., Piqué, M., Vilaseca, M., Martinell, M., Giral, E., Gil, J., Pérez-Tomás, R., 2000. Characterization of prodigiosin as an apoptotic factor from *Serratia marcescens*. *Br. J. Pharmacol.* 131, 585–593.
- Mortellaro, A., Songia, S., Gnocchi, P., Ferrari, M., Fornasiero, Ch., D'Alessio, R., Isetta, A., Colotta, F., Golay, J., 1999. New immunosuppressive drug PNU156804 blocks IL-2-dependent proliferation and NF-kappa B and AP-1 activation. *J. Immunol.* 162, 7102–7109.
- Moss, J.A., Aliprantis, A.O., Zychlinsky, A., 1999. The regulation of apoptosis by microbial pathogens. *Int. Rev. Cytol.* 187, 203–259.
- Pérez-Tomás, R., Montaner, B., 2002. Effects of the immunosuppressive drug prodigiosin on cell proliferation and apoptosis in Jurkat cells. In press.
- Raff, M., 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356, 397–400.
- Rincón, M., Flavell, R., Davis, R., 2000. The JNK and p38 MAP kinase signalling pathways in T-cell-mediated immune responses. *Free Radical Biol. Med.* 28, 1328–1337.
- Rolli-Derkinderen, M., Gaestel, M., 2000. p38/SAPK2-dependent gene expression in Jurkat T cells. *Biol. Chem.* 381, 193–198.
- Sato, T., Konno, H., Tanaka, Y., Kataoka, T., Nagai, K., Wasserman, H., Ohkuma, S., 1998. Prodigiosins as a new group of H⁺/Cl⁻ symporters that uncouple proton translocators. *J. Biol. Chem.* 273, 21455–21462.
- Songia, S., Mortellaro, A., Taverna, S., Fornasiero, C., Scheiber, E.A., Erba, E., Colotta, F., Mantovani, A., Isetta, A.M., Golay, J., 1997. Characterization of the new immunosuppressive drug undecylprodigiosin in human lymphocytes. *J. Immunol.* 158, 3987–3995.
- Tsuji, R., Magae, J., Jamashita, M., Nagai, K., Yamasaki, M., 1992. Immunomodulating properties of prodigiosin 25-C, an antibiotic which preferentially suppresses cytotoxic T cells. *J. Antibiot.* 45, 1295–1302.
- Vaux, D., Haecker, G., Strasser, A., 1994. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 76, 777–779.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R., Greenberg, M., 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326–1331.
- Yamamoto, C., Takemoto, H., Kuno, K., Yamamoto, D., Tsubura, A., Kamata, K., Hirata, H., Yamamoto, A., Kano, H., Seki, T., Inoue, K., 1999. Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines in vitro and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Hepatology* 30, 894–902.
- Yamamoto, D., Kiyozuka, Y., Uemura, Y., Yamamoto, C., Takemoto, H., Hirata, H., Tanaka, K., Hioki, K., Tsubura, A., 2000a. Cycloprodigiosin hydrochloride, a H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human breast cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 126, 191–197.
- Yamamoto, D., Uemura, Y., Tanaka, K., Nakai, K., Yamamoto, C., Takemoto, H., Kamata, K., Hirata, H., Hioki, K., 2000b. Cycloprodigiosin hydrochloride, H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis and differentiation in HL-60 cells. *Int. J. Cancer* 88, 121–128.
- Young, P.R., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M.L., McNulty, D., Gallagher, T.F., Fisher, S., McDonnell, P.C., Carr, S.A., Huddleston, M.J., Seibel, G., Porter, T.G., Livi, G.P., Adams, J.L., Lee, J.C., 1997. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J. Biol. Chem.* 272, 12116–12121.

E-mail de aceptación del artículo titulado "The prodigiosins: a new family of anticancer drugs".

Data lliur.: Tue, 02 Oct 2001 10:58:10 -0500
De: "John K. Buolamwini" <jbuolamwini@utmem.edu>
Assumpte: RE: Review to Current Cancer Drug Targets
A: Beatriz Montaner <RPT-CCBRG@bell.ub.es>

Dear Dr. Montaner,

Thanks for accepting our invitation to contribute a review for consideration for publication in Current Cancer Drug Targets. I have received your faxed abstract as well. The subject is appropriate. Please go ahead and submit the full review.

Best regards,

John

John K. Buolamwini, Ph.D.
Editor-in-Chief
Current Cancer Drug Targets
Department of Pharmaceutical Sciences
College of Pharmacy
University of Tennessee Health ScienceCenter
847 Monroe Avenue, Suite 327
Memphis, TN 38163
Phone: 901 448-7533
Fax: 901 448-6828

THE PRODIGIOSINS: A NEW FAMILY OF ANTICANCER DRUGS

Beatriz Montaner and Ricardo Pérez-Tomás*

Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Cancer Cell Biology Research Group, Universitat de Barcelona. Feixa Llarga s/n. E-08907 L'Hospitalet (Barcelona) Spain.

*Corresponding author. Tel: 34-93 4024288; Fax: 34-93 4024213

E-mail address: rperez @ bell.ub.es

Abbreviations: Cdk, cyclin-dependent kinase; cki, cdk inhibitors; cPrG-HCl, cycloprodigiosin hydrochloride; PG, prodigiosin; pHi, intracellular pH; PKC, protein kinase C; Rb, retinoblastoma; UP, prodigiosin 25-C (undecylprodigiosin).

ABSTRACT

Apoptosis is involved in the action of several (and perhaps all) cancer-chemotherapeutic agents. A family of natural red pigments called prodigiosins, characterized by a common pyrrolylpyrromethane skeleton, are synthesized from various bacteria. Prodigiosin (PG), undecylprodigiosin (UP) and cycloprodigiosin hydrochloride (cPrG-HCl), three members of the PG family, have immunosuppressive properties and apoptotic effects on cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Their cytotoxic effect is attributed to the presence of the C-6 methoxy substituent. The A-pyrrole ring plays a key role in both the copper nuclease activity and the cytotoxicity of prodigiosins. Here we review the pharmacological activity of PG and related compounds, including novel PG synthetic derivatives with lower toxicity. The mechanism of these molecules is a current topic in biomedicine. The molecular targets of prodigiosins are revised.

