



Universidad de Oviedo

Programa de doctorado Investigación en cáncer

Efecto de la combinación de inhibidores de topoisomerasa II e
inhibidores de la reparación del DNA en células tumorales

Tesis doctoral

Lorea Josefina Ugarte Gil

Oviedo, 2015



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

| 1.- Título de la Tesis | |
|--|--|
| Español: Efecto de la combinación de inhibidores de topoisomerasa II e inhibidores de la reparación del DNA en células tumorales | Inglés: Effect of topoisomerase II inhibitors and DNA repair inhibitors in tumor cells |
| 2.- Autor | |
| Nombre: LOREA JOSEFINA UGARTE GIL | DNI/Pasaporte/NIE: |
| Programa de Doctorado: Biología funcional y molecular (interdepartamental) | |
| Órgano responsable: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA | |

RESUMEN (en español)

Actualmente el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata se aborda con terapias como la cirugía, la radioterapia y los fármacos antiandrógenos, aunque su progreso hacia un estado refractario hormonal hace que la quimioterapia sea el tratamiento más eficaz. A pesar de la mejora en la supervivencia de los pacientes, los procesos de resistencia y los efectos secundarios indican que es importante identificar nuevas dianas terapéuticas en este tipo de tumores. El DNA es la principal diana de muchos agentes antitumorales convencionales. En particular, los fármacos inhibidores de la reparación del DNA han demostrado sensibilizar, tanto en combinación como en solitario, una gran variedad de células tumorales, por lo que constituyen una estrategia atractiva en la terapia del cáncer. El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido investigar el efecto de la combinación de inhibidores de topoisomerasa II con fármacos inhibidores de la reparación del DNA en la línea tumoral de próstata PC-3.

Tras un estudio previo del efecto en solitario de la mitoxantrona, la doxorubicina, de los fármacos antimetabólicos vincristina y paclitaxel, de los inhibidores de la reparación del DNA NU7026 y NU7441 y del inhibidor de ATM KU55933, los tratamientos combinados demuestran que la inhibición de DNA-PK aumenta significativamente la sensibilidad de las células PC-3 al tratamiento con mitoxantrona y vincristina. La combinación de mitoxantrona con los inhibidores de DNA-PK implica un efecto citotóxico de tipo sinérgico, estudiado por primera vez entre estos compuestos.

Nuestros resultados demuestran que la combinación de mitoxantrona o doxorubicina con los inhibidores de DNA-PK incrementa levemente la inducción de roturas de doble cadena (DSB), especialmente en las primeras horas de tratamiento y con concentraciones bajas de los inhibidores de TOP2, medida por la fosforilación de la histona H2AX y la visualización del DNA fragmentado por ensayos de cometa. La ATM es la principal quinasa responsable de la fosforilación de H2AX y la DNA-PK no puede fosforilar H2AX en presencia de ATM inhibida por KU55933. Por otro lado, observamos que la inhibición de la DNA-PK conlleva un retraso en la reparación de las DSB inducidas por mitoxantrona y una inhibición de la actividad reparadora del sistema HR medido por la acumulación de Rad51. Nuestros datos demuestran una asociación funcional entre la DNA-PK y la proteína de control del ciclo celular Chk2 cuando se produce daño en el DNA. Aunque ATM parece ser la principal quinasa responsable de la fosforilación de Chk2 en T68, la DNA-PK contribuye también a este proceso.

Por último, hemos estudiado la muerte celular inducida por los fármacos mediante marcaje con Anexina V, medida de la actividad de caspasas efectoras, marcaje mitocondrial, observaciones de microscopía en “time-lapse” así como ensayos de expresión génica mediante RT-PCRq. Todos estos ensayos han contribuido a demostrar que el efecto citotóxico de la mitoxantrona, tanto en ausencia como en presencia de los inhibidores de DNA-PK, no es debido a mecanismos apoptóticos de muerte celular,



sugiriendo que podrían estar implicados mecanismos como la necroptosis o la catástrofe mitótica.

En resumen, en este trabajo se demuestra que la combinación de sustancias inhibitoras de los sistemas de reparación del DNA como el NU7026 o el NU7441 con fármacos inductores de estos daños puede ser de utilidad terapéutica.

RESUMEN (en Inglés)

Treatment of patients with prostate cancer is currently dealt with therapies such as surgery, radiation and anti-androgen drugs, although their progress towards a hormone refractory state makes chemotherapy the most effective treatment. Despite the improvement in patients' survival, resistance processes and side effects indicate that it is important to identify new therapeutic targets in these tumors. DNA is the primary target of many conventional antitumor agents. In particular, DNA repair inhibitors have shown to be able to sensitize a variety of tumor cells by themselves or in combination with other drugs, thus becoming an attractive strategy for cancer therapy. The overall objective of this thesis was to investigate the effect of topoisomerase II inhibitors and DNA repair inhibitors on PC-3, a cell line derived from a prostate tumor.

After preliminary studies on the effect of mitoxantrone, doxorubicin, the antimetabolic drugs vincristine and paclitaxel, DNA repair inhibitors NU7026 and NU7441 and ATM inhibitor KU55933, combined treatments demonstrate that DNA-PK inhibition significantly increases the sensitivity of PC-3 cells to mitoxantrone and vincristine. Mitoxantrone and DNA-PK inhibitors combination involves a synergistic cytotoxic effect, studied for the first time in these drugs.

Our results demonstrate that treatments with doxorubicin or mitoxantrone in combination with DNA-PK inhibitors increase slightly double strand breaks (DSB) induction, especially in the early hours of treatment and at low concentrations of TOP2 inhibitors. This was assessed by measurement of histone H2AX phosphorylation and visualization of fragmented DNA using comet assays. ATM is the major kinase responsible for H2AX phosphorylation while DNA-PK appears unable to phosphorylate H2AX when ATM is inhibited by KU55933. Furthermore, DNA-PK inhibition delays mitoxantrone-induced DSB repair and inhibits HR repair activity, as suggested by Rad51 accumulation. Our data demonstrate a functional association between DNA-PK and checkpoint kinase 2 (Chk2) when DNA damage occurs. Although ATM appears to be the kinase mainly responsible for Chk2 phosphorylation at T68, DNA-PK also contributes to this process.

Finally, we have studied drug-induced cell death by membrane labeling with Annexin V, measurement of effector caspases activity, mitochondrial labeling, time-lapse microscopy and gene expression analysis by RT-qPCR. Altogether these assays show that the cytotoxic effect of mitoxantrone, in the absence or the presence of DNA-PK inhibitors, is not due to apoptotic mechanisms, suggesting that necroptosis or mitotic catastrophe mechanisms may be involved.

In summary then, this study demonstrates that the combination of DNA repair inhibitors drugs such as NU7026 or NU7441 with DNA damage inducing drugs may be of therapeutic utility.

AGRADECIMIENTOS

Durante todo el transcurso de esta tesis doctoral muchas han sido las personas que me han ayudado a recorrer el camino para llegar hasta aquí y a las que quisiera dar las gracias:

En primer lugar, al Dr. Pedro Sánchez Lazo, por haberme dado la oportunidad de formar parte de este laboratorio. Gracias por sus consejos y enseñanzas, que me han ayudado a realizar esta tesis doctoral, y por el seguimiento y corrección de este trabajo.

En segundo lugar, a la Dra. Elaine Willmore del grupo del NICR (Newcastle Institute of Cancer Research, Inglaterra), por sus enseñanzas y por darme la oportunidad de realizar una estancia en su grupo, así como a mis compañeras Emily Mould y la Dra. Sue Tudhope, por acogerme tan bien y por su gran ayuda durante esos tres meses.

Agradecer a la Dra. María Sierra Zapico (Dto. de Biología Funcional, área de genética) la oportunidad de realizar el análisis de experimentos en su laboratorio, así como su ayuda y consejos para resolver las dudas correspondientes. También a Leticia y Marta por toda la ayuda prestada y por su colaboración siempre que lo he necesitado.

Agradecer a la Dra. Juana M^a García Pedrero (de la Unidad de Oncología de Cabeza y Cuello, IUOPA) por la realización de experimentos en su laboratorio, y en especial por toda la ayuda prestada en los trámites de la tesis, así como por su apoyo y consejos. Agradecer también a los miembros de su grupo Saúl Álvarez, la Dra. Sofía Tirados y la Dra. Ángeles Villaronga por su gran ayuda con experimentos y por su apoyo.

También, agradecer a Xose Antón Suárez Puente (del Dto. de Bioquímica y Biología Molecular) por su ayuda con el análisis de experimentos de expresión génica; a la Dra. Rosa Sáinz Menéndez y el Dr. Juan Carlos Mayo Barrallo por el material prestado para esta tesis así como por su ayuda, colaboración y consejos; también a la Dra. Pilar de la Peña Cortines por su ayuda y material prestado. Agradecer a la Dra. Marta Alonso, al Dr. Ángel Nistal y a Ana Salas su asistencia y ayuda técnica en los SCT de la Universidad. Asimismo, un agradecimiento especial a Fernando García Osorio y al Dr. Luis Carretero por su gran ayuda en experimentos, que ha sido mucha, además de por su amistad.

