

TESI DOCTORAL

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

Marc Bataller Chardi
Barcelona, maig de 2009

DISCUSSIÓ.

5. DISCUSSIÓ.

L'activitat antitumoral de les Mitramicines està relacionada amb la unió al solc menor del DNA en seqüències riques en G/C (Barceló et al., 2007). No obstant, altres mecanismes com, per exemple, la interacció amb ions bivalents també poden tenir un paper important (DeVita et al., 2005). Tot i la seva eficàcia, l'ús de la Mitramicina A (MTA) en la quimioteràpia del càncer presenta el inconvenient, compartit amb altres fàrmacs, de la seva alta toxicitat. Durant els darrers anys s'han intensificat els esforços per tal de caracteritzar la via de síntesi de la MTA per poder "dirigir" la seva biosíntesi a l'obtenció de nous compostos més eficaços. Una de les estratègies utilitzades és la inactivació d'alguns gens implicats en la síntesi. D'aquesta manera, ha estat possible obtenir diferents anàlegs, alguns d'ells amb una millorada activitat antitumoral (Remsing et al., 2003).

El nostre grup de recerca participa en l'anàlisi detallada dels mecanisme d'acció d'un d'aquests anàlegs, la Mitramicina SK (MSK). Un punt important per a la realització de les anàlisis és trobar un sistema cel·lular adient, el qual ha de facilitar l'estudi de l'activitat antitumoral dels fàrmacs, mimetitzant en la mida que sigui possible les condicions que ens podríem trobar a l'hora d'aplicar una teràpia antitumoral. La línia cel·lular HCT116 de carcinoma de còlon humà sembla idònia per poder, quan així es requereixi, eliminar certs gens d'interès (Bunz et al., 1998). Com que una gran majoria de càncers humans presenten alteracions en el gen *p53* (Weller, 1998), hem utilitzat la línia cel·lular HCT116 *p53*^{-/-}, junt amb la seva línia parental HCT116 *p53*^{+/+}. També hem utilitzat una altra línia cel·lular per realitzar l'estudi: la línia cel·lular HCT116 *p21*^{-/-} per la importància que té el gen *p21*^{WAF1} en la regulació del cicle cel·lular, el qual és un gen que es troba mutat en un nombre molt baix de tumors (Chang et al., 2000).

L'avaluació de l'efectivitat de la MSK s'ha dirigit fundamentalment a la resposta a tres preguntes:

(a) És la MSK un agent antiproliferatiu més potent que la MTA?. Hem determinat les dosis de MTA i MSK que inhibeixen el creixement en les diferents línies

cel·lulars. Considerant que la toxicitat està relacionada amb la dosi administrada, si la MSK és capaç d'inhibir el creixement utilitzant dosis menors, es pot considerar un agent antitumoral potencialment més efectiu que la MTA.

(b) Provoca el tractament amb la MSK una resposta cel·lular diferent depenent del fons genètic de les línies cel·lulars?

(c) És la MSK un inhibidor de la transcripció de gens involucrats en el control del cicle cel·lular i de la mort cel·lular?

La MSK és un agent antiproliferatiu més potent que la MTA en línies cel·lulars de càncer de còlon humà

Estudis previs havien demostrat que la MSK era més eficaç que la MTA inhibint el creixement de 60 tipus de línies cel·lulars humanes, entre elles la línia de carcinoma de còlon humà HCT116 que conté *p53* silvestre (Rensing et al., 2003).

El punt de partida del present treball va ser determinar la capacitat de la MTA i la MSK d'inhibir la proliferació de les línies cel·lulars HCT116 *p53*^{+/+}, HCT116 *p53*^{-/-} i HCT116 *p21*^{-/-}. Es va confirmar que la MSK es de 1,3 a 2,6 vegades més potent inhibint el creixement cel·lular que la MTA (Figura R2 i Taula R1).

Les cèl·lules HCT116 *p53*^{+/+} tractades amb 25 nM MSK (IC_{75}) durant 72 hores s'acumulaven en la fase G1 (Figura R4B) amb les característiques fenotípiques de cèl·lules senescents: augment de mida, granulació i activitat SA- β -galactosidasa lisosomal a pH 6.0 (Figures R6 i R7). Hem observat que després d'aquestes 72 hores de tractament, al incubar les cèl·lules en medi lliure de fàrmac, disminueix la granularitat i l'activitat SA- β -galactosidasa lisosomal a pH 6.0 (Figures R6 i R7), la qual cosa provoca que les cèl·lules entrin de nou al cicle cel·lular i l'aparició de poliploidia (Figura R4B) com a conseqüència de l'endoreduplicació del DNA en les cèl·lules en G2 (Figura R8). A mida que augmenta el temps d'incubació s'incrementa l'aparició de cèl·lules en mitosis (Figura R9), la gran majoria d'elles presenten aberracions mitòtiques i són multinucleades degut a malformacions del fus mitòtic o a errades en la citocinesis (Figures R14 i R15). Aquestes morfologies corresponen a mort cel·lular per catàstrofe mitòtica (Castedo et al., 2004; Demidenko et al., 2008; Eom et al., 2005; Mansilla et al., 2006a). La MSK indueix catàstrofe mitòtica en cèl·lules HCT116

p53^{+/+} amb un fenotip necròtic més que no pas apoptòtic (Figura R18). Resulta sorprenent que aquestes cèl·lules presentin una clara activació de la caspasa 3 (Figures R21, R22 i R23). S'aprofundirà sobre aquesta observació en un paràgraf posterior.