Brief history of prodigiosin

The red pigment prodigiosin (PG) has unusual properties, which have been documented since historical times. In warm and humid conditions, certain strains of *Serratia marcescens* form distinctive red colonies on food. The red color derives from the presence of PG or related materials. From early times, extensive written records report the appearance of “blood” on bread, on wafers used as the Host in the Eucharistic liturgy and on other starchy foods. Indeed, the formation of bloodlike material on starchy foods due to *S. marcescens* could be interpreted in certain religious or symbolic contexts as the miraculous appearance of blood [revised in 1].

The history of PG and cancer began in 1891 with the studies of William B. Coley and his vaccine. Dr. Coley combined the cultures of *Streptococcus* sp. and *Bacillus prodigiosus* (now called *S. marcescens*), then sterilized them by either heat or filtration. The mixture was called the Coley toxins. This therapy was applied in the treatment of tumors, with fascinating results in tumors of mesodermal origin [2,3]. Several toxic entities could be contained in Coley’s toxin, such as PG.

Prodigiosins (PGs) are a family of naturally occurring polypyrrole red pigments produced by a restricted group of microorganisms including some *Streptomyces* and *Serratia* strains, characterized by a common pyrroldipyrrolylmethene skeleton (structure called prodigiosene) (Fig. 1).

PG was first isolated from *S. marcescens* in pure form in 1929. Its name, used by early researchers, was retained and in 1934, the pigment was characterized and its main structural features were elucidated [4]. As typical secondary metabolites, PG and related materials have no clearly defined physiological functions in the producing organisms. However, PG may provide ecological advantages in bacteria dispersion [5]. PG has potent antimicrobial, antimalarial and cytotoxic activity [6-9]. Comparison of the *in vitro* cytotoxic properties of PG (2-methyl-3-pentyl-6-methoxyprodigiosene), prodigiosene and 2-methyl-3-pentylprodigiosene revealed the exceptional cytotoxic potency of PG, which may be attributed to the presence of the PG C-6 methoxy substituent [7]. D’Alessio et al. [10] started a medicinal chemistry program aimed at synthesizing novel PG derivatives with a higher selectivity index and a better pharmacotoxicological profile than natural PG compounds. They found that the substitution of methoxy by a larger alkoxy progressively reduces the activity, which is counterbalanced by a more marked decrease in cytotoxicity, thus favoring the selectivity. The best compound obtained was PNU-156804, with a therapeutic index almost 3-fold higher than that of UP. Other studies have revealed that the A-pyrrole ring plays a key role in both the copper nuclease activities and the cytotoxic potency of PGs [11].

PGs as immunosuppressors

PG, prodigiosin 25-C (undecylprodigiosin, UP), cycloprodigiosin hydrochloride (cPrG-HCl), metacycloprodigiosin, and nonylprodigiosin (Fig. 1) have immunosuppressive properties, like the ability to specifically inhibit activated lymphocyte proliferation [12-26]. PG is selective to T cells without *in vivo* toxicity [20]. UP is an immunosuppressive agent through inhibition of T lymphocyte proliferation *in vitro* [12, 14,16,18] and *in vivo* [13,15,17,21], with preferential effect on cytotoxic T lymphocytes (CTL), which is accompanied by a decrease in the CD8⁺ population [23]. UP also suppresses the T-cell stimulatory function of allogeneic antigen presenting cells (APCs) [21]. cPrG-HCl preferentially inhibits T cell proliferation without modifying the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ cells [19,24]. Recent studies in small bowel-transplanted rats show that cPrG-HCl effectively suppresses acute graft rejection, but a modified version of the drug should be developed to reduce its side effects, which can cause severe damage to the postoperative body [25]. Metacycloprodigiosin also abolishes cytotoxic T cell induction in a mixed lymphocyte reaction (MLR) [12]. However, *in vivo* it is more effective in reducing splenic CTL activity than in prolonging murine skin or cardiac allografts [17]. Nonylprodigiosin behaves as a selective inhibitor of T cell proliferation in the same way as other members of the PG family [26]. Finally, PNU156804 (a UP analogue with more favorable activity *in vivo*) efficiently inhibits the proliferation of primary human T and B lymphocytes [22]. The mode of action of PGs differs from that of cyclosporin A or FK506, two well-known specific immunosuppressants of helper T cells, hindering both CTL induction and antibody production [15].

PGs and apoptosis

Apoptosis has been linked to such diverse pathophysiologic processes as oncogenesis [27]. This type of cell death is involved in the action of several (and perhaps all) cancer-chemotherapeutic agents. New drugs associated with apoptosis and expected to be effective against tumors with high proliferation rates have been screened for use in the treatment of cancer [28]. Numerous unrelated microbial pathogens engage or circumvent the host apoptotic program. PGs have been shown to induce apoptosis. Their apoptotic effects have been observed in several human cancer cell lines in tissue culture [19,24,29-34] and on hepatocellular carcinoma xenografts [35]. Along these lines, apoptosis is the mechanism of action suggested for cPrG-HCl to exert immunosuppression [19,24].

cPrG-HCl also induces apoptosis on liver cancer cells both *in vitro* and *in vivo*, with high effectiveness on liver cancer and breast cancer cell lines, promyelocytic leukemia cells and colon cancer cells [32-34], but nominally no toxicity on normal cells [34]. PG rapidly, potently triggers apoptosis in hematopoietic cancer cell lines, colon and gastric cancer cells, with no marked toxicity in non-malignant cell lines [29-31].

PG also triggers the reorganization of actin cytoskeleton and may promote the breakdown of actin microfilaments. Thus, cells die by apoptosis [31].

The activation of the apoptosis program is regulated by various signals from both intracellular and extracellular stimuli. Although the apoptosis-signaling pathway triggered by PGs requires further studies, the mechanism involved in the apoptotic action of PGs is almost elucidated.

PGs as H^+ /Cl⁻symporters

Extracellular pH is lower in tumor than in normal tissue, whereas the cytosolic pH in transformed or cancerous cells is generally regulated at neutral or even slightly more alkaline levels than in normal cells [34], as required for cell growth, transformation, and metabolism [37,38]. This is due to a variety of pH intracellular (pHi) homeostatic regulators, including the Na^+/H^+ exchanger, Na^+ -dependent and $-$ -independent Cl^-/HCO_3^- exchangers, vacuolar type H^+ -ATPases (V-ATPase) and others [37]. However, of these proton pumps, V-ATPases, which are found on the membranes of various intracellular compartments such as lysosomes, endosomes, the Golgi complex and secretory vesicles [39,40], are the most important, especially in some tumor cells, and they maintain a high pHi with respect to the high rate of glycolysis and metabolism [38,39].