A todos mis compañeros de laboratorio, con los que he coincidido más o menos tiempo desde que llegué: a Eva, Pedro Casado, Miguel, Belén, Lucía, Noelia, Julián y Carmen, en especial a Pedro Casado y a Miguel con quienes empezó esta aventura. Gracias por la ayuda, consejos, charlas compartidas y buenos momentos. También al resto de compañeros de bioquímica y a la gente del comedor, por todos los buenos ratos, risas e ideas locas que hemos

compartido en comidas y cenas: a Montse G., Silvia, María, Luis, Tere, Jorge, Alejandro, Pablo, Pepe, Fernando, Clara, Bea, Poly, Rafa, Montse V. y Noemí, que son aquellos con los que he compartido mis días aquí.

Por supuesto agradecer a la gente de Simplelógica en general y a la compañía de los jueves en particular: Roch, Brenes, María, Víctor, Raquel, Jandro, Xenia, Luis, Abel, Carlos, Gemma, Zapico, Sara, Iván, Guzmán, Nacho, Álex, Miguel, Dani y Javi, por todo el apoyo, risas y buenos momentos que hemos pasado desde que nos conocemos: ¡Sois geniales! A mis amigos de l'équipe de Burdeos, que siempre me apoyan y animan incondicionalmente y que también han seguido muy de cerca conmigo esta tesis. Agradecer a la Dra. Ainhoa Gaztelumendi todo el apoyo y cariño que, desde que nos conocemos en la carrera, me ha dado, siempre ayudándome y escuchándome. A mis amigos Raki, Edu, Dani, Sara, Pola, Raquel, Javi, Bego, Gabi, Fran, Guillermo, Jesús, Juan y demás gente que he conocido en Oviedo, porque sin vosotros no habría sido lo mismo. Y a mis amigos de Pamplona, en especial a Daniel R.V.

Finalmente, un agradecimiento muy especial y en mayúsculas a toda mi familia, especialmente a mis padres, mis hermanos, a mi tío José Mari, a Cecilia y a Idoia. Por quererme tanto, por los viajes que han hecho para venir a verme, por apoyarme incondicionalmente y por animarme cada día durante todos estos años de tesis doctoral. Sin ellos nada de esto hubiese sido posible y a ellos se la dedico, con mucho cariño. Especialmente a mi madre, por hablar conmigo cada día y por compartir cada uno de los buenos y malos momentos.

Y para terminar, a mi novio Rubén (y a su familia), la persona más especial que ha hecho posible todo esto. Gracias por tu ayuda en esta tesis, en especial por todo el soporte técnico e informático, pero sobre todo por el grandísimo apoyo que me has dado en estos años de tesis tanto en los buenos como en los malos momentos. Gracias por la motivación que siempre me transmites, porque haces que me guste mi trabajo, por enseñarme todos los días algo nuevo y por ser como eres. Esta tesis está dedicada a ti también.

Muchas gracias a todos.

ABREVIATURAS

| | | | |
|----------------|--|------------------|---|
| 2DE: | Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida | CHK2: | Proteína quinasa de punto de control 2 |
| 53BP1: | Proteína de unión a p53 | CI: | Índice de combinación |
| AIF: | Factor inductor de apoptosis | cIAP: | Inhibidor celular de proteínas de apoptosis |
| Anxa2: | Anexina A2 | cis-Pt: | Cisplatino |
| APAF1: | Factor activador de proteasas apoptóticas 1 | CT: | Ciclo umbral |
| ATM: | Ataxia telangiectasia mutada | CYLD: | Cylindromatosis |
| ATR: | Ataxia telangiectasia mutada y quinasa Rad3 | CYTC: | Citocromo C |
| ATRIP: | Proteína de interacción con ATR | DD: | Dominio de muerte |
| BAK: | Proteína antagonista de muerte BCL2 | DIABLO: | Proteína de unión directa a IAP con bajo pI |
| BAX: | Proteína x asociada a BCL2 | DISC: | Complejo de señalización inductor de muerte |
| BCA: | Ácido bicinconínico | DLP: | Tiorredoxina tipo 4B |
| BCL-2: | Proto-oncogén de linfoma de células B | DMEM: | Medio Eagle modificado por Dulbecco |
| BCL10: | Leucemia linfoide crónica de células B / linfoma 10 | DMSO: | Dimetilsulfóxido |
| BER: | Reparación por escisión de bases | DNA-PK: | Proteína quinasa dependiente de DNA |
| BID: | Proteína agonista de muerte con dominio de interacción BH3 | DNA-PKcs: | Subunidad catalítica de DNA-PK |
| BLM: | Síndrome de Bloom, helicasa RecQ | DSB: | Roturas de doble cadena |
| BRCA1: | Proteína de cáncer de mama 1 | E2F1: | Factor de transcripción E2F 1 |
| BRCA2: | Proteína de cáncer de mama 2 | EC50: | Concentración de fármaco a la que se produce el 50% del efecto máximo |
| c-FLIP: | Proteína inhibidora celular similar a FLICE | eEF1B: | Factor de elongación eucariótico 1B |
| CD95: | Grupo de diferenciación 95 | EJ: | NHEJ, Recombianción de extremos no homólogos |
| CDK1: | Quinasa 1 dependiente de ciclina | ENDOG: | Endonucleasa G |
| CHCA: | Ácido α -ciano-4-hidroxicianamínico | ER: | Retículo endoplásmico |
| CHK1: | Proteína quinasa de punto de control 1 | | |

| | | | |
|-------------------|---|---------------------------|--|
| FADD: | Proteína asociada al dominio de muerte de Fas | MMC: | Mitomicina C |
| FANCD2: | Anemia de Fanconi, grupo de complementación D2 | MMR: | Reparación de nucleótidos mal apareados |
| FAS: | Receptor de muerte de la superficie celular Fas | MOMP: | Permeabilización de la membrana mitocondrial externa |
| FDA: | Food and Drug Administration | MRN: | Mre-11-Rad50-NBS1 |
| FEN1: | Endonucleasa específica de estructura flap 1 | MTK1: | MAPKK kinase |
| GDC: | Control de DNA genómico | mTOR: | Diana de la rapamicina en mamíferos |
| GH: | Hormona del crecimiento | MTT: | 3-(4,5-dimetil-2-tiazol-il] 2,5-difenil tetrazolio |
| H2AX: | Histona H2AX | NBS: | Nijmegen breakage syndrome |
| HED: | Hidroxietil disulfuro | NER: | Reparación por escisión de nucleótidos |
| HR: | Recombinación homóloga | NFκB: | Factor nuclear κB |
| HTRA2: | Serina peptidasa HtrA 2 | NHEJ: | Recombinación de extremos no homólogos |
| IKBKE: | Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon | NU7026: | 2-(morpholin-4-yl)-benzo[h]chromen-4-one |
| IM: | Membrana mitocondrial interna | NU7441: | 2-N-morpholino-8-dibenzothiophenyl-chromen-4-one |
| IMS: | Espacio intermembrana mitocondrial | OM: | Membrana mitocondrial externa |
| IP: | Ioduro de propidio | OPG: | Osteoprotegerina |
| IR: | Radiación ionizante | p38: | Proteína de 38 kDa |
| JNK: | Quinasa del extremo amino de c-Jun | p53: | Proteína de 53 kDa |
| KU55933: | 2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one | p54^{nrb}: | Proteína nuclear de unión al RNA de 54 kDa |
| MALDI-ToF: | Espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz | PAGE: | Electroforesis en gel de acrilamida |
| MCM: | Mantenimiento de mini-cromosomas | PARP1: | Poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 |
| MDC1: | Mediador del punto de control 1 de daño en el DNA | PC-3: | Línea celular procedente de adenocarcinoma de próstata |
| MIAs: | Agentes que interfieren con microtúbulos | PCR: | Reacción en cadena de la polimerasa |
| | | PI3K: | Fosfatidilinositol 3 quinasa |

| | | | |
|---------------|---|------------------------------------|--|
| PIKK: | Quinasas relacionadas con fosfatidilinositol 3-quinasa | TNF: | Factor de necrosis tumoral |
| Plk1: | Polo quinasa tipo 1 | TNFR: | Receptor del TNF |
| PML: | Leucemia promielocítica | TNFRSF: | Superfamilia de receptores del TNF |
| PPC: | Control positivo de PCR | TNFSF10: | TRAIL, Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF |
| PSA: | Antígeno prostático específico o persulfato amónico | TOP2: | Tomoisomerasa II |
| PTPC: | Complejo del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial | TOP2-DNA: | Complejo covalente topoisomerasa II-DNA |
| qPCR: | PCR en tiempo real | TRADD: | Proteína con dominio de muerte asociada al TNFR1 |
| Rad51: | Recombinasa Rad51 | TRAF: | Factor asociado a los receptores del TNF |
| RANKL: | Receptor activador de NF κ B | TRAILR: | Receptor de TRAIL |
| RIP1: | Receptor de interacción con proteína quinasa 1 | VDAC: | Proteína porina de la membrana mitocondrial externa de 36 kDa |
| RIPK1: | Receptor de interacción con la proteína quinasa 1 | WB: | Análisis Western-blot |
| ROS: | Especie reactiva de oxígeno | XRCC: | Reparación de rayos X complementaria y defectiva en células de hámster chino |
| RPA: | Proteína de replicación A de unión a DNA de cadena sencilla | λ-PPasa: | Lambda fosfatasa |
| RT: | Transcripción reversa | | |
| RTC: | Control de transcripción reversa | | |
| SMAC: | Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria | | |
| SMC1: | Mantenimiento estructural de cromosomas de tipo 1 | | |
| SSB: | Roturas de cadena sencilla | | |
| TAB2: | Proteína de unión a TAK1 | | |
| TAK1: | Factor de crecimiento transformante β (TGF β) activado por quinasa 1 | | |
| TBS: | Tampón tris salino | | |
| TBS-T: | Tampón tris salino con 0,1% de Tween 20 | | |
| TEMED: | N, N, N, N-tetrametilendiamina | | |
| TFA: | Ácido trifluoroacético | | |