També hem analitzat l'efectivitat de la MSK sobre les línies cel·lulars HCT116 p53^{-/-} i HCT116 p21^{-/-}. Aquestes línies cel·lulars tenen compromesos els punts de control de les fases G1 i G2 del cicle cel·lular (Bunz et al., 1998). A més, la línia cel·lular HCT116 p53^{-/-} té compromesa la via de l'apoptosi depenent de *p53* (Bunz et al., 1998; Bunz et al., 1999). Tant les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} tractades amb 50 nM de MSK (IC₇₅) com les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tractades amb 40 nM de MSK (IC₇₅) s'acumulen ràpidament en la fase G2/M (Figures R4C i R4D), la qual cosa indica la importància d'aquest dos gens en la regulació de la fase G1 del cicle cel·lular. Aquesta aturada en la fase G2/M no provoca que les cèl·lules entrin en senescència (Figura R6). A mida que augmenta el temps d'incubació amb el fàrmac, s'incrementa el nombre de cèl·lules presents en la fase S, sobretot en la línia cel·lular HCT116 p53^{-/-} (Figura R4C). Aquesta acumulació de cèl·lules en “la fase S” no correspon a cèl·lules sintetitzant DNA, sinó a cèl·lules mortes des de la fase G2 (Figura R8). En les línies cel·lulars deficientes en *p53* i *p21^{WAF1}*, el canvi de medi de cultiu a les 72 hores de tractament provoca que la població cel·lular es mori de manera dràstica. A l'analitzar el tipus de mort cel·lular, clarament veiem que ambdues línies cel·lulars moren amb un fenotip apoptòtic (Figures R19 i R20), observant morfologies típiques de l'apoptosi, com ara nuclis fragmentats (Figura R16) o cossos apoptòtics (Figura R17).

La línia cel·lular HCT116 p53^{-/-} tractada amb MSK no presenta activitat caspasa 3 (Figures R21, R22 i R24A), però sí activació de la caspasa 2 (Figura R25) en un procés que sembla ser independent de la mitocondria (Figura R26). La caspasa 2 ha estat considerada una caspasa iniciadora de la resposta intrínseca de l'apoptosi, però recentment s'ha demostrat que l'apoptosi es pot dur a terme mitjançant la seva activitat, independent de la mitocondria, i de l'activació de la caspasa 3 tant en cèl·lules amb *p53* mutada com deficientes en *p53*, com ara les HCT116 p53^{-/-} entre altres (Krumshnabel et al., 2009; Sidi et al., 2008). La via d'activació de l'apoptosi depenent de *p53*, necessita activar Bax per poder dissipar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mi}$) i alliberar el citocrom c al citosol (veure Figura I7). D'aquesta manera, es forma l'apoptosoma activant les caspases efectores, entre elles la caspasa 3 (Li & Yuan, 2008).

En el nostre cas, l'apoptosi s'activa de manera independent de *p53* mitjançant la caspasa 2, per aquest motiu no observem activitat caspasa 3 ni canvis en el $\Delta\Psi_{mi}$.

La línia cel·lular HCT116 *p21*^{-/-} tractada amb MSK també presenta un cert percentatge de poliploïdia (més del 8%), la qual apareix com a conseqüència de l'endoreduplicació de les cèl·lules en fase G2 (Figura R8). D'aquesta manera també observem la presència de cèl·lules multinucleades (Figura R17). La població control (cèl·lules no tractades) d'aquesta línia cel·lular presenta de fet un petit percentatge de mort cel·lular. No observem diferències significatives en l'activitat de la caspasa 3 al comparar les cèl·lules control i les cèl·lules tractades (Figures R21, R22 i R24B). En cèl·lules HCT116 *p21*^{-/-} tractades amb MSK observem que la totalitat de cèl·lules que presenten activitat caspasa 3, detectada mitjançant un anticòs específic per detectar la forma activa de la caspasa 3, són cèl·lules amb una mida major a les cèl·lules control (comparar la mida de les cèl·lules en la Figura R24B) i com a conseqüència suposem que es tracta de cèl·lules amb un contingut de DNA superior a 4N. També observem que, al igual que les HCT116 *p53*^{-/-}, presenten una elevada activitat caspasa 2 (Figura R25). Però en aquest cas, l'activitat caspasa 2 està associada a un decreixement del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mi}$) (Figura R26), indicant que el citocrom c es pot alliberar al citosol i activar la formació de l'apoptosoma. D'aquesta manera, s'activarien les caspases efectores, entre elles la caspasa 3 (Figura R24B).

El tractament de cèl·lules HCT116 amb MSK provoca respostes cel·lulars diferents que depenen del fons genètic de les línies cel·lulars

La Taula D1 mostra un resum de les conseqüències més rellevants causades pel tractament de les tres línies de cèl·lules HCT116 amb la Mitramicina SK. Si comparem les IC_{75} a les 72 hores de tractament, observem que les cèl·lules HCT116 *p53*^{+/+} presenten una IC_{75} inferior a les de les cèl·lules deficientes en *p53* i *p21*^{WAF1}. L'efecte de la MSK en aquesta línia cel·lular, a les 72 hores, és una inhibició del creixement en lloc d'una activació de la mort cel·lular. La IC_{75} és molt similar en les cèl·lules HCT116 *p53*^{-/-} i HCT116 *p21*^{-/-} i més elevada que la de les cèl·lules parentals amb *p53* silvestre, indicant un cert grau de resistència produït per les deleccions de *p53* i *p21*^{WAF1}.

Taula D1. Taula comparativa de la resposta cel·lular al tractament amb la corresponent IC₇₅ de Mitramicina SK de les diferents línies de cèl·lules HCT116 analitzades.