The apoptotic process has been claimed to be modulated or triggered by changes in pHi [41,42]. Recently, Matsuyama and cols. demonstrated that a very early event in mitochondria-dependent apoptosis involves a change in cellular pH regulation, characterized by mitochondrial alkalization and concomitant cytosol acidification. Alteration of pH regulation is an early event in apoptosis, preceding cytochrome C release from mitochondria and facilitating cytochrome C activation of caspases [43]. Anyway, the use of F-ATPase inhibitors or protonophores that prevent changes in cytosolic pH impairs caspase activation and thus apoptosis [43]. Moreover, several specific inhibitors of V-ATPases like bafilomycin A₁, originally found in microbial metabolites [44], perturb pHi homeostasis, and thereby lead to the apoptosis of cancer cells. Furthermore, a ionophore,

nigericin, which abolishes the pH gradient across cell membranes by exchanging K^+ ions with H^+ , also has anti-tumor effects [45]. Thus, the acidification of cytosol and/or the disruption of the pH gradient across the cytoplasmic membrane may trigger the apoptotic process in cancer cells, suggesting that the pH_i regulatory mechanisms may serve as targets for tumor therapy.

PGs behave as H^+/Cl^- symporter that uncouple proton translocation and thereby perturb vacuolar acidification, thus inducing intracellular acidification and eventually apoptosis [32,33,35,46].

cPrG-HCl raises the intraorganelle pH by inhibiting the proton pump activity of V-ATPase without affecting its ATPase activity [16]. As cPrG-HCl does not affect membrane conductance of phospholipid bilayers, Kawauchi and cols. ruled out that cPrG-HCl is a simple protonophore [19]. cPrG-HCl induces the acidification of the cytosol, thus leading to apoptosis [35]. Moreover, the role of Cl^- in the inhibition of vacuolar acidification by cPrG-HCl has been analyzed, showing that Cl^- in the vacuole is necessary for cPrG-HCl to collapse the chemical potential gradient of H^+ across the tonoplast [47].

Yamamoto and cols. [32] observed that in human breast cancer cells, which overexpress mRNA for the 16 kDa subunit of V-ATPase and maintain a high pH_i compared with non-cancerous cells, cPrG-HCl inhibits the acidification of lysosomes, decreases the pH_i and evokes apoptosis, suggesting that a high pH_i is necessary for the maintenance of the function of cancer cells and that cancer cells are more sensitive to pH changes than normal cells. They also suggest that the intracellular acidification due to the increase in lysosomal pH results in apoptosis through cellular dysfunction in cancer cells. Further studies in human promyelocytic leukemia cells (HL-60) and in colon cancer cell lines support that cPrG-HCl strongly decreases the pH_i of tumor cells and leads to apoptosis [33,34].

PG, metacycloprodigiosin and UP display H^+/Cl^- symport activity on liposomal membranes and uncouple both V- and F-ATPases, although they do not inhibit catalysis or membrane potential formation [46,48]. Additionally, UP induces functional and morphological changes in the Golgi apparatus and the swelling of mitochondria [49]. They both uncouple the (H^++K^+) -ATPase of plasma membrane vesicles from hog gastric mucosa (and inhibit acid secretion), suggesting that they are useful for the clinical treatment of gastritis [50].

Furthermore, the proto-oncogene product Bcl-2 inhibits cell death induced by a variety of apoptotic stimuli by controlling mitochondrial homeostasis [51]. Elevated levels of Bcl-2 decrease cell susceptibility to apoptosis. Bcl-2 is upregulated in certain lymphomas [40]. Interestingly, PG-

induced apoptosis is Bcl-2-independent [Montaner & Perez-Tomas, *personal communication*].

PGs and cell cycle

UP and PNU-156804 inhibit equally well both T and B lymphocyte proliferation, but not transformed leukemic Jurkat cell line. Cell cycle-related proteins such as retinoblastoma (Rb) and cyclin-dependent kinases -2 and -4 (cdk-2 and cdk-4) are the targets of both molecules in the induction of growth arrest in G₁ phase [18,22]. However, cPrG-HCl and PG suppress cell proliferation as a result of apoptotic cell death [19,24, Pérez-Tomás & Montaner, *submitted for publication*]. cPrG-HCl inhibits proliferation and induces apoptosis in liver carcinoma cell lines [35] and in human breast cancer cell lines [32], and induces differentiation in the human promyelocytic leukemia cell line HL60 [33]. PG inhibits the proliferation of human Jurkat T cells mainly via G₁-S transition arrest, in association with the down-regulation of cyclin E expression, induction of the cyclin A-cdk2 and cyclin E-cdk2 activity, and the phosphorylation of Rb. PG, like UP and PNU-156804 [18,22], also abolishes the expression of the cdk inhibitor p27, suggesting that p27, in the presence of PG, coordinates the final outcome of proliferation or death of the cell (Pérez-Tomás & Montaner, *submitted for publication*).

There is evidence of the direct coupling of cell cycle-related proteins to cytoplasmic pH homeostasis [18,37]. As shown above, some studies support the hypothesis that PGs promote H⁺/Cl⁻ symport and neutralize the acidic compartment of cells, which results in the acidification of the cytoplasm and thus leads to cell cycle arrest and, eventually, apoptosis [19,32,33,35,46].

Furthermore, alterations of the p53 tumor suppressor gene are the most frequent genetic changes in human cancer [52] and they are associated with a significantly worse prognosis [53]. The absence of p53 or aberrant p53 implies that apoptosis cannot be engaged even when the cell suffers genetic damage [54]. PG-induced apoptosis is p53-independent [29], which may be an advantage over other chemotherapeutic drugs [55,56].