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. El Cáncer | 3 |
| 1.1.1. Características generales | 3 |
| 1.1.2. Terapias del cáncer | 5 |
| 1.1.3. El cáncer de próstata..... | 7 |
| 1.2. DNA topoisomerasas..... | 9 |
| 1.2.1. DNA topoisomerasa II (TOP2)..... | 9 |
| 1.2.2. Fármacos inhibidores de TOP2 | 11 |
| 1.2.2.1. Inhibidores no catalíticos..... | 12 |
| 1.2.2.2. Inhibidores catalíticos..... | 13 |
| 1.3. Daño en el DNA y mecanismos de reparación..... | 14 |
| 1.3.1. Respuesta a las dobles roturas del DNA (DSB) | 16 |
| 1.3.2. Reparación de DSB: recombinación homóloga (HR) | 19 |
| 1.3.3. Reparación de DSB: recombinación no homóloga (NHEJ) | 19 |
| 1.3.4. Proteína quinasa dependiente de DNA (DNA-PK) e inhibidores | 22 |
| 1.3.5. Ataxia telangiectasia mutada (ATM) e inhibidores..... | 23 |
| 1.4. Estructura y dinámica de los microtúbulos | 25 |
| 1.4.1. Agentes que interfieren con los microtúbulos (MIAs) | 27 |
| 1.4.1.1. Alcaloides de la vinca (VAs)..... | 27 |
| 1.4.1.2. Taxanos..... | 28 |
| 1.5. Muerte celular..... | 29 |
| 1.5.1. Apoptosis | 29 |
| 1.5.1.1. Las caspasas..... | 30 |
| 1.5.1.2. Vías de activación de la apoptosis | 30 |
| 1.5.1.2.1 Apoptosis extrínseca..... | 30 |
| 1.5.1.2.2 Apoptosis intrínseca dependiente o independiente de caspasas | 32 |
| 1.5.2. Necroptosis | 35 |
| 1.5.3. Catástrofe mitótica..... | 35 |
| 2. OBJETIVOS | 37 |
| 3. MATERIALES | 41 |
| 3.1. Líneas celulares | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2. Compuestos para el tratamiento celular | 43 |
| 3.3. Kits y enzimas principales..... | 43 |
| 3.4. Anticuerpos | 44 |
| 3.5. Oligonucleótidos | 44 |
| 3.6. RT-qPCR array..... | 45 |
| 3.7. Otros materiales..... | 48 |
| 4. MÉTODOS | 51 |
| 4.1. Condiciones de cultivo | 53 |
| 4.2. Ensayo de reducción de MTT | 53 |
| 4.3. Evaluación de los efectos combinados de los fármacos..... | 54 |
| 4.4. Sincronización celular en fase S..... | 54 |
| 4.5. Análisis del ciclo celular | 54 |
| 4.5.1. Protocolo de Vindelov | 55 |
| 4.5.2. Tinción con IP tras fijación y permeabilización con etanol | 55 |
| 4.6. Análisis western | 56 |
| 4.6.1. Preparación de los extractos celulares | 56 |
| 4.6.2. Electroforesis y electrotransferencia | 56 |
| 4.6.3. Incubación con anticuerpos | 57 |
| 4.6.4. Escaneado por infrarrojos..... | 57 |
| 4.6.5. Revelado por quimioluminiscencia | 57 |
| 4.7. Electroforesis bidimensional | 58 |
| 4.8. Espectrometría de masas MALDI-ToF | 58 |
| 4.9. Desfosforilación “in vitro” | 59 |
| 4.10. Ensayo del cometa en condiciones alcalinas | 59 |
| 4.10.1. Análisis de las imágenes..... | 61 |
| 4.11. Determinación de apoptosis: ensayo de adhesión de la Anexina V | 61 |
| 4.12. Ensayo de la actividad de caspasas 3 y 7 | 62 |
| 4.13. Determinación de apoptosis: marcaje mitocondrial | 63 |
| 4.14. Microscopía y <i>time-lapse</i> | 64 |
| 4.15. Estudios de expresión génica | 64 |
| 4.15.1. Extracción de RNA y transcripción reversa | 64 |
| 4.15.2. PCR en tiempo real..... | 65 |
| 4.15.3. RT-qPCR Array..... | 66 |

| | |
|---|-----------|
| 4.16. Análisis estadístico | 68 |
| 5. RESULTADOS | 69 |
| 5.1. Efecto de los inhibidores de topoisomerasa II: mitoxantrona y doxorubicina | 71 |
| 5.1.1. La mitoxantrona y la doxorubicina inducen una citotoxicidad dependiente de la concentración | 71 |
| 5.1.2. La mitoxantrona y la doxorubicina alteran la progresión del ciclo celular | 72 |
| 5.1.2.1. La mitoxantrona bloquea el ciclo celular en fase S | 73 |
| 5.1.2.2. Efecto de la mitoxantrona en células sincronizadas | 74 |
| 5.1.3. La mitoxantrona inhibe la fosforilación de p54 ^{nrB} | 77 |
| 5.1.4. La doxorubicina bloquea el ciclo celular en fase G ₂ /M | 79 |
| 5.1.5. La mitoxantrona y la doxorubicina generan roturas en el DNA | 80 |
| 5.2. Efecto de fármacos antimetabólicos: vincristina y paclitaxel | 82 |
| 5.2.1. La vincristina y el paclitaxel inducen una citotoxicidad dependiente de la concentración | 82 |
| 5.2.2. La vincristina y el paclitaxel bloquean el ciclo celular en fase de mitosis | 83 |
| 5.2.3. La vincristina induce la fosforilación de eEF1B γ y Anxa2 | 85 |
| 5.2.4. La vincristina y el paclitaxel no generan roturas en el DNA | 86 |
| 5.3. Efecto de inhibidores de la reparación del DNA: NU7026, NU7441 y KU55933 | 87 |
| 5.3.1. NU7026, NU7441 y KU55933 inducen una citotoxicidad dependiente de la concentración | 88 |
| 5.3.2. NU7026 y KU55933 bloquean levemente el ciclo celular en fase G ₀ /G ₁ | 89 |
| 5.3.3. NU7026, NU7441 y KU55933 no generan roturas en el DNA | 90 |
| 5.4. Efecto de la combinación de inhibidores de TOP2 ó fármacos antimetabólicos con inhibidores de la reparación del DNA | 91 |
| 5.4.1. Efecto de la combinación de mitoxantrona y doxorubicina con inhibidores de DNA- PK y ATM en la viabilidad celular | 91 |
| 5.4.2. Efecto de la combinación de vincristina y paclitaxel con inhibidores de DNA-PK en la viabilidad celular | 95 |
| 5.4.3. La combinación de mitoxantrona con NU7026 ó NU7441 produce un efecto sinérgico | 97 |
| 5.4.4. Efecto de la combinación de mitoxantrona con NU7026, NU7441 ó KU55933 en el ciclo celular | 98 |
| 5.4.5. Efecto de la combinación de fármacos en el DNA | 99 |

| | |
|--|------------|
| 5.4.6. NU7026 y NU7441 inhiben la reparación de los daños inducidos en el DNA por la mitoxantrona..... | 104 |
| 5.4.7. NU7026 inhibe parcialmente el sistema de recombinación homóloga (HR) | 106 |
| 5.4.8. La inhibición de DNA-PK inhibe parcialmente la fosforilación de Chk2 | 108 |
| 5.5. Estudio de los mecanismos de muerte celular inducida por fármacos | 110 |
| 5.5.1. Marcaje con Anexina V..... | 111 |
| 5.5.2. Activación de caspasas efectoras..... | 118 |
| 5.5.3. Determinación de apoptosis por marcaje mitocondrial | 120 |
| 5.5.4. Análisis morfológico mediante microscopía y <i>time-lapse</i> | 129 |
| 5.5.5. Análisis de expresión génica | 134 |
| 6. DISCUSIÓN..... | 143 |
| 6.1. Efecto de los fármacos en solitario..... | 145 |
| 6.2. Efecto de la combinación de fármacos..... | 148 |
| 7. CONCLUSIONES | 161 |
| 8. CONCLUSIONS..... | 165 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 169 |
| 10. ANEXOS | 191 |
| 10.1. Material Suplementario | 193 |
| 11. PUBLICACIONES..... | 197 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El Cáncer