	HCT116 p53+/+	HCT116 p53-/-	HCT116 p21-/-
IC₇₅ MSK (nM)	23.96 ± 4.40	47.56 ± 6.71	40.97 ± 1.77
Distribució del cycle cel·lular	Fins a les 72 h^a: Parada en G1 Després de 72 h^b: Poliploïdia i mort cel·lular	Fins a les 72 h^a: Parada en G2 Després de 72 h^b: Mort cel·lular	Fins a les 72 h^a: Parada en G2 Després de 72 h^b: Mort cel·lular
Tipus de mort cel·lular	Catàstrofe mitòtica amb fenotip necròtic	Apoptosi des de G2	Apoptosi des de G2 o al sortir d'una mitosis aberrant
Activitat caspasa	Caspasa 3	Caspasa 2	Caspasa 2

a) Tractament continu b) Cèl·lules incubades en medi fresc sense fàrmac.

La MSK produeix poliploïdia en cèl·lules HCT116 p53+/+, després d'una aturada transitòria en la fase G1 del cycle cel·lular. Una cèl·lula no-tumoral evita la formació de poliploïdies mitjançant el punt de control de G1 dependent de p53, el punt de control de G2, i el punt de control mitòtic (Storchova & Pellman, 2004). Tanmateix, la poliploïdia també es pot evitar mitjançant el “punt de control tetraploide” que prevé la reentrada a la mitosis d'aquestes cèl·lules (Blagosklonny, 2007; Castedo et al., 2006). Aquest “punt de control tetraploide” requereix, junt amb el punt de control mitòtic intacte, la presència de p53, la qual cosa és fonamental per la parada en la fase G1 post-mitòtica i la prevenció de poliploïdies després de la sortida de la mitosis (Castedo et al., 2006; Vogel et al., 2004). Després del canvi de medi, s'observa una baixada dràstica dels nivells de p53 en les cèl·lules HCT116 p53+/+ (Figura R29A). Aquest resultat està

d'acord amb observacions prèvies en que tant l'acumulació de p53 com una parada prolongada en mitosis, són necessàries per a que la cèl·lula s'aturi en la fase G1 post-mitòtica (Vogel et al., 2004). Els nostres resultats suggereixen que la MSK facilita la reentrada de les cèl·lules en mitosis, causant així la catàstrofe mitòtica. No obstant això, les cèl·lules HCT116 p53^{-/-}, les quals tenen compromesos els punts de control del cicle cel·lular (Bunz et al., 1998), moren des de G2 per apoptosi independent de p53 després del tractament amb la MSK. L'apoptosi des de G2 en cèl·lules deficientes en p53 ha estat àmpliament estudiada (Casenghi et al., 1999; White, 1996). Això està d'acord amb un estudi que descriu que la deleció del gen p53 en cèl·lules HCT116 augmenta la mort cel·lular per apoptosi induïda pel tractament amb alguns fàrmacs antitumorals (Bunz et al., 1999). Les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tractades amb MSK també moren majoritàriament per apoptosi des de G2 amb activitat caspasa 2 (Figura R25), encara que algunes cèl·lules entren en mitosis però no es divideixen, apareixent cèl·lules amb un contingut de DNA més elevat. S'ha descrit que p21^{WAF1} pot evitar la formació de cèl·lules tetraploides que resultin d'un error en la mitosis mitjançant la inducció de l'aturada del cicle cel·lular d'aquestes cèl·lules post-mitòtiques (Andreassen et al., 2001). Aquesta situació no es factible en les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tractades amb MSK. Per aquesta raó, les cèl·lules que entren en mitosis sense haver-se dividit, eviten l'aturada del cicle cel·lular i tornen a sintetitzar DNA (Figura R8), per la qual cosa apareixen cèl·lules >4N (Figura R17).

Tot i la presència d'activitat caspasa 3, les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} tractades amb MSK moren principalment per necrosi (Figura R18). S'ha suggerit que, quan la catàstrofe mitòtica ocorre després d'un dany al DNA, les cèl·lules poden patir un procés de multinucleació seguit d'una mort no apoptòtica (Blagosklonny, 2007), a causa de que les cèl·lules propenses a morir per apoptosi moren abans d'entrar en mitosis. En els darrers anys, s'ha demostrat que els mecanismes de mort cel·lular tant dependents com independents de caspases després d'una mitosis aberrant (Bataller & Portugal, 2005; Eom et al., 2005; Mansilla et al., 2006b; Vakifahmetoglu et al., 2008) poden donar lloc a una mort que comparteix certes característiques amb la necrosi i/o l'apoptosi (Mansilla et al., 2006a; Roninson et al., 2001). La *regulació negativa* de p53 per la MSK, tant a nivell de RNA (Figura R27) com de proteïna (Figura R29A) i l'aparició de cèl·lules gegants (Figures R14 i R15), les quals són la conseqüència de cèl·lules reentrant en mitosis junt amb l'absència de citocinesis, podrien produir cèl·lules que

moren per un mal funcionament general, fent més permeables les membranes cel·lulars. Això explicaria l'alt percentatge de cèl·lules positives per iodur de propidi (Figura R18). Tot i que no és gaire comú observar necrosi amb presència d'activitat caspasa, s'ha demostrat que, tant en cèl·lules en cultiu com en certs teixits, es pot observar activitat caspasa 3 durant l'aparició de necrosi (Niquet et al., 2004; Niquet et al., 2007).

Quan la p53 s'activa en resposta a errors en la regulació del cicle cel·lular, les vies proapoptòtiques també poden ser activades. Hem demostrat que la inhibició de l'expressió de p53 per la MSK dona com a resultat la generació d'un estat poliploide, mentre que l'augment de l'expressió de p21^{WAF1} contribueix a mantenir aquest estat (Figura R27). Aquesta observació està d'acord amb que p21^{WAF1} no és només un mediador del supressor de tumors p53 (El-Deiry et al., 1993) sinó que també és un regulador negatiu de l'estabilitat de p53 (Broude et al., 2007).