PGs and the MAP kinase signaling cascades

Members of the MAP kinase family are usually coordinately regulated. ERKs are activated by growth factor stimulation, whereas the SAPK/JNK and p38-MAP kinase (p38-MAPK) are activated by various forms of environmental stress [57]. Thus, MAP kinase signaling cascades are needed for

the differential response to mitogens and apoptotic inducers. Protein kinase C (PKC) is involved in many cellular functions, like proliferation and differentiation. PKC also participates in the regulation of apoptosis induced by many stimuli, such as tumor necrosis factor α (TNF α), ionizing irradiation and antitumor drugs [58-60]. The activation of PKC by phorbol-myristate acetate (PMA), which prevents intracellular acidification through PKC-induced activation of the Na⁺/H⁺ antiport [61], confers protection against apoptosis induced by PG through an ERK-dependent pathway [62], whereas the percentage of dead cells increases with cPrG-HCl [19]. The differences in the chemical structures of PG and cPrG-HCl may explain this disagreement. Moreover, imidazole, a permeable base, prevents intracellular acidification and suppresses cPrG-HCl-induced apoptosis [32].

On the other hand, sustained overstimulation of the SAPK/JNK or p38-MAPK pathways, or both, induces apoptosis [57,63,64]. PG induces phosphorylation of p38 but not of JNK MAP kinase [65]. cPrG-HCl activates SAPK/JNK, leading to apoptosis [33]. Again, structural or methodological differences may account for these discrepancies.

PG induces DNA cleavage

The agents that facilitate dsDNA cleavage, e.g. bleomycins and enediyne antibiotics, are cytotoxic, as dsDNA cleavage causes more serious damage than ssDNA cleavage. Melvin and cols. have demonstrated that PG performs DNA cleavage through a copper-PG system [11]. Moreover, PG binds DNA by intercalation with a preference for AT sites. Since PG has poor water solubility, its use as a DNA targeting agent is limited. However, attachment of water-soluble cationic groups to the PG carbon skeleton may yield very effective DNA targeting molecules that in turn may provide therapeutic agents for the treatment of certain cancers [66]. Nevertheless, these observations need to be confirmed *in vivo* (Montaner et al., *manuscript in preparation*).

PG and cancer

In 1977, the antitumor activity of PG was tested *in vivo* with mice by Fullan et al. [67], who found that tumors injected with pigment grow at approximately 2/3 the rate of untreated tumors.

Recently, the activity of PGs has also been determined *in vivo*, as mentioned above. Briefly, the effect of metacycloprodigiosin on murine allogenic skin and heart transplantation models revealed that it is more effective in reducing splenic cytotoxic T-cell activity than in prolonging murine skin

or cardiac allografts [17]. cPrG-HCl suppresses tumor growth of xenografted Huh-7 cells in nude mice and induces apoptosis on the liver cancer cells, with no remarkable signs of abnormality in any organ or serum enzyme compared with control [35]. It also effectively suppresses acute graft rejection in experimental small bowel transplanted rats [25]. Finally, PNU-156804 prolongs heart allograft survival and acts synergically with cyclosporine [54].

Most anticancer agents are cytotoxic and inhibit DNA synthesis or cell replication. They are 'antiproliferative' rather than 'anticancer', and so the biochemical selectivity for tumor versus normal cells is modest, side effects are usually severe and drug resistance is common. Various agents of cancer chemotherapy act primarily through the induction of apoptotic cell death in susceptible cancer cells. Each chemotherapeutic agent may interact with a specific target, causing dysfunction and injury, which is then interpreted by susceptible cancer cells as an instruction to undergo apoptosis [68]. Innovative therapies involve the synthesis of drugs that are much more selectively effective on cancer cells and considerably less harmful to normal cells. The identification of novel targets and the development of drugs much more selectively effective on cancer cells are two of the main goals of research on cancer therapy. Therefore, pHi control may be a new strategy for cancer therapy. The *in vitro* 60 human tumor cell panel of the National Cancer Institute (NCI, Bethesda) provides an interesting tool that is available to the scientific community [69]. The main objective is to identify compounds with an unusual pattern of cellular activity, in the hope that this indicates activity on a distinct, potentially novel cell target. The NCI found an average IC₅₀ of 2.1 μM for PG [11].

PGs are a new group of molecules with a common mechanism of action and specific molecular targets. Although their mechanisms of apoptotic action remain to be determined and assays *in vivo* are necessary, all the studies presented in this review suggest that PGs are potential anticancer drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the grant SAF2001-3545 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología and the Marató de TV3 (Ref.# 001510). The authors thank Constanza Alcaraz for library assistance and Robin Rycroft for the linguistic assistance.

REFERENCES

1. Bennett, J. W.; Bentley, R. Seeing red: the story of prodigiosin. *Adv. Appl. Microbiol.* **2000**, *47*, 1-32.
2. Starnes, C. O. Coley's toxins in perspective. *Nature* **1992**, *357*, 11-12.
3. Rook, G. Tumours and Coley's toxins. *Nature* **1992**, *357*, 545.
4. Wrede, F.; Rothhass, A. Uber das prodigiosin, den roten farbstoff des *Bacillus prodigiosus*. *Hoppe Seyler's Z. Chem. Ber.* **1934**, *226*, 95.
5. Burger, S. R.; Bennett, J. W. Droplet enrichment factors of pigmented and nonpigmented *Serratia marcescens*: possible selective function for prodigiosin. *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, *50*, 487-490.
6. Castro, A. J. Antimalarial activity of prodigiosin. *Nature* **1967**, *213*, 903-904.
7. Boger, D. L.; Patel, M. Total synthesis of prodigiosin, prodigiosene, and desmethoxyprodigiosin: Diels-Alder reactions of heterocyclic azadienes and development of an effective palladium (II)-promoted 2,2'-bipyrrrole coupling procedure. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1405-1415.
8. Kim, H. S.; Hayashi, M.; Shibata, Y.; Wataya, Y.; Mitamura, T.; Horii, T.; Kawauchi, K.; Hirata, H.; Tsuboi, S.; Moriyama, Y. Cycloprodigiosin hydrochloride obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans* is a potent antimalarial agent. *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22*, 532-534.
9. Melo, P. S.; Durán, N.; Haun, M. Cytotoxicity of prodigiosin and benzimidazole on V79 cells. *Toxicol. Lett.* **2000**, *116*, 237-242.
10. D'Alessio, R.; Bargiotti, A.; Carlini, O.; Colotta, F.; Ferrari, M.; Gnocchi, P.; Isetta, A.; Mongelli, N.; Motta, P.; Rossi, A.; Rossi, M.; Tibolla, M.; Vanotti, E. Synthesis and immunosuppressive activity of novel prodigiosin derivatives. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2557-2565.
11. Melvin, M. S.; Tomlinson, J. T.; Saluta, G. R.; Kucera, G. L.; Lindquist, N.; Manderville, R. A. Double-strand DNA cleavage by copper-prodigiosin. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6333-6334.
12. Nakamura, A.; Nagai, K.; Ando, K.; Tamura, G. Selective suppression by prodigiosin of the mitogenic response of murine splenocytes. *J. Antibiot.* **1986**, *8*, 1155-1159.
13. Nakamura, A.; Magae, J.; Tsuji, R. F.; Yamasaki, M.; Nagai, K. Suppression of cytotoxic T cell induction *in vivo* by prodigiosin 25-C. *Transplantation* **1989**, *47*, 1013-1016.
14. Tsuji, R. F.; Yamamoto, M.; Nakamura, A.; Kataoka, T.; Magae, J.; Nagai, K.; Yamasaki, M. Selective immunosuppression of prodigiosin 25-C and FK506 in the murine immune system. *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1293-1301.