1.1.1. Características generales

El cáncer se define a menudo como el nombre general dado a una clase grande y heterogénea de enfermedades, en las que las células han adquirido propiedades que les permiten tener un crecimiento y proliferación incontrolados, evadir la muerte celular, invadir tejidos circundantes y, en algunos casos, metastatizar a otros lugares a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo. El crecimiento celular y la integridad genómica están estrechamente regulados en las células normales por varios tipos de genes. Sin embargo, en las células tumorales a menudo se pierde esta regulación debido a las anomalías hereditarias o adquiridas en dichos genes, como por ejemplo en los genes supresores de tumores y oncogenes. Un porcentaje pequeño de cánceres, aproximadamente el 5-10%, son hereditarios, mientras que los cánceres espontáneos se asocian a mutaciones adquiridas en genes clave a través de una serie de factores de riesgo, incluyendo la exposición a agentes genotóxicos y mutagénicos.

Los cánceres se clasifican a menudo tanto por la ubicación de su origen como por el tipo de células al que más se asemejan. Éstos incluyen el tipo más común de cáncer, los carcinomas, surgidos normalmente a partir de células epiteliales, como los desarrollados en el pulmón, mama o colon. Los cánceres originados en las células mesenquimales dan lugar a cánceres en los tejidos conectivos, llamados sarcomas. Existen dos clases principales de cánceres que surgen en las células hematopoyéticas y maduran en los ganglios linfáticos y sangre, que se conocen como linfomas y leucemias, respectivamente. Finalmente, los tumores derivados de las células inmaduras o tejidos embrionarios son llamados blastomas, y los que se presentan en los testículos u ovarios, tumores de células germinales.

En 2007 el cáncer fue la causa de más de 7,9 millones de muertes en el mundo, el 13% del total de casos de muerte (Jemal et al, 2011). Aunque las tasas de cáncer están aumentando, es una enfermedad predominante en la vejez, y es probable que el aumento de esta incidencia sea debida a un mayor envejecimiento de la población, especialmente en los países desarrollados. Afortunadamente, sin embargo, las estadísticas de la organización *Cancer Research UK* muestran, entre otras, que las tasas de supervivencia del cáncer se han duplicado en los últimos 40 años, que 7 de cada 10 niños con cáncer son ahora tratados con éxito, que las tasas de mortalidad por cáncer de mama se han reducido en casi una quinta parte en los últimos 10 años y que más del 95% de los hombres con cáncer testicular son tratados con éxito

(www.cancerresearchuk.org). Esto se debe a los nuevos avances en tratamientos y técnicas quirúrgicas, a menudo utilizados en combinación con las terapias existentes: quimioterapia, radioterapia y resección quirúrgica.

En el año 2000 fue publicada una revisión de Hanahan y Weinberg, en la que se definieron los seis “distintivos del cáncer”. Según estos datos, una célula tumoral tenía seis características clave adquiridas o hereditarias que conducen al desarrollo o extensión del cáncer. Éstas fueron: el mantenimiento de la señal proliferativa, la evasión de supresores del crecimiento, la activación de la invasión y de la metástasis, la inmortalidad replicativa, la inducción de angiogénesis y la resistencia a la muerte celular (Hanahan & Weinberg, 2000). Estas señas de identidad todavía proporcionan una base sólida para comprender el crecimiento tumoral y la metástasis, aunque también muestran que puede haber una gran diversidad en cada tipo de cáncer y en cada tumor individual. Sin embargo, desde esta revisión se han generado una gran cantidad de datos nuevos, y estas características se han actualizado para incluir nuevas capacidades compartidas por las células tumorales. La Figura 1.1 muestra las diez características actuales de las células tumorales que, junto con las seis originales, incluyen: la evitación de la destrucción por el sistema inmune, la promoción de la inflamación tumoral, la inestabilidad y mutaciones genómicas y la desregulación de los procesos energéticos celulares (Hanahan & Weinberg, 2011).

La Figura 1.1 también ilustra nuevas terapias, actualmente en desarrollo o en ensayos clínicos, dirigidas a cada uno de los diez distintivos del cáncer como medio para abordar el tumor atacando directamente a estas características clave. Existe la esperanza de que, orientando las terapias a estos distintivos, que son únicos para las células cancerosas, haya menos efectos secundarios para los pacientes, porque los tejidos normales no comparten estas características cancerosas y por tanto no deberían verse afectadas por estos nuevos tratamientos.

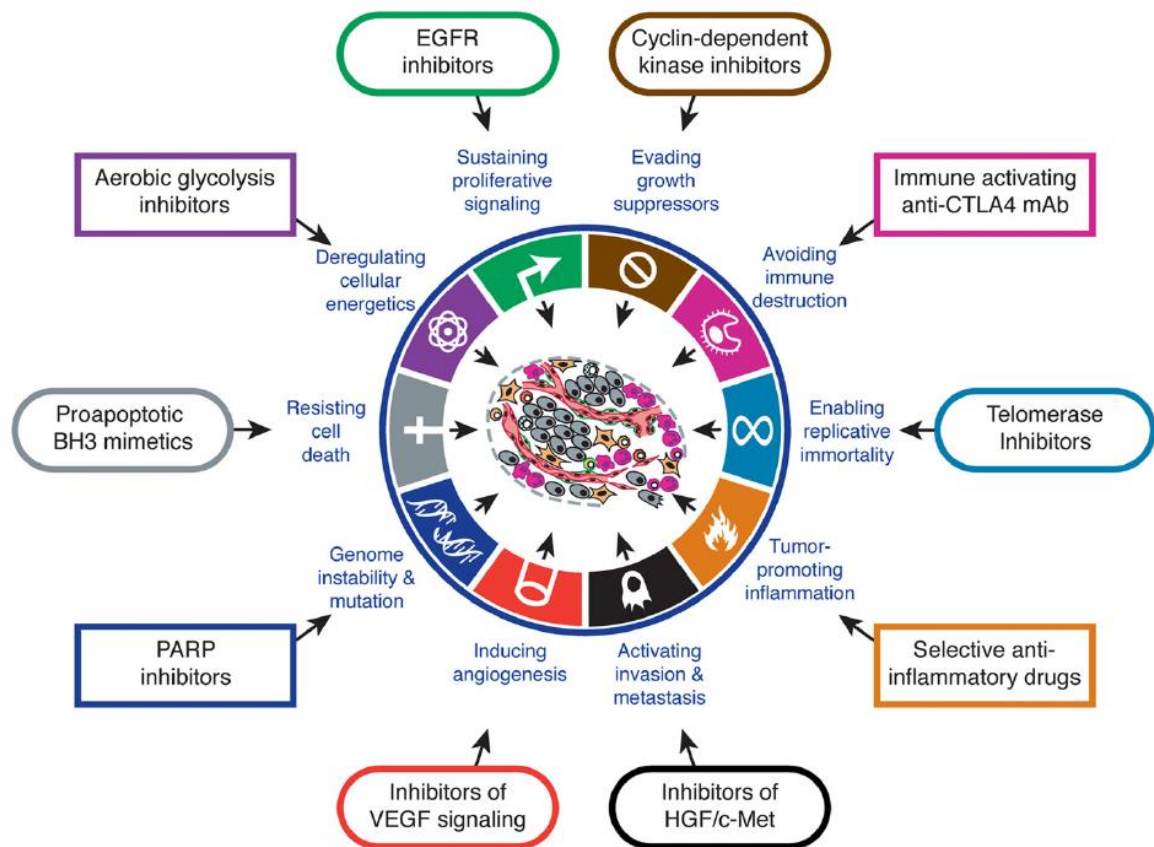


Figura 1.1. Características distintivas de las células tumorales. Esta figura muestra las 10 características “distintivas del cáncer” asignadas por Hanahan y Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2011). También muestra algunos de los nuevos fármacos diseñados específicamente contra estas características. Algunos de estos compuestos han sido autorizados para su uso y otros continúan siendo ensayados clínicamente. Estos fármacos son sólo una representación, existiendo muchos otros actualmente en desarrollo. Figura tomada de Hanahan and Weinberg (2011).