Encara que s'ha proposat que les cèl·lules tetraploides haurien de morir per apoptosi com a mecanisme de salvaguarda de la resta de les cèl·lules (Castedo et al., 2006), es pot concloure que la necrosi podria reemplaçar aquest procés (Bataller et al., 2008). Cal puntualitzar que les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} no són necessàriament poliploides (Bunz et al., 1998). Per tant, altres gens també han d'estar involucrats en la prevenció de la formació de poliploidies (Vogel et al., 2007). Encara que p53 es funcional després d'un dany al DNA, i és essencial per controlar la mort cel·lular (Bunz et al., 1998; Giono & Manfredi, 2006), els resultats presentats en aquesta memòria suggereixen que la inhibició directa per la MSK de p53 o dels seus gens diana, com ara p21^{WAF1}, està relacionada amb el mecanisme pel qual les cèl·lules reentren en mitosis.

La MSK és un inhibidor de la transcripció de gens involucrats en la regulació del cicle cel·lular i la mort cel·lular

Les Mitramicines han estat caracteritzades com inhibidors de la transcripció gènica (Albertini et al., 2006; Bataller et al., 2008; Blume et al., 1991; Koutsodontis & Kardassis, 2004; Previdi et al., 2006; Wang et al., 2008). La inhibició per la MTA de la unió de Sp1 als promotors de varis gens dianes de p53, així com del gen p21^{WAF1} i certs gens proapoptòtics, elimina l'activació de la transcripció d'aquests gens per p53, un mecanisme que podria explicar alguns dels efectes anti-apoptòtics i supressors de

tumors d'aquest fàrmac (Koutsodontis & Kardassis, 2004). Basat en els nostres resultants, proposem que aquesta inhibició també té lloc amb la MSK, la qual té una estructura molt similar mentre que representa una millora terapèutica comparada a la MTA (Previdi et al., 2006; Remsing et al., 2003). Hem observat que la MSK inhibeix la transcripció de *p53* i d'altres gens involucrats en la regulació del cicle cel·lular (Figura R27). Tots els gens estudiats, a excepció del gen de *p53*, tenen seqüències d'unió a Sp1 en els seus promotors (Mansilla & Portugal, 2008; Tapias et al., 2008). Aquests resultats ens indiquen que *p53* no causa una activació transcripcional eficient de gens clau en les cèl·lules HCT116 *p53*^{+/+} tractades amb la MSK. L'efecte que produeix la MSK sobre els nivells de la proteïna *p53* un cop es canvia el medi de cultiu fa que es comportin com si fossin cèl·lules deficientes en *p53*, tot i que els nostres resultats indiquen que el seu comportament no és el mateix que el de les cèl·lules HCT116 *p53*^{-/-} tractades amb MSK. La principal raó per a aquesta situació és que els efectes de la MSK sobre la transcripció han de ser més complexos que la simple reducció dels nivells de *p53*. Hem de destacar que en totes les línies cel·lulars observem una disminució, en alguns casos més pronunciada que en altres, del gen *c-myc* que concorda amb unes observacions preliminars de l'efecte de la MSK i de la Mitramicina SDK (MSDK) que indiquen que aquestes molècules posseeixen una potent activitat antitumoral en ratolins *xenotrasplantats* amb cèl·lules de carcinoma d'ovari humà, la qual cosa s'ha suggerit que té lloc a través de la inhibició de *c-myc* (Previdi et al., 2006).

A l'hora d'estudiar el comportament de les línies cel·lulars en front al tractament amb MSK no només ens hem de centrar en la transcripció dels gens implicats en la regulació del cicle cel·lular o mort cel·lular, ja que són les proteïnes per les que codifiquen les que donaran sentit a la resposta cel·lular. En els casos de les línies HCT116 *p53*^{+/+} i HCT116 *p53*^{-/-} els nivells de transcripció dels gens i els nivells d'expressió de les proteïnes es correlacionen prou bé (comparar la Figura R27 i Figura R28A amb la Figura R29 i Figura R30). Això no ocorre amb la línia HCT116 *p21*^{-/-} on sorprèn el cas de *p53* ja que s'observa una inhibició de la transcripció molt evident a les 24 hores (Figura R28B), però els nivells de proteïna incrementen contínuament fins a les 72 hores de tractament (Figura R31). Hem de puntualitzar que per a que les cèl·lules HCT116 *p21*^{-/-} es quedin aturades en la fase G2 del cicle cel·lular (Figura R4D) es requereix *p53* (Bunz et al., 1998), així que no resulta estrany observar nivells alts d'aquesta proteïna.

La catàstrofe mitòtica es pot considerar una via alternativa a l'hora dissenyar noves teràpies antitumorals, especialment en el tractament de tumors sòlids, donat que la majoria d'ells tenen defectes en la via de l'apoptosi (Brown & Attardi, 2005; Roninson et al., 2001). Mentre que s'han identificat nombroses proteïnes que formen part de la via de l'apoptosi, avui en dia encara no es coneixen gens específics involucrats en la catàstrofe mitòtica, més enllà d'algunes proteïnes que regulen els punts de control cel·lular (Castedo et al., 2004; Mansilla et al., 2006a; Roninson et al., 2001). En aquest sentit, el coneixement sobre el paper de p53 i p21^{WAF1} en aquest procés és escàs i, en alguns casos, contradictori (Levesque & Eastman, 2007); així com també el paper de les diferents caspases durant la catàstrofe mitòtica (Mansilla et al., 2006b).