15. Tsuji, R. F.; Magae, J.; Jamashita, M.; Nagai, K.; Yamasaki, M. Immunomodulating properties of prodigiosin 25-C, an antibiotic which preferentially suppresses of cytotoxic T cells. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1295-1302.
16. Lee, M.; Kataoka, T.; Magae, J.; Nagai, K. Prodigiosin 25-C suppression of cytotoxic T cells *in vitro* and *in vivo* similar that of concanamycin B, a specific inhibitor of vacuolar type H⁺-ATPase. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1995**, *59*, 1417-1421.
17. Magae, J.; Miller, M. W.; Nagai, K.; Shearer, G. M. Effect of metacycloprodigiosin, an inhibitor of killer T cells on murine skin and heart transplants. *J. Antibios.* **1996**, *49*, 86-90.
18. Songia, S.; Mortellaro, A.; Taverna, S.; Fornasiero, C.; Scheiber, E. A.; Erba, E.; Colotta, F.; Mantovani, A.; Isetta, A. M.; Golay, J. Characterization of the new immunosuppressive drug undecylprodigiosin in human lymphocytes. *J. Immunol.* **1997**, *158*, 3987-3995.
19. Kawauchi, K.; Shibutani, K.; Yagisawa, H.; Kamata, H.; Nakatsuji, S.; Anzai, H., Yokoyama, Y.; Ikegami, Y.; Moriyama, Y.; Hirata, H. A possible immunosuppressant, cycloprodigiosin hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1997**, *237*, 543-547.
20. Han, S. B.; Kim, H. M.; Kim, Y. H.; Lee, C. W.; Jang, E. S.; Son, K. H.; Kim, S. U.; Kim, Y. K. T-cell specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia marcescens*. *Int. J. Immunopharmacol.* **1998**, *20*, 1-13.
21. Lee, M. H.; Yamashita, M.; Tsuji, R. F.; Yamasaki, M.; Kataoka, T.; Magae, J.; Nagai, K. Suppression of T cell stimulating function of allogeneic antigen presenting cells by prodigiosin 25-C. *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 92-94.
22. Mortellaro, A.; Songia, S.; Gnocchi, P.; Ferrari, M.; Fornasiero, C.; D'Alessio, R.; Isetta, A.; Colotta, F.; Golay, J. New immunosuppressive drug PNU156804 blocks IL-2-dependent proliferation and NF-kappa B and AP-1 activation. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 7102-7109.
23. Lee, M. H.; Kataoka, T.; Honjo, N.; Magae, J.; Nagai, K. *In vivo* rapid reduction of alloantigen-activated CD8⁺ mature cytotoxic T cells by inhibitors of acidification of intracellular organelles, prodigiosin 25-C and concanamycin B. *Immunology* **2000**, *99*, 243-248.
24. Azuma, T.; Watanabe, N.; Yagisawa, H.; Hirata, H.; Iwamura, M.; Kobayashi, Y. Induction of apoptosis of activated murine splenic T cells by cycloprodigiosin hydrochloride, a novel immunosuppressant. *Immunopharmacol.* **2000**, *46*, 29-37.
25. Nakai, K.; Hamada, Y.; Kato, Y.; Yamamoto, D.; Hirata, H.; Hioki, K. Cycloprodigiosin hydrochloride as an immunosuppressant in rat small bowel transplantation. *Transplant. Proc.* **2000**, *32*, 1324-1325.

26. Fürstner, A.; Grabowski, J.; Lehmann, C. W.; Kataola, T.; Nagai, K. Synthesis and biological evaluation of nonylprodigiosin and macrocyclic prodigiosin analogues. *Chem. Bio. Chem.* **2001**, *2*, 60-68.
27. Moss, J. E.; Aliprantis, A. O.; Zychlinsky, A. The regulation of apoptosis by microbial pathogens. *Int. Rev. Cytol.* **1999**, *187*, 203-259.
28. Cameron, R.; Feuer, G. In *Apoptosis and its modulation by drugs*; Cameron, R.; Feuer, G., Eds. Springer-Verlag: Berlin, **2000**, pp. 37-57.
29. Montaner, B.; Navarro, S.; Piqué, M.; Vilaseca, M.; Martinell, M.; Giralt, E.; Gil, J.; Pérez-Tomás, R. Characterization of prodigiosin as an apoptotic factor from *Serratia marcescens*. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *131*, 585-593.
30. Montaner, B.; Pérez-Tomás, R. Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sci.* **2001**, *68*, 2025-2036.
31. Díaz-Ruíz, C.; Montaner, B.; Pérez-Tomás, R. Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1. *Histol. Histopathol.* **2001**, *16*, 415-421.
32. Yamamoto, D.; Kiyozuka, Y.; Uemura, Y.; Yamamoto, C.; Takemoto, H.; Hirata, H.; Tanaka, K.; Hioki, K.; Tsubura, A. Cycloprodigiosin hydrochloride, a H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human breast cancer cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2000**, *126*, 191-197.
33. Yamamoto, D.; Uemura, Y.; Tanaka, K.; Nakai, K.; Yamamoto, C.; Takemoto, H.; Kamata, K.; Hirata, H.; Hioki, K. Cycloprodigiosin hydrochloride, H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis and differentiation in HL-60 cells. *Int. J. Cancer* **2000**, *88*, 121-128.
34. Yamamoto, C.; Takemoto, H.; Kuno, K.; Yamamoto, D.; Nakai, K.; Baden, T.; Kamata, K.; Hirata, H.; Watanabe, T.; Inoue, K. Cycloprodigiosin hydrochloride, a H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human colon cancer cell lines *in vitro*. *Oncol. Rep.* **2001**, *8*, 821-824.
35. Yamamoto, C.; Takemoto, H.; Kuno, K.; Yamamoto, D.; Tsubura, A.; Kamata, K.; Hirata, H.; Yamamoto, A.; Kano, H.; Seki, T.; Inoue, K. Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines *in vitro* and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. *Hepatology* **1999**, *30*, 894-902.
36. Stubbs, M.; Bhujwala, Z. M.; Tozer, G. M.; Rodrigues, L. M.; Maxwell, R. J.; Morgan, R.; Howe, F. A.; Griffiths, J. R. An assessment of ³¹P MRS as a method of measuring pH in rat tumours. *NMR Biomed.* **1992**, *5*, 351-359.