1.1.2. Terapias del cáncer

Como hemos mencionado anteriormente, las tres herramientas principales para el tratamiento del cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. En el caso de muchos tumores sólidos, como el de mama o los carcinomas de pulmón, la cirugía suele ser la primera modalidad utilizada. Esto depende de la accesibilidad del tumor y tiene como objetivo seccionar tanto de la masa tumoral como sea posible. Sin embargo, a menudo significa eliminar también parte del tejido normal, e incluso los ganglios linfáticos en algunos casos, con el fin de disminuir el riesgo de recaída. En muchos casos no es posible eliminar quirúrgicamente todo el tejido canceroso y, por tanto, se utiliza la radioterapia como terapia adyuvante, con el objetivo de suprimir la tasa de división celular en las células tumorales que quedan tras la resección quirúrgica. En el caso de tumores muy avanzados, la cirugía se puede

utilizar como un medio de cuidados paliativos, ya que puede reducir significativamente la carga tumoral del paciente.

La radioterapia es una técnica utilizada en el tratamiento del cáncer tanto como medio principal de control local para reducir la carga tumoral antes de la cirugía como de complemento/adyuvante de la misma (comentado anteriormente). La radioterapia, al igual que muchos agentes quimioterapéuticos, daña directamente el DNA de las células tumorales. En este caso, el daño en el DNA es generado por radiación ionizante (IR), es decir, partículas subatómicas u ondas de alta energía (como rayos X, gamma o rayos de electrones o protones) utilizados para eliminar o dañar células cancerosas. Se puede aplicar externamente (radioterapia), internamente a través de cápsulas (braquiterapia) o internamente por vía oral/intravenosa (sistémica), y los diversos enfoques se pueden combinar. La radioterapia es uno de los principales tratamientos para una amplia gama de tumores sólidos, como el de mama, pulmón, próstata y tumores cerebrales, y es una de las piedras angulares del tratamiento del cáncer en la actualidad. Según la organización *Cancer Reseach UK*, el 40% de las personas con cáncer curadas reciben radioterapia como parte de su tratamiento, lo que realmente pone de manifiesto la importancia de este tipo de tratamiento.

La cirugía y la radioterapia sólo son eficaces en tumores confinados localmente y, por tanto, no son adecuados en todos los casos, como en leucemias y linfomas. En éstos, y muchos otros casos, se administra quimioterapia. Cabe señalar que la mayoría de los pacientes reciben quimioterapia sistémica en algún momento durante su enfermedad, y que este tipo de tratamiento se puede dar como adyuvante de la cirugía o la radioterapia. Existen muchas clases de fármacos quimioterapéuticos, y por tanto no es posible revisar todos ellos aquí en detalle. Pero, brevemente, de entre las terapias que dañan el DNA destacan los agentes inhibidores de topoisomerasas I y II, como la camptotecina en el primer caso y la mitoxantrona o doxorubicina en el segundo. Asimismo, destacan los fármacos que interfieren con los microtúbulos, como la vincristina y el paclitaxel. Los fármacos quimioterapéuticos son agentes muy eficaces, pero también pueden ser tóxicos para las células normales, particularmente para las células que por su naturaleza proliferan rápidamente, como las del tracto gastrointestinal, médula ósea, testículos u ovarios. Por lo tanto, esto puede conducir a la aparición de efectos secundarios graves, como la pérdida de fertilidad o la mielosupresión. Como consecuencia, en los estudios de fármacos antitumorales se hacen balances de tanto sus efectos tóxicos como de sus efectos terapéuticos.

Actualmente se están desarrollando nuevos agentes terapéuticos que podrían utilizarse en combinación con los fármacos existentes. Estos agentes incluyen compuestos dirigidos a determinadas proteínas, como los que inhiben proteínas clave del sistema de reparación del DNA (inhibidores de DNA-PK, sección 1.3.4.). Estos agentes podrían aumentar la eficacia terapéutica de la radio y quimioterapias convencionales, reduciendo los efectos secundarios asociados con estos agentes. Otras formas de tratamiento incluyen la terapia hormonal, la terapia génica, la inmunoterapia, los trasplantes de médula ósea y los trasplantes de células madre de sangre periférica en combinación con dosis altas de quimioterapia. Los desarrollos más recientes en el tratamiento del cáncer incluyen terapias con anticuerpos monoclonales o terapias con inhibidores de la angiogénesis. En el primer caso, se crea un anticuerpo especial que se adhiera a un antígeno diana específico de las células cancerosas, como por ejemplo el Rituximab, dirigido al antígeno CD20 de la superficie de las células B y utilizado para tratar leucemia linfocítica crónica (Jagłowski & Byrd, 2010). Esta tecnología permite dirigir el tratamiento hacia células específicas, causando una menor toxicidad para las células sanas. En el segundo caso, la antiangiogénesis interrumpe la formación de nuevos vasos sanguíneos para evitar el crecimiento y la expansión del tumor. Existen actualmente inhibidores de la angiogénesis que están siendo probados en ensayos clínicos para una gran variedad de cánceres, como el interferón alfa y la talidomida (Figg et al, 2001; Indraccolo, 2010).

1.1.3. El cáncer de próstata

A partir de estudios realizados en 2008 sobre estimaciones globales de la prevalencia del cáncer en el mundo (Bray et al, 2013) y a partir de estudios posteriores realizados por el *Cancer Research UK*, se detectaron en 2012 1.111.689 casos de cáncer de próstata en el mundo, siendo el cuarto tipo de cáncer más común (los tres más comunes fueron el cáncer de pulmón, mama e intestino).

La próstata es una pequeña glándula del aparato genitourinario masculino ubicada debajo de la vejiga y delante del recto (Figura 1.2), cuya función es secretar diversas sustancias y enzimas que constituyen parte del fluido seminal. Aproximadamente el 60% restante de las sustancias que componen este fluido es sintetizado por las vesículas o glándulas seminales, situadas encima de la próstata. La próstata es un órgano hormono-dependiente, por lo que para su desarrollo precisa de una correcta y completa estimulación hormonal. Más del 95% de los cánceres de próstata primarios son adenocarcinomas, en los que las células tumorales derivan de células del epitelio secretor. Los adenocarcinomas de próstata son, con frecuencia, multifocales y heterogéneos en sus modelos de diferenciación.

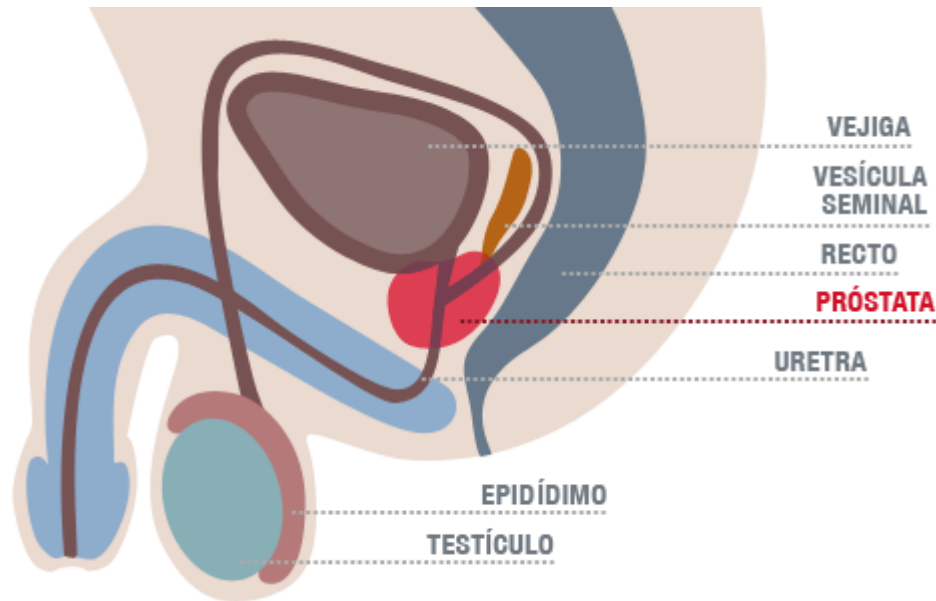


Figura 1.2. Características anatómicas del aparato genitourinario masculino.

De entre los métodos utilizados para establecer el grado de agresividad tumoral en cáncer de próstata se encuentran: 1) la puntuación de Gleason; 2) el nivel de PSA; 3) el estadio del cáncer (tamaño y diseminación del tumor). La puntuación o escala de Gleason se basa en las características histopatológicas del tumor para proporcionar dos puntuaciones, cuya suma determinará la agresividad del mismo. En esta escala se asignan grados que van desde 2 a 10, donde 2 representa una próstata normal y 10 indica un aspecto muy agresivo (Chan et al, 2000). El antígeno prostático específico o PSA (del inglés *prostate specific antigen*) es una proteína secretada por la próstata utilizada con frecuencia como marcador tumoral (Pisansky et al, 1993). Una vez que el diagnóstico del cáncer se confirma por medio de una biopsia, los niveles de PSA se utilizan para clasificar los tumores como de riesgo de recaída bajo (nivel PSA <10), intermedio (PSA entre 10-20) o alto (PSA >20). En tercer lugar, el estadio de un cáncer se clasifica en función de su tamaño y diseminación utilizando el sistema TNF, que evalúa por separado el tumor (T), los ganglios linfáticos (N) y la metástasis (M). La puntuación T (de 1 a 4) depende de si el cáncer es pequeño y sólo se detecta mediante pruebas de PSA (1) o si está invadiendo otros órganos (4); la puntuación N (0 ó 1) depende de si el cáncer se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos; por último la puntuación M (0 ó 1) depende de si el cáncer se ha diseminado hacia otras partes del cuerpo.