Donada aquesta controvèrsia, i amb la finalitat d'unificar entre sí les teories proposades pels diferents grups de recerca, i situar-les en el context dels nostres resultats, es presenten en les Figures D1, D2 i D3 les diferents situacions que podrien explicar les respostes cel·lulars observades. La Figura D1 mostra el model que proposem per les cèl·lules HCT116 p53^{+/+} tractades amb la MSK. La importància de p53 i p21^{WAF1} en la regulació del cicle cel·lular és clau per explicar el destí d'aquesta línia cel·lular. Durant les 72 hores de tractament són les responsables d'aturar les cèl·lules en la fase G1 del cicle cel·lular, evitant que les cèl·lules es divideixin prevenint errors al DNA (Toettcher et al., 2009). Aquesta parada en el cicle cel·lular en la fase G1 ve acompanyada d'un fenotip senescent gracies a l'augment de p21^{WAF1} (Chang et al., 1999). La degradació de p53 i la progressiva inhibició de p21^{WAF1} per c-myc (Vigneron et al., 2005), provoca la pèrdua del fenotip senescent i la reentrada en el cicle cel·lular. Això condueix a les cèl·lules a entrar en mitosis sense una regulació correcta dels punts de control, provocant l'aparició de cèl·lules poliploides com a conseqüència d'aberracions mitòtiques. Finalment, aquestes cèl·lules moren per catàstrofe mitòtica amb fenotip necròtic i en presència d'activitat caspasa 3. Un percentatge molt reduït d'aquestes cèl·lules poliploides seguiran replicant el seu DNA, augmentant la mida cel·lular i la ploïdia, però sense tenir capacitat de proliferació. Hem de considerar que aquestes cèl·lules no podran ser viables en cap cas degut a l'acumulació d'aberracions.

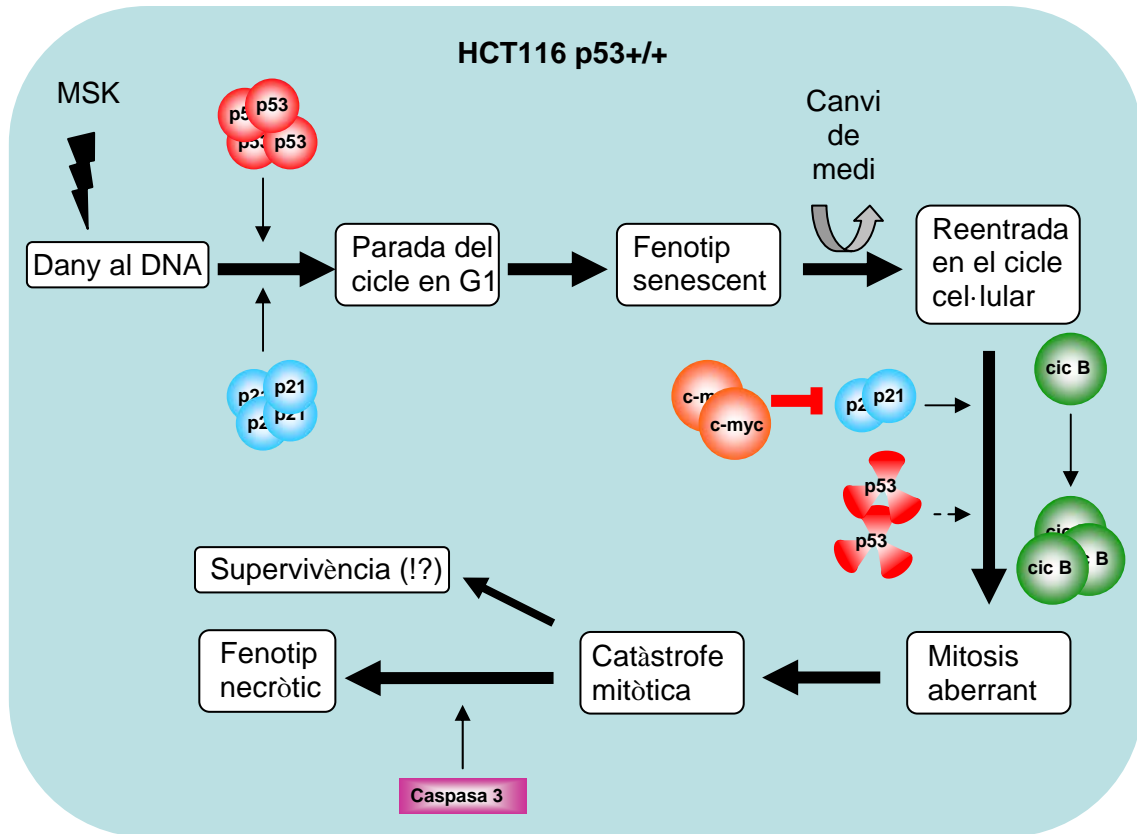


Figura D1. Model que il·lustra la resposta cel·lular de les cèl·lules HCT116 p53+/+ en front al tractament amb MSK. El tractament amb MSK provoca un augment dels nivells de p53 i p21^{WAF1}, aturant les cèl·lules en la fase G1 del cicle cel·lular, presentant un fenotip senescent. Un cop canviem el medi de cultiu, les cèl·lules tornen a entrar en el cicle cel·lular gracies a la inhibició progressiva de p21^{WAF1} mitjançant c-myc i la ràpida degradació de p53, impedit que aquestes dues proteïnes puguin regular el cicle cel·lular. L'augment de la ciclina B ens indica un augment de cèl·lules en la fase del cicle cel·lular en G2 i/o en mitosi. La falta de regulació d'aquestes cèl·lules provoca l'aparició de mitosis aberrants i cèl·lules multinucleades amb una morfologia de catàstrofe mitòtica. La gran majoria d'aquestes cèl·lules moren per necrosi amb presència d'activitat caspasa 3, mentre que d'altres sobreviuen més de 20 dies, tot i que no tenen capacitat de proliferar.