37. Shrode, L.D.; Tapper, H.; Grinstein, S. Role of intracellular pH in proliferation, transformation, and apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1997**, *29*, 393-399.
38. Martinez-Zaguilan, R.; Lynch, R. M.; Martinez, G. M.; Gillies, R. J. Vacuolar-type H⁺ATPases are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am. J. Physiol.* **1993**, *265*, 1015-1029.
39. Forgac, M. Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol. Rev.* **1989**, *69*, 765-796.
40. Nelson, N. Evolution of organellar proton-ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1100*, 109-124.
41. Arends, M. J.; Wyllie, A. H. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **1991**, *32*, 223-256.
42. Thangaraju, M.; Sharma, K.; Liu, D.; Shen, S. H.; Srikant, C. B. Interdependent regulation of intracellular acidification and SHP-1 in apoptosis. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1649-1654.
43. Matsuyama, S.; Llopis, J.; Deveraux, Q. L.; Tsien, R. Y.; Reed, J. C. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. *Nature Cell Biol.* **2000**, *2*, 318-325.
44. Nishihara, T.; Akifusa, S.; Koseki, T.; Kato, S.; Muro, M.; Hanada, N. Specific inhibitors of vacuolar type H⁺-ATPases induce apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *212*, 255-262.
45. Yamagata, M.; Tannock, I. F. The chronic administration of drugs that inhibit the regulation of intracellular pH: *in vitro* and anti-tumour effects. *Br. J. Cancer* **1996**, *73*, 1328-1334.
46. Sato, T.; Konno, H.; Tanaka, Y.; Kataoka, T.; Nagai, K.; Wasserman, H. H.; Ohkuma, S. Prodigiosins as a new group of H⁺/Cl⁻ symporters that uncouple proton translocators. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21455-21462.
47. Nakayasu, T.; Kawauchi, K.; Hirata, H.; Shimmen, T. Demonstration of Cl⁻ requirement for inhibition of vacuolar acidification by cycloprodigiosin *in situ*. *Plant. Cell. Physiol.* **2000**, *41*, 857-863.
48. Konno, H.; Matsuya, H.; Okamoto, M.; Sato, T.; Tanaka, Y.; Yokoyama, K.; Kataoka, T.; Nagai, K.; Wasserman, H. H.; Ohkuma, S. Prodigiosins uncouple mitochondrial and bacterial F₁F₀-ATPases: evidence for their H⁺/Cl⁻ symport activity. *J. Biochem.* **1998**, *124*, 547-556.
49. Kataoka, T.; Muroi, M.; Ohkuma, S.; Waritani, T.; Magae, J.; Takatsuki, A.; Kondo, S., Yamasaki, M.; Nagai, K. Prodigiosin 25-C uncouples vacuolar type H⁺-ATPase, inhibits vacuolar acidification and effects glycoprotein processing. *FEBS Lett.* **1995**, *359*, 53-59.

50. Matsuya, H.; Okamoto, M.; Ochi, T.; Nishikawa, A.; Shimizu, S.; Kataoka, T.; Nagai, K.; Wasserman, H. H.; Ohkuma, S. Reversible and potent uncoupling of hog gastric (H^+K^+)-ATPase by prodigiosins. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1655-1663.
51. Vander Heiden, M. G.; Thompson, C. B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nature Cell. Biol.* **1999**, *1*, 209-216.
52. Hussain, S. P.; Harris, C. C. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies for tumor suppressor genes. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 4023-4037.
53. Kirsch, D. G.; Kastan, M. B. Tumor suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J. Clin. Oncol.* **1998**, *16*, 3158-3168.
54. Wang, M. E.; Kirken, R.; Behbod, F.; Erwin-Cohen, R.; Stepkowski, S. M.; Kahan, B. D. Inhibition of Jak3 tyrosine kinase by PNU156804 blocks rat heart allograft rejection. *Transplant. proc.* **2001**, *33*, 201.
55. Brown, J. M.; Wouters, B. G. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 1391-1399.
56. Bunz, F.; Hwang, P. M.; Torraine, C.; Waldman, T.; Zhang, Y.; Dillehay, L.; Williams, J.; Lengauer, C.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 263-269.
57. Xia, Z.; Dickens, M.; Raingeaud, J.; Davis, R. J.; Greenberg, M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **1995**, *270*, 1326-1331.
58. Mansat, V.; Laurent, G.; Levade, T.; Beltaieb, A.; Jaffrezou, J. P. The protein kinase C activators phorbol esters and phosphatidylserine inhibit neutral sphingomyelinase activation, ceramide generation, and apoptosis triggered by daunorubicin. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 5300-5304.
59. Woo, K. R.; Shu, W. P.; Kong, L.; Liu, B. C. Tumor necrosis factor mediates apoptosis via Ca^{++}/Mg^{++} dependent endonuclease with protein kinase C as a possible mechanism for cytokine resistance in human renal carcinoma cells. *J. Urol.* **1996**, *155*, 1779-1783.
60. Tomei, L. D.; Kanter, P.; Wenner, C. E. Inhibition of radiation-induced apoptosis in vitro by tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**, *155*, 324-331.
61. Zanke, B. W.; Lee, C.; Arab, S.; Tannock, I. F. Death of tumor cells after intracellular acidification is dependent on stress-activated protein kinases (SAPK/JNK) pathway activation and cannot be inhibited by bcl-2 expression or interleukin 1 β -converting enzyme inhibition. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 2801-2808.