Una vez diagnosticado, las opciones de tratamiento para el cáncer de próstata incluyen la cirugía (prostatectomías), la radioterapia, tanto externa como interna (braquiterapia), la terapia hormonal (uno de los tratamientos más efectivos, dado el carácter hormonodependiente

de esta glándula) y la quimioterapia, aplicada en tumores agresivos y andrógeno-independientes (Instituto Nacional del Cáncer: www.cancer.gov; Fundación del cáncer de próstata: www.pcf.org).

1.2. DNA topoisomerasas

La naturaleza de doble cadena del DNA crea un conjunto especial de problemas en procesos como la transcripción y la replicación, que requieren del desenrollamiento de las cadenas de DNA. El desenrollamiento producido crea un problema topológico porque debe ser compensado por una sobretensión en otra parte de la molécula de DNA. Las DNA topoisomerasas son enzimas que resuelven estas dificultades introduciendo roturas transitorias en el DNA. Estas roturas transitorias permiten cambios en la topología del mismo, que eliminan las sobretensiones producidas (Nitiss, 2009).

Existen dos clases de topoisomerasas: las enzimas de tipo I (TOP1), que introducen roturas de cadena sencilla en el DNA o SSB (del inglés *single strand breaks*), y las topoisomerasas de tipo II (TOP2), que introducen roturas de doble cadena o DSB (del inglés *double strand breaks*) (Champoux, 2001; Wang, 1998). Como una única DSB del DNA sin reparar tiene consecuencias potencialmente letales, las topoisomerasas de tipo II podrían considerarse como una herramienta particularmente peligrosa a la hora de lidiar con los problemas topológicos de DNA (Nitiss, 2009).

1.2.1. DNA topoisomerasa II (TOP2)

Las enzimas TOP2 se han convertido en una de las dianas más eficaces de diversos fármacos antitumorales actuales, ya que intervienen en procesos tan importantes como la separación de los cromosomas replicados (Luo et al, 2009), la transcripción (McNamara et al, 2008) o la resolución de problemas topológicos del DNA mediante la formación transitoria de DSB (McClendon & Osheroff, 2007). Algunos de estos fármacos antitumorales dirigidos a la TOP2 y actualmente utilizados en quimioterapia son la doxorubicina, la mitoxantrona o el etopósido (Nitiss, 2009).

Las células de mamíferos expresan dos isozimas de TOP2: la TOP2 α (170 kDa) y la TOP2 β (180 kDa). Aunque estas dos isoformas contienen aproximadamente un 70% de similitud en su secuencia aminoacídica, sus propiedades bioquímicas y farmacológicas son bastante diferentes (McClendon & Osheroff, 2007). Cada una de estas isoformas se expresa en una fase diferente del ciclo celular, realizando funciones diferentes. La TOP2 α es esencial para todas las células, destacando su importancia en la resolución de problemas topológicos del

DNA (Grue et al, 1998) y en la separación de los cromosomas replicados (Luo et al, 2009). Por otro lado la TOP2 β se requiere para un desarrollo normal, pero es prescindible en algunos tipos celulares. Se cree que esta isoforma podría regular la transcripción de los genes de respuesta al daño en el DNA (Ju et al, 2006).

Las reacciones catalizadas por las enzimas TOP2 eucarióticas incluyen la separación de las cadenas dobles de DNA y la relajación del DNA superenrollado. Para ello, estas reacciones requieren de la introducción de una rotura de doble cadena, un tránsito de cadena y del resellado de la rotura (Figura 1.3). Para llevar a cabo este proceso, la TOP2 interactúa con dos cadenas de DNA. La enzima introduce una DSB en una de las cadenas, denominada segmento G, y pasa la segunda cadena denominada segmento T a través de la ruptura. En presencia de Mg²⁺ la enzima es capaz de escindir el DNA, formando un enlace fosfotirosina entre cada hebra simple y otro con cada subunidad del enzima. La unión de ATP permite que la enzima funcione a modo de pinza, permitiendo la captura en primer lugar del segmento G y a continuación del segmento T. Tras el paso del segmento T a través de la ruptura hecha en la cadena G, el segmento T sale del enzima a través del extremo carboxi terminal (parte inferior de la enzima). El paso del segmento T y la liberación del segmento G van acompañados de hidrólisis de ATP.

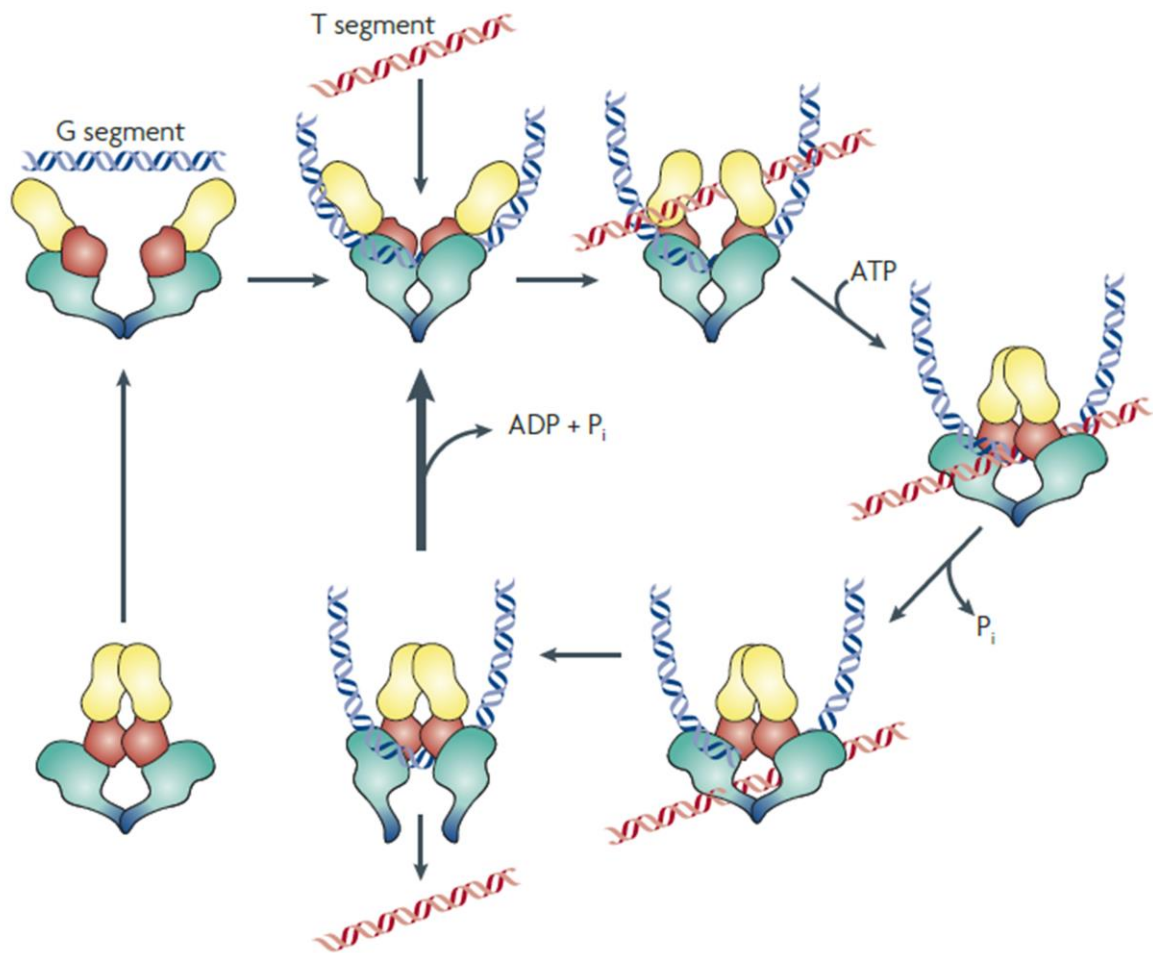


Figura 1.3. Mecanismo de acción de la topoisomerasa tipo II. Las reacciones catalizadas por la topoisomerasa II eucariótica (TOP2) incluyen el desenrollamiento de cadenas dobles de DNA y la relajación del DNA superenrollado. Estas reacciones requieren de la introducción de una rotura de doble cadena, un tránsito de cadena y del resellado de la rotura. La TOP2 interactúa con dos cadenas de DNA para llevar a cabo el proceso. La enzima introduce una DSB en una de las cadenas, denominada segmento G (*G segment*), y pasa la segunda cadena denominada segmento T (*T segment*) a través de la ruptura. El proceso se lleva a cabo en presencia de Mg^{2+} y es dependiente de ATP. Figura tomada de Nitiss (2009).