En cèl·lules HCT116 p53^{-/-} tractades amb MSK el model que proposem és diferent (Figura D2). Les cèl·lules deficientes en p53 han perdut el punt de control de la fase G1 i s'aturen en la fase G2 gràcies a p21^{WAF1}. Un cop p21^{WAF1} es degrada, les cèl·lules moren per apoptosi, sense entrar en mitosi. La caspasa 2 és la responsable de l'apoptosi, en un procés independent de la mitocondria i sense activació de la caspasa 3 (Figures R21, R22 i R24A).

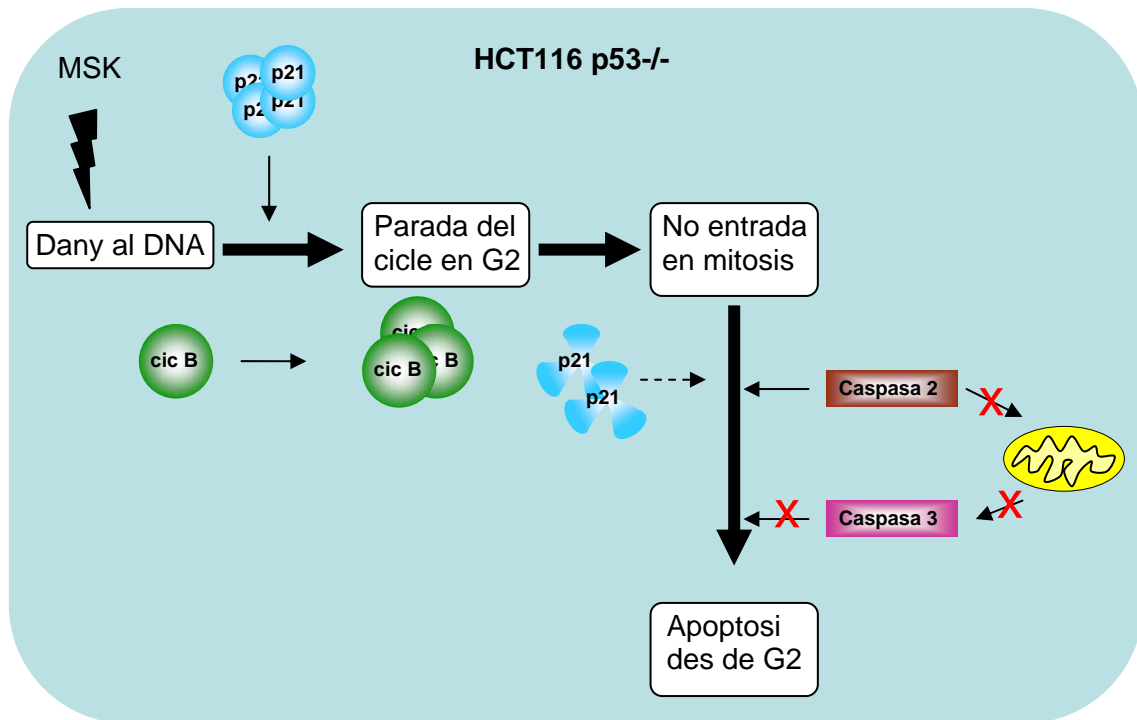


Figura D2. Model que il·lustra la resposta cel·lular de les cèl·lules HCT116 p53^{-/-} en front al tractament amb MSK. El tractament amb MSK provoca un augment dels nivells de ciclina B i p21^{WAF1}, aturant les cèl·lules en la fase G2 del cicle cel·lular. Un cop canviem el medi de cultiu, p21^{WAF1} es degrada ràpidament i les cèl·lules es moren per apoptosi independent de p53 mitjançant la caspasa 2. La via intrínseca de l'apoptosi no està activada ja que no trobem canvis de potencial mitocondrial ni activitat caspasa 3.

En cèl·lules HCT116 p21^{-/-} tractades amb MSK el model que proposem es mostra en la Figura D3. Les cèl·lules deficientes en p21^{WAF1}, al igual que les deficientes en p53, han perdut el punt de control de la fase G1 i s'aturen en la fase G2, però en aquest cas la regulació de la fase G2 també es pot dur a terme mitjançant p53 per l'activació de 14-3-3σ o GADD45 (Figura I4). Un petit percentatge de cèl·lules escapen del control de la fase G2 i entren en mitosis en absència de citocinesis i esdevenen cèl·lules multinucleades. La majoria de la població acaba morint per apoptosi des de G2 sense entrar en mitosis. En aquestes cèl·lules l'apoptosi es porta a terme per la via intrínseca. El dany al DNA provocat pel tractament amb MSK activa a p53, la qual activa a la caspasa 2. La dissipació del potencial de membrana mitocondrial afavoreix la formació de l'apoptosoma i la conseqüent activació de les caspases efectores, com ara la caspasa 3.