62. Montaner, B.; Pérez-Tomás, R. Activation of protein kinase C is required for protection of cells against apoptosis induced by the immunosuppressor prodigiosin. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *in press*.
63. Faris, M.; Kokot, N.; Latinis, K.; Kasibhatla, S.; Green, D. R.; Koretzky, G. A.; Nel, A. The c-Jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in Jurkat cells by up-regulating Fas ligand expression. *J. Immunol.* **1998**, *160*, 134-144.
64. Frasch, S. C.; Nick, J. A.; Fadok, V. A.; Bratton, D. L.; Worthen, G. S.; Henson, P. M. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracellular signal transduction pathways leading to apoptosis in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 8389-8397.
65. Montaner, B.; Pérez-Tomás, R. The cytotoxic prodigiosin induces phosphorylation of p38-mapk but not of SAPK/JNK. *Toxicol. Lett.* **2002**, *in press*.
66. Melvin, M. S.; Ferguson, D. C.; Lindquist, N.; Manderville, R. A. DNA binding by 4-methoxypurrolic natural products. Preference for intercalation at AT sites by tambjamine E and prodigiosin. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*: 6861-6869.
67. Fullan, N. P.; Lynch, D. L.; Ostrow, D. H. Effects of bacterial extracts on Chinese hamster cells and rat neoplasms. *Microbios Lett.* **1977**, *5*, 157-161.
68. Hannun, Y. A. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* **1997**, *89*, 1845-1853.
69. Monks, A.; Scudiero, D. A.; Johnson, G. S.; Paull, K. D.; Sausville, E. A. The NCI anti-cancer drug screen: a smart screen to identify effectors of novel targets. *Anticancer Drug Des.* **1997**, *12*, 533-541.

FIGURES

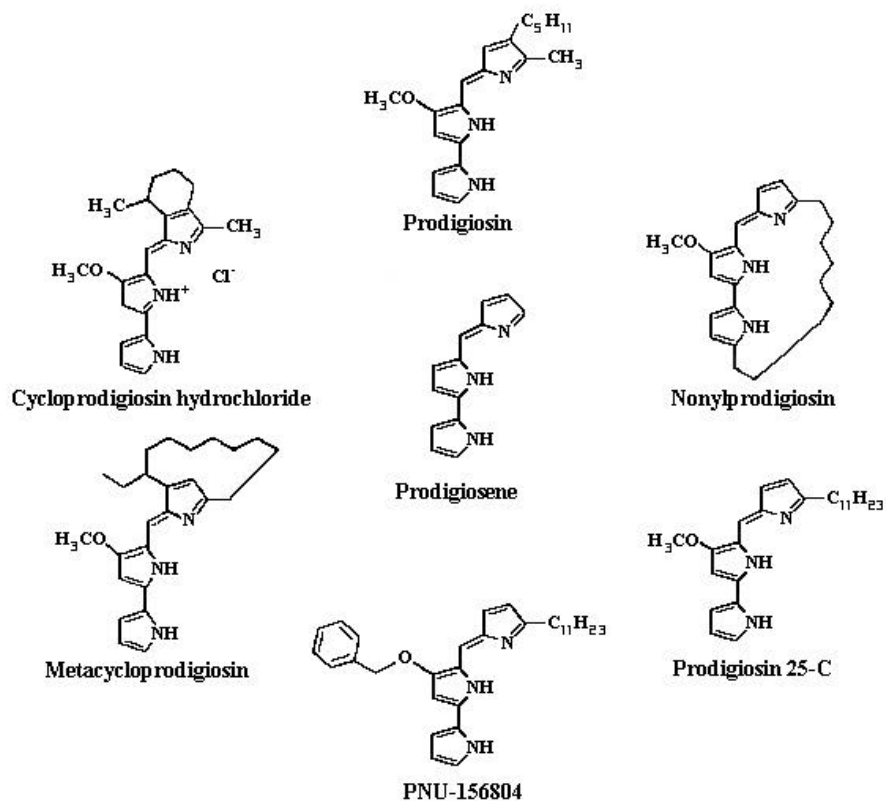


Figure 1. Structure of prodigiosene nucleus, prodigiosin, cycloprodigiosin-HCl, nonylprodigiosin, metacycloprodigiosin, prodigiosin 25-C, and PNU-156804.

PRODIGIOSIN INDUCES CASPASE 9 AND CASPASE 8 ACTIVATION AND CYTOCHROME C RELEASE IN JURKAT T CELLS

Beatriz Montaner and Ricardo Pérez-Tomás*

Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica. Cancer Cell Biology Research Group. Universitat de Barcelona. Feixa Llarga s/n. E-08907 L'Hospitalet (Barcelona), Spain.

*Correspondence and offprint requests: Phone: 34-93-4024288; Fax: 34-93-4024982; e-mail: rperez @ bell.ub.es

Running title: Prodigiosin induces caspase activation and cytochrome c release

Key words: apoptosis, caspases, cytochrome c, prodigiosin.

ABSTRACT

Prodigiosin (PG) is an active component of bacterial origin, with reported apoptotic effects. We examined the activation of caspases -9, -8, and -3 in PG-treated Jurkat cells in a dose-response study. These caspases were activated in apoptotic cells, as judged by the appearance of cleavage products from procaspases, and cytochrome c (cyt c) was released to the cytosol. In addition, PG induced the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP). This study demonstrates that the activation of caspases -9, -8, and -3 mediate PG-induced apoptosis.

INTRODUCTION

PG is member of a family of naturally occurring polypyrrole red pigments produced by microorganisms including certain strains of *Streptomyces* and *Serratia*. They have interesting immunosuppressive properties and they also induce apoptosis, although the mechanism is not clear¹. We have shown that PG triggers apoptosis in cancer cell lines, including hematopoietic cancer cells, with a rapid, potent action, although it is not toxic to non-malignant cell lines²⁻³. We have also demonstrated that PG-induced apoptosis is blocked by the broad-spectrum caspase inhibitor Z-VAD-fmk, indicating that caspases are involved in PG-induced apoptosis².

There are at least two distinct classes of caspases, initiators (e.g. caspases -8, -9 and -10), and effectors (e.g. caspase 3), which participate in a feedback amplification loop involving the initiators. Their substrates

include cytoplasmic and nuclear proteins involved in DNA repair, like PARP, and replication, RNA splicing, cytoskeletal structure, and cell division.