1.2.2. Fármacos inhibidores de TOP2

La TOP2 ha ocupado el interés de los investigadores en la terapia del cáncer al ser la diana de algunos de los fármacos antitumorales actuales más activos, como el etopósido o la doxorubicina (Liu, 1989; Nitiss, 2009). Varios estudios han demostrado que estos fármacos generan daño en el DNA debido a su interacción con esta enzima. A pesar del mejor conocimiento del mecanismo de acción de estos compuestos y de las elevadas tasas de supervivencia en pacientes, el tratamiento con fármacos inhibidores de TOP2 conlleva efectos secundarios. Por ello, actualmente se está trabajando para maximizar su eficacia terapéutica y minimizar el riesgo de estos efectos secundarios u otras toxicidades (Nitiss, 2009). Los

fármacos inhibidores de TOP2 se clasifican en dos grandes clases: inhibidores no catalíticos e inhibidores catalíticos.

1.2.2.1. Inhibidores no catalíticos

Los inhibidores no catalíticos de TOP2 aumentan los niveles de los complejos covalentes formados entre la enzima y el DNA (complejos TOP2-DNA) (Nitiss, 2009). Estos agentes generan lesiones que incluyen roturas en la cadena de DNA y uniones covalentes de proteínas al mismo. Se ha demostrado que muchos inhibidores no catalíticos de TOP2 tienen actividad antitumoral. Aunque no se conocen todavía sus mecanismos precisos de acción, estos compuestos perturban la geometría requerida para el proceso de ligación tras el paso de cadena llevado a cabo por la TOP2. La generación de altos niveles de complejos TOP2-DNA genera profundos efectos en la fisiología celular. Los procesos de transcripción y replicación son detenidos automáticamente y las células, posteriormente, acaban entrando en apoptosis (Nitiss, 2009). La resistencia a estos fármacos en células de mamíferos está frecuentemente asociada a una reducción de la expresión de las isoformas de TOP2 (Walker & Nitiss, 2002). Los inhibidores no catalíticos de TOP2 se clasifican, a su vez, en compuestos intercalantes o no intercalantes (Nitiss, 2009).

Los agentes intercalantes constituyen un grupo químicamente muy diverso, en el que se incluyen, entre otros compuestos, la mitoxantrona, la doxorrubicina, varios tipos de antraciclinas y el mAMSA. Algunos de estos agentes, especialmente las antraciclinas, tienen una serie de efectos sobre las células, muchos de los cuales son independientes de su acción contra la TOP2, como la generación de radicales libres (Nitiss, 2009).

En este trabajo se han utilizado los compuestos mitoxantrona y doxorrubicina. La mitoxantrona es un antineoplásico citotóxico sintético derivado de antracenedionas, utilizado actualmente según la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) para el tratamiento de esclerosis múltiple, cáncer de próstata hormono-refractario avanzado y leucemia no linfocítica aguda. En la literatura varias publicaciones avalan la eficacia terapéutica de este compuesto en el cáncer de próstata (Kantoff et al, 1999; Tannock et al, 1996), mama, leucemias y linfomas (Alberts et al, 1985; Elliott et al, 2011; Faulds et al, 1991; Hande, 1998), así como en carcinoma hepático, de ovario (Faulds et al, 1991) y esclerosis múltiple (Scott & Figgitt, 2004). Este compuesto se intercala en el DNA a través de enlaces de hidrógeno, provocando entrecruzamientos y roturas de cadena mediante la formación de complejos estables DNA-TOP2 y la generación de radicales libres. Provoca la agregación y compactación del DNA, y aunque carece de especificidad de fase, provoca retrasos en la progresión del ciclo celular

particularmente en fase S tardía (Faulds et al, 1991). La resistencia de las células tumorales a la mitoxantrona puede deberse a varios factores, como el aumento de la expresión de P-glicoproteína, alteraciones en los niveles o en la actividad de TOP2, al aumento en los mecanismos de reparación del DNA o una combinación de éstos y otros mecanismos (Nitiss, 2009). Estudios preclínicos han demostrado que la mitoxantrona puede inducir efectos adversos en el corazón, tracto gastrointestinal y en la formación de la sangre (Faulds et al, 1991).

Por otra parte, la doxorubicina es una antraciclina aprobada por la FDA y utilizada como fármaco de primer uso en el tratamiento de pacientes con leucemias, linfomas, cáncer de mama y sarcomas (Ciszewski et al, 2014; Hande, 1998), así como en cáncer de próstata (Shaheen et al, 2011), pulmón, estómago, ovario, tiroides y mielomas (Arcamone et al, 1969; Cortes-Funes & Coronado, 2007; Weiss, 1992). La doxorubicina se intercala en el DNA, formando complejos estables TOP2-DNA y generando lesiones en el mismo, seguido de una detención del ciclo celular en las fases G₁ y G₂ (Heger et al, 2013) y una inducción de la apoptosis (Perego et al, 2001). Este compuesto también se caracteriza por producir radicales libres, causar daño en la membrana e inducir entrecruzamientos DNA-proteína (Nitiss, 2009). Estas propiedades pro-oxidantes tienen el potencial de inducir muerte celular a través de un daño oxidativo en la mitocondria (Sardao et al, 2009). El uso de antraciclinas está limitado por su cardiotoxicidad (Nitiss, 2009).

El segundo grupo de inhibidores no catalíticos de TOP2 los constituyen los agentes no intercalantes. Estos compuestos no interactúan fuertemente con el DNA, por lo que se ha sugerido que las interacciones proteína-fármaco tienen un papel clave en la capacidad de estos inhibidores de estabilizar los complejos covalentes de TOP2 formados (Nitiss, 2009). Estos agentes incluyen fármacos como el etopósido, el tenipósido o las fluoroquinonas.

1.2.2.2. Inhibidores catalíticos

Los inhibidores catalíticos de TOP2 inhiben la actividad catalítica de esta enzima sin incrementar los niveles de los complejos covalentes TOP2-DNA. Los agentes pertenecientes a este grupo parecen matar las células a través de la eliminación de la actividad esencial enzimática de la TOP2 (Nitiss, 2009). Los inhibidores catalíticos más conocidos son las bisdioxopiperazinas, como ICRF-187, que inhiben la actividad ATPasa de la TOP2 y la bloquean. Además, se incluyen en este grupo la novobiocina, la merbarona y la aclarubicina. Experimentos in vitro muestran que los inhibidores catalíticos de TOP2 antagonizan la

toxicidad de los inhibidores no catalíticos (Jensen & Sehested, 1997), indicando que estos agentes actúan por mecanismos diferentes.

El daño mediado por la TOP2 en el DNA incluye roturas y proteínas que se unen covalentemente al mismo. Este daño es reparado por múltiples vías, entre las que se incluyen vías de reparación de DSB y otros mecanismos específicos para la eliminación de aductos proteína-DNA. Tras el reconocimiento de los complejos covalentes TOP2-DNA, la reparación es iniciada por proteólisis o por procesamiento nucleolítico (Nitiss, 2009), cuyo producto será una molécula de DNA con una DSB o SSB. En el caso de ser una DSB, la reparación será llevada a cabo principalmente por el sistema de recombinación de extremos no homólogos NHEJ (del inglés *non-homologous end joining*) o por el sistema de recombinación homóloga HR (del inglés *homologous recombination*), siendo las células capaces o no, en último término, de reparar el daño producido.

1.3. Daño en el DNA y mecanismos de reparación

La reparación exacta y eficaz del daño en el DNA es esencial para la función celular normal y para el mantenimiento de la estabilidad genómica (Hoeijmakers, 2001). En los seres humanos defectos en la reparación del DNA adquiridos o heredados pueden dar lugar a un aumento del riesgo de cáncer (Hoeijmakers, 2009). La integridad del DNA se enfrenta a una amenaza continua de una gran variedad de agentes. Éstos se clasifican principalmente como agentes ambientales o agentes endógenos (Curtin, 2012). En el primer grupo se encuentran factores de tipo exógeno, como la luz ultravioleta (UV), la radiación ionizante y numerosos compuestos químicos genotóxicos, como el humo del cigarrillo y los agentes quimioterapéuticos. En segundo grupo se encuentran agentes endógenos que se producen como subproductos del metabolismo celular normal, como por ejemplo las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, los estrógenos, los metabolitos del colesterol o las especies reactivas de carbonilo (De Bont & van Larebeke, 2004). Asimismo se encuentran en este grupo factores relacionados con errores en la replicación, como el bloqueo de las topoisomerasas I y II, o relacionados con fallos en los sistemas de reparación, como las roturas de cadena sencilla del DNA no reparadas. Finalmente las reacciones espontáneas dentro del micro entorno del DNA, como la hidrólisis, también pueden resultar en daños a las bases, como las desaminaciones (Lindahl, 1993). Como consecuencia de estos factores ambientales y

endógenos se producen múltiples lesiones en el DNA. En la Figura 1.4 se representan varios de estos agentes así como las lesiones producidas.