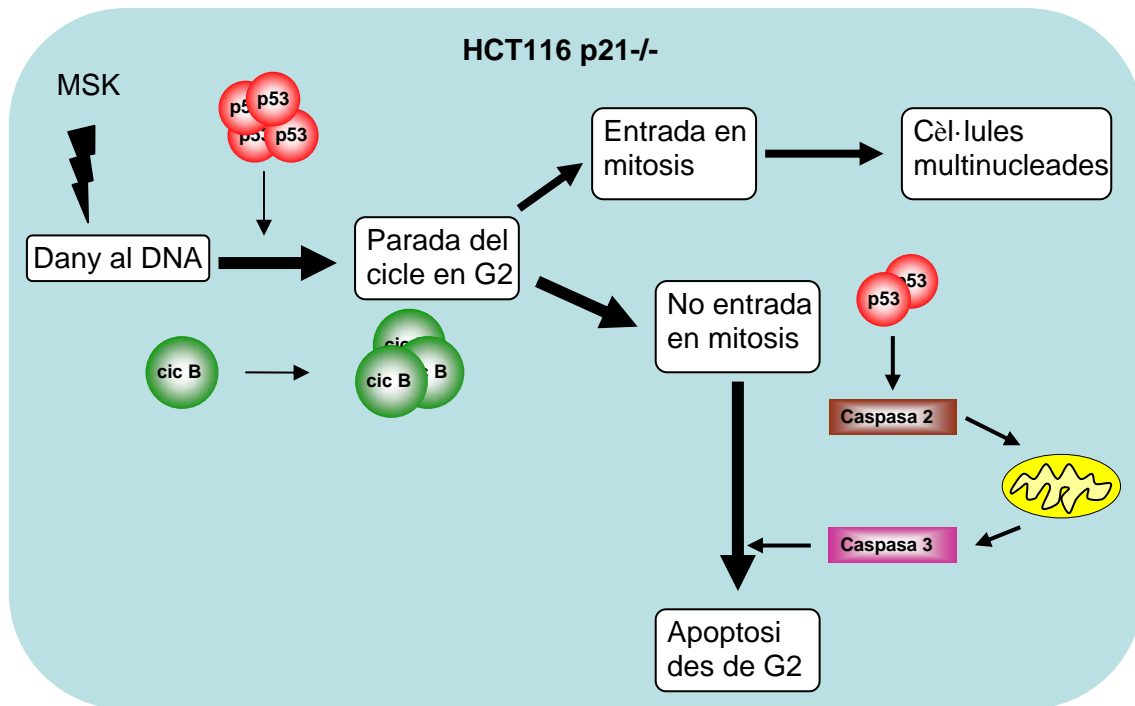


Figura D3. Model que il·lustra la resposta cel·lular de les cèl·lules HCT116 p21^{-/-} en front al tractament amb MSK. El tractament amb MSK provoca un augment dels nivells de ciclina B i p53, aturant les cèl·lules en la fase G2 del cicle cel·lular. Algunes d'aquestes cèl·lules escapen del control del cicle cel·lular i entren en mitosis prematurament, provocant l'aparició de cèl·lules multinucleades. Les cèl·lules aturades en G2 acaben morint per la via intrínseca de l'apoptosi.

Darrerament s'ha identificat un tipus d'apoptosi que difereix del clàssic procés que depèn de la mitocondria o dels “receptors de mort” (Krumshabel et al., 2009; Sidi et al., 2008). El dany al DNA junt amb la inactivació de *Chk1* activa la via de la caspasa 2, especialment en cèl·lules deficientes en *p53* (Sidi et al., 2008). La Chk1 és una quinasa que fosforila a *cdc25* impedit la progressió a través de la fase G2 del cicle quan la cèl·lula detecta un dany al DNA (Figura I4) i (Enders, 2008; Mansilla et al., 2006a). El tractament amb MSK inhibeix la transcripció del gen de *Chk1* (Figura R27B), la qual cosa, junt amb el dany al DNA que produeix la MSK, sembla ser la responsable de l'activació de la caspasa 2. Aquests estudis estarien d'acord amb els resultats presentats en aquesta memòria, i aporten un major coneixement sobre el mecanisme d'acció de la via de la caspasa 2.

Algunes cèl·lules poliploides induïdes per el tractament amb MSK poden sobreviure en absència de citocinesis

Encara que la majoria de les cèl·lules HCT116 p53+/+ moren al cap del temps, algunes aconsegueixen romandre vives després de la incubació de 14 dies en medi lliure de fàrmac, la qual cosa, afegit a les 72 hores de tractament amb el fàrmac i les 72 hores abans de ressemar-les, representa una supervivència mitjana d'almenys 20 dies. *Sensu stricto*, el resultat d'aquest assaig no pot ser considerat un assaig clonogènic (Figura R33) atès que les cèl·lules no es divideixen formant clons sinó que entren en varies rondes de endoreplicació i mitosis en absència de citocinesis, amb aparició de poliploidies precedides d'aneuploidies, en concordança amb l'estudi publicat per (Vogel et al., 2004). Es pot hipotetitzar que les cèl·lules que sobreviuen podrien patir un augment dels nivells de la proteïna p21^{WAF1}, la qual cosa ha estat identificada com la major causa d'instabilitat gènica i progressió tumoral (Chang et al., 2000).

L'estudi en profunditat dels anàlegs de la MTA ens pot proporcionar agents efectius contra el càncer

La capacitat de les Mitramicines, i d'altres fàrmacs com les Antraciclines, d'inhibir la interacció de Sp1 amb les seves seqüències *consensus* a certs promotors gènics pot ser de gran ajuda a l'hora d'entendre els mecanismes d'acció, i de combinar els efectes amb fàrmacs antitumorals (Mansilla & Portugal, 2008). Degut a l'amplitud de dianes que hom a d'afrontar per combatre al càncer, es necessita la combinació de diferents fàrmacs amb efectes diversos a l'hora de tractar a un pacient amb càncer. Utilitzant models de ratolins *xenotrasplantats* amb cèl·lules tumorals pancreàtiques d'origen humà, Jia i col·laboradors han estudiat l'efecte del Bevacizumab, un anticòs que neutralitza el factor VEGF (de l'anglès *Vascular Endothelial Growth Factor*) i inhibeix l'angiogènesis, en combinació amb la Mitramicina A (Jia et al., 2007). Anteriorment s'havia demostrat que el tractament amb Bevacizumab augmentava l'expressió de *Sp1* i la conseqüent activació de gens implicats en l'angiogènesis (Wei et al., 2004). L'administració del Bevacizumab o la MTA per separat només produeix una activitat antitumoral marginal, mentre que l'administració d'ambdós fàrmacs produeix sinergisme en l'activitat antitumoral (Figura D4). L'ús d'ambdós fàrmacs simultàniament produeix un augment de l'activitat antitumoral respecte a l'ús del

Bevacizumab o la MTA per separat sense augmentar la citotoxicitat, suggerint que el tractament del càncer pancreàtic amb la combinació del Bevacizumab i la MTA presenta una millora terapèutica significant (Jia et al., 2007). Les millores terapèutiques que han demostrat tenir la MSK i la MSDK respecte a la MTA (Albertini et al., 2006) esdevenen clau per poder considerar que aquests anàlegs també es poden utilitzar en l'optimització del sinergisme de fàrmacs antitumorals.