Here, we determine the effects of PG on various mediators of the cellular machinery causing apoptosis in PG-treated Jurkat cells.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture: Acute human T-cell leukemia cells were cultured in RPMI 1640 medium and supplemented with 10 % FBS, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin , and 2 mM L-glutamine, at 37°C, 5% CO₂ in air.

Isolation and purification of PG: PG was isolated from a culture broth of *S. marcescens* 2170 as described previously².

Western blot analysis: After cells (5×10^5 /ml) were treated with 100 to 400 nM of PG for 3 h, they were lysed with 85 mM Tris pH 6.8, 2 % SDS, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin and 0.1 mM PMSF. Protein extracts (50 µg) were electrophoresed on 10 or 12 % polyacrylamide gels and transferred to Immobilon-P membrane (Millipore, USA). Membranes were incubated overnight with polyclonal antibodies against cleaved caspase 9 (New England Biolabs, UK), caspase 3 (Pharmingen International, USA), or PARP (Cell Signaling Technology, UK), or monoclonal antibody against caspase 8 (Cell Diagnostica, Germany). Secondary antibodies conjugated to HRP were goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse (BioRad, UK). Peroxidase was developed using the SuperSignal West Pico Trial kit (Pierce, USA).

Cyt c release analysis: Release of cyt c from mitochondria to cytosol was measured by Western blot as previously described⁴. Cells were lysed with 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.05% digitonin, 25 mM Tris, pH 6.8, 1 mM DTT, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml aprotinin, and 0.1 mM PMSF), for 30 s, and then centrifuged at 12000 X g at 4 °C for 3 min. Supernatants (cytosolic extracts free of mitochondria), were electrophoresed and then analyzed by Western blot using monoclonal antibody against cyt c (Pharmingen International), as described above.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to study the mechanism of PG-induced apoptosis we determined the effects of PG on various mediators of the cellular machinery causing apoptosis. Previously, we have shown that PG induced apoptosis in hematopoietic cancer cell lines², so we performed these studies on PG-treated Jurkat cells in a dose-response study.

To analyze the involvement of cyt c release in PG-induced apoptosis, cytosolic fractions were obtained and analyzed by Western blot. As shown in Fig. 1A, PG induced the appearance of cyt c in the cytosolic fractions of Jurkat cells.

Cytosolic cyt c binds to Apaf-1 and induces activation of caspase 9. To demonstrate that this pathway is activated in PG-induced apoptosis, caspase 9 was analyzed by Western blot in whole extracts. PG induced processing of caspase 9 in Jurkat cells, as shown by the appearance of the caspase 9 intermediate cleavage product. PG also induced processing of caspases 8 and 3, as shown by the appearance of their intermediate cleavage products (Fig. 1B). In addition, PG induced cleavage of PARP (Fig. 1C), as a result of caspase 3 activation.

There are two distinct primary apoptotic signaling pathways, one of which is mediated by death receptors controlled by caspases-8/10, and the other by the release of mitochondrial cyt c to the cytosol, where it binds to Apaf-1 and activates caspase-9. Furthermore, caspase-8 does indeed participate in cyt c-mediated apoptosis, and thus may help to amplify weaker death signals and ensure that apoptosis occurs within a certain time frame. However, several recent reports have demonstrated that caspase-8 is frequently activated in response to certain apoptotic stimuli in a death receptor-independent manner⁵.

This study demonstrated that the activation of caspase-9, caspase-8 and caspase-3, mediates apoptotic cell death induced by PG and that there may be significant cross-talk between the two apoptotic signaling pathways.

REFERENCES

1. Montaner, B. & R. Pérez-Tomás. 2002. The prodigiosins: a new family of anticancer drugs. *Curr. Cancer Drug Targets* **2**: in press.
2. Montaner, B. et al. 2000. Characterization of prodigiosin as an apoptotic factor from *Serratia marcescens*. *Br. J. Pharmacol.* **131**: 585-593.

3. Montaner, B. & R. Pérez-Tomás. 2001. Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life Sci.* **68**: 2025-2036.
4. Chandra, J. et al. 1998. Proteasome inhibitors induce apoptosis in glucocorticoid-resistant chronic lymphocytic leukemic lymphocytes. *Blood* **92**: 4220-4229.
5. Tang, D., J. M. Lahti & V. J. Kidd. 2000. Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**: 9303-9307.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the grant SAF2001-3545 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología and the Marató de TV3 (ref.# 001510). The authors thank Dr. E. Giralt, M. Martinell and Dr. M. Vilaseca (Organic Chemistry Dept. and Mass Spectrometry Unit. University of Barcelona) for excellent technical assistance in purify PG.

FIGURE LEGENDS

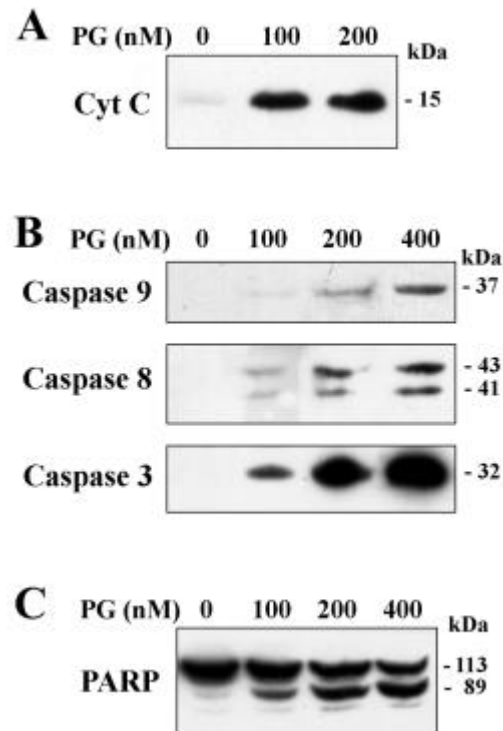


Figure 1: Effect of PG on cyt c release, caspase processing, and PARP cleavage. A) Analysis of cyt c in cytosolic extracts. B) Active caspases -9, -8, and -3, markers for cells undergoing apoptosis, are analyzed. C) Analysis of PARP cleavage. The position fo the native PARP (113 kDa) and the proteolytic fragment (89 kDa) are indicated. Results are representative of three independent experiments.