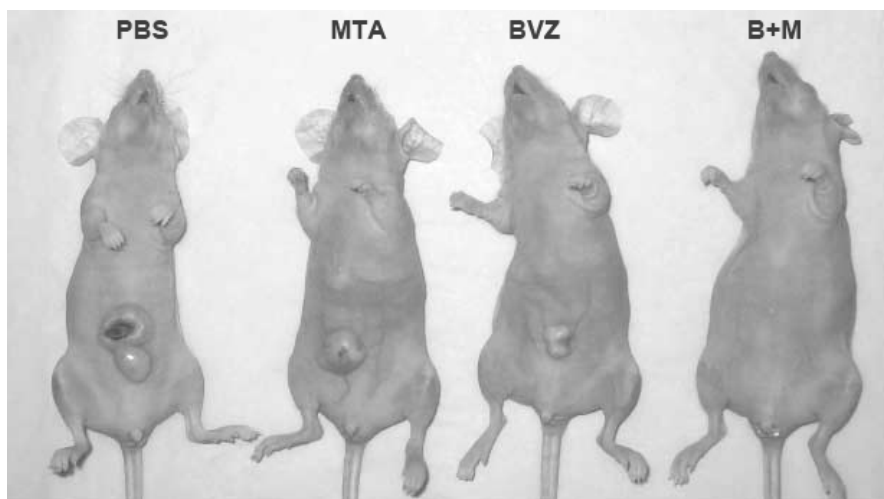


Figura D4. Mida representativa de tumors de pàncrees humans *xenotrasplantats* en ratolins. S'observa el sinergisme entre la Mitramicina A (MTA) i el Bevacizumab (BVZ). S'ha proposat que la combinació dels dos fàrmacs resultaria efectiva per la teràpia antiangiogènica del càncer de pàncrees (Jia et al., 2007).

S'han utilitzat *microarrays* per caracteritzar millor l'efecte dels anàlegs de la Mitramicina A sobre la transcripció, arribant a la conclusió que aquests anàlegs inhibeixen la transcripció de gens involucrats en la regulació del cicle, proliferació i supervivència cel·lular, així com la migració cel·lular, invasió i angiogènesis (Albertini et al., 2006). Tot sembla indicar, els anàlegs de la MTA podrien ser més eficients a l'hora de modular la sensibilitat de les cèl·lules tumorals a la quimioteràpia, tal i com s'ha proposat recentment per la MTA (Duverger et al., 2004).

En el nostre laboratori estem treballant en la determinació de la seqüència d'unió al DNA de les diferents Mitramicines i Cromomicines, mitjançant l'anàlisi de la capacitat d'inhibir la digestió amb diferents enzims de restricció de DNA plasmídic en presència o absència dels diversos fàrmacs. Amb aquesta informació serà més fàcil poder determinar quins gens seran més propensos a ser inhibits per les diferents molècules si posseeixen aquestes seqüències en el seu promotor i així poder dirigir

millor l'anàlisi dels efectes observats (Mansilla et al., -manuscrit en preparació-). Treball que caldrà corroborar en un abordament posterior tan *genòmic* com *proteòmic* que pugui indicar-nos nous detalls sobre els mecanismes d'acció d'aquests fàrmacs.

La connexió entre la catàstrofe mitòtica i la maquinaria apoptòtica roman difícil d'explicar i requereix, hores d'ara, una caracterització més a fons. Les diferents respostes observades en les cèl·lules HCT116 a la citotoxicitat induïda per la MSK suggereixen que l'activació de l'apoptosi després d'un dany al DNA depèn no solament de la concentració del fàrmac, com ja s'havia suggerit prèviament (Levesque & Eastman, 2007; Mansilla et al., 2003), sinó que també, tal i com es descriu en aquesta memòria, depèn del fons genètic de la cèl·lula i no només de l'estat de p53.

Existeixen motius per considerar que les anàlisis dels canvis en les vies cel·lulars induïdes pels nous anàlegs de les Mitramicines, com ara la MSK, podria dotar-nos d'uns agents efectius contra el càncer de còlon, i d'altres tumors (Albertini et al., 2006). El càncer de còlon és una de les principals causes de mort per càncer arreu del món (Ferlay et al., 2007; Jemal et al., 2008). A Europa, el càncer més comú és el càncer de pit (13,5%), sent el càncer de còlon el segon (12,9%), mentre que el càncer de pulmó és la principal causa de mort per càncer (19,7%), també seguit pel càncer de còlon (12,2%) (Ferlay et al., 2007). Aquestes dades col·loquen al càncer de còlon en l'avantguarda dels estudis per combatre el càncer. En els primers estadis del càncer de còlon, la cirurgia ha demostrat ser molt eficient, però la toxicitat i el desenvolupament de resistència a la quimioteràpia requereix el desenvolupament de nous fàrmacs. La disponibilitat de noves mitramicines amb diferents perfils farmacològics (Previdi et al., 2006; Remsing et al., 2003) es previsible que ens proporcionarà unes aplicacions terapèutiques millorades.