Los mecanismos de reparación del DNA implicados en la reparación de estas lesiones son (Curtin, 2012): la reparación directa, los mecanismos de reparación por escisión de bases (BER, del inglés *base excision repair*) y por escisión de nucleótidos (NER, del inglés *nucleotide excision repair*), la reparación de nucleótidos mal pareados (MMR, del inglés *mismatch repair*), los mecanismos de reparación de dobles roturas como la recombinación de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (HR) y, por último, la reparación de entrecruzamientos (ICL, del inglés *DNA interstrand crosslinks*). Cada vía, mostrada en la Figura 1.4, se ha desarrollado para hacer frente a un tipo específico de daño en el DNA, aunque existe cierta superposición en sus funciones (Curtin, 2012; Hoeijmakers, 2001).

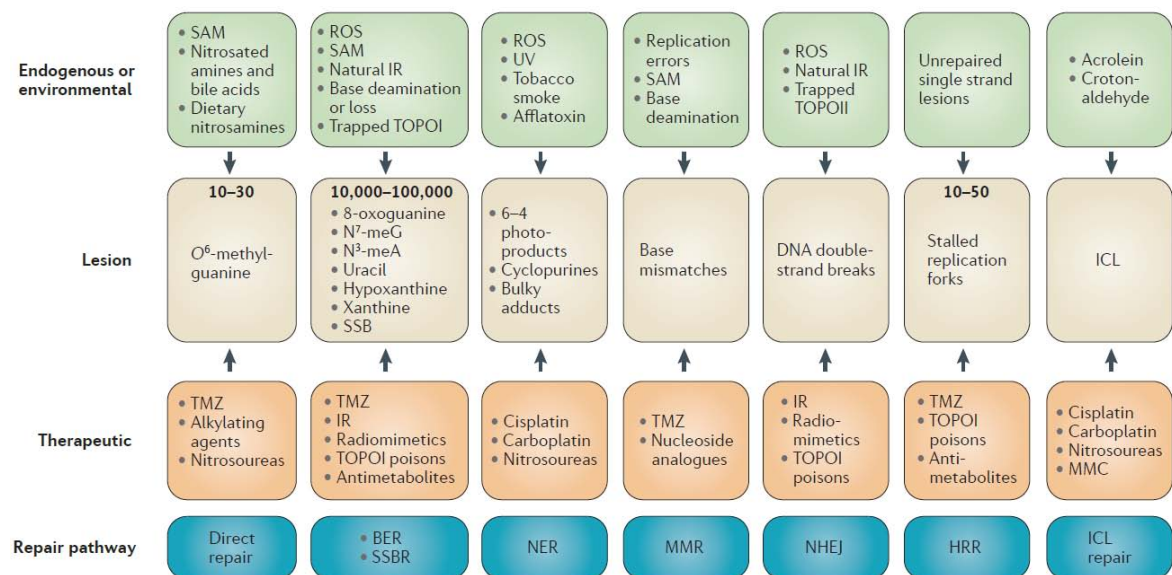


Figura 1.4. Fuentes de daño en el DNA y su reparación. Las fuentes endógenas y ambientales de daño en el DNA se muestran en los cuadros de color verde y las lesiones producidas por estos agentes en los cuadros de color beige (en algunos casos está indicado el número aproximado de cada tipo de lesión que se produce de forma natural en una célula cada día). Los agentes terapéuticos que causan las correspondientes lesiones del DNA se muestran en los recuadros de color naranja. Las vías de reparación del DNA (recuadros azules) reparan el daño inducido por los agentes endógenos y ambientales y, por lo tanto, protegen el genoma, aunque al mismo tiempo antagonizan la eficacia de los agentes terapéuticos. BER: reparación por escisión de bases; HRR: reparación de recombinación homóloga; ICL: reparación de entrecruzamientos; IR: radiación ionizante; MMC: mitomicina C; NER: reparación por escisión de nucleótidos; NHEJ: recombinación de extremos no homólogos; ROS: especies reactivas de oxígeno; SAM: S-adenosil metionina; SSB: roturas de cadena sencilla; SSBR: reparación de SSB; TMZ: temozolomida; TOPO: topoisomerasa; UV: luz ultravioleta. Figura tomada de Curtin (2012).

Los efectos acentuados del daño en el DNA llevan a una detención transitoria de la progresión del ciclo celular en las fases G₁, S, G₂ ó M, así como del metabolismo del DNA, junto con la inhibición de los procesos de transcripción, replicación o segregación cromosómica que puede derivar en apoptosis (Hoeijmakers, 2001). Las consecuencias a largo plazo de estas lesiones incluyen cambios permanentes en la secuencia de DNA (con mutaciones puntuales de genes individuales o aberraciones cromosómicas que pueden implicar múltiples genes) y sus efectos biológicos, como cáncer, envejecimiento o enfermedades congénitas (Hoeijmakers, 2001).

1.3.1. Respuesta a las dobles roturas del DNA (DSB)

Las dobles roturas del DNA o DSB son consideradas como las lesiones más letales del DNA y si no se reparan pueden resultar en inestabilidad genómica, carcinogénesis y, en última instancia, muerte celular (Hoeijmakers, 2001). Estas lesiones se producen como resultado de un daño directo en ambas hebras de DNA por agentes exógenos, como la radiación ionizante o la quimioterapia (por ejemplo, los inhibidores de topoisomerasas) (Helleday et al, 2008), o como parte de la fisiología normal en procesos como la recombinación genética durante la meiosis (Neale & Keeney, 2006) o el desarrollo de inmunoglobulinas durante la recombinación V(D)J (del inglés *variable, diversity and joining*) (Leavy, 2010). También se producen debido a especies reactivas de oxígeno y un número significativo de DSB surgen durante la replicación del DNA, como consecuencia de TOP2 bloqueadas o de SSB sin reparar (Bryant et al, 2009).

Las dos proteínas principales implicadas en la detección de DSB son ATM (del inglés *ataxia telangiectasia-mutated kinase*) y ATR (del inglés *ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase*), ambas miembros de la familia fosfatidilinositol 3-quinasa ó PIKK (del inglés *PI3 kinase-like kinase*) (Bakkenist & Kastan, 2004). Aunque el mecanismo de activación de ATM tras la inducción de DSB continúa siendo indeterminado, se ha demostrado que el complejo MRN (del inglés *Mre-11-Rad50-NBS1*) es requerido para la óptima activación de ATM en las DSB (Bhatti et al, 2011; Lee & Paull, 2005). Por el contrario, ATR se activa y recluta en los sitios de DSB por la unión con la proteína de replicación A (RPA, del inglés *single-stranded DNA-binding protein replication protein A*) (Falck et al, 2005), aunque trabajos posteriores sugieren un nuevo mecanismo de activación de ATR independiente de su localización en las DSB (Kumagai et al, 2006). Originalmente se pensó que ATM y ATR actuaban de manera independiente en su respuesta al daño en el DNA. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que ATM y ATR trabajan juntas, siendo requeridas en la fosforilación de la

proteína de control del ciclo celular Chk1 inducida por radiación ionizante y regulando ATM la actividad de ATR en respuesta a las DSB (Jazayeri et al, 2006).

Tras su activación, ATM y ATR fosforilan una multitud de proteínas, induciendo la detención del ciclo celular y desencadenando la activación de múltiples genes implicados en los sistemas de reparación NHEJ y HR (Andreassen et al, 2006; Zhou & Bartek, 2004) (Figura 1.5). Los sustratos de la fosforilación de ATM incluyen: BRCA1, p53, las proteínas de control del ciclo celular Chk1 y Chk2, FANCD2, SMC1, la helicasa de DNA BLM1, la histona H2AX, proteínas MCM asociadas a horquillas de replicación y el complejo MRN (Lord et al, 2006). ATR, por otra parte, es conocida por fosforilar a Chk1, BRCA1 y BLM (Lord et al, 2006). Todas estas proteínas actúan como transductores, afectando a procesos como la apoptosis, la reparación del DNA, la detención del ciclo celular o la replicación.

El papel tanto de ATM como de ATR en la detención de la progresión del ciclo celular antes de la reparación de DSB es esencial para evitar el paso de mutaciones genéticas perjudiciales a través de las células hijas en la mitosis. Esta detención del ciclo se ve facilitada por la activación de Chk1 y Chk2 (Sancar et al, 2004; Zachos et al, 2003; Zhou & Bartek, 2004), lo que resulta en la parada del ciclo en los puntos de control de las fases G₂/M y S. Si el daño en el DNA se considera demasiado severo para una reparación efectiva, entonces puede tener lugar la muerte celular por apoptosis. Este proceso es desencadenado por Chk2 a través de la fosforilación de p53, E2F1 y PML (Pommier et al, 2005; Zhou & Bartek, 2004) (Figura 1.5).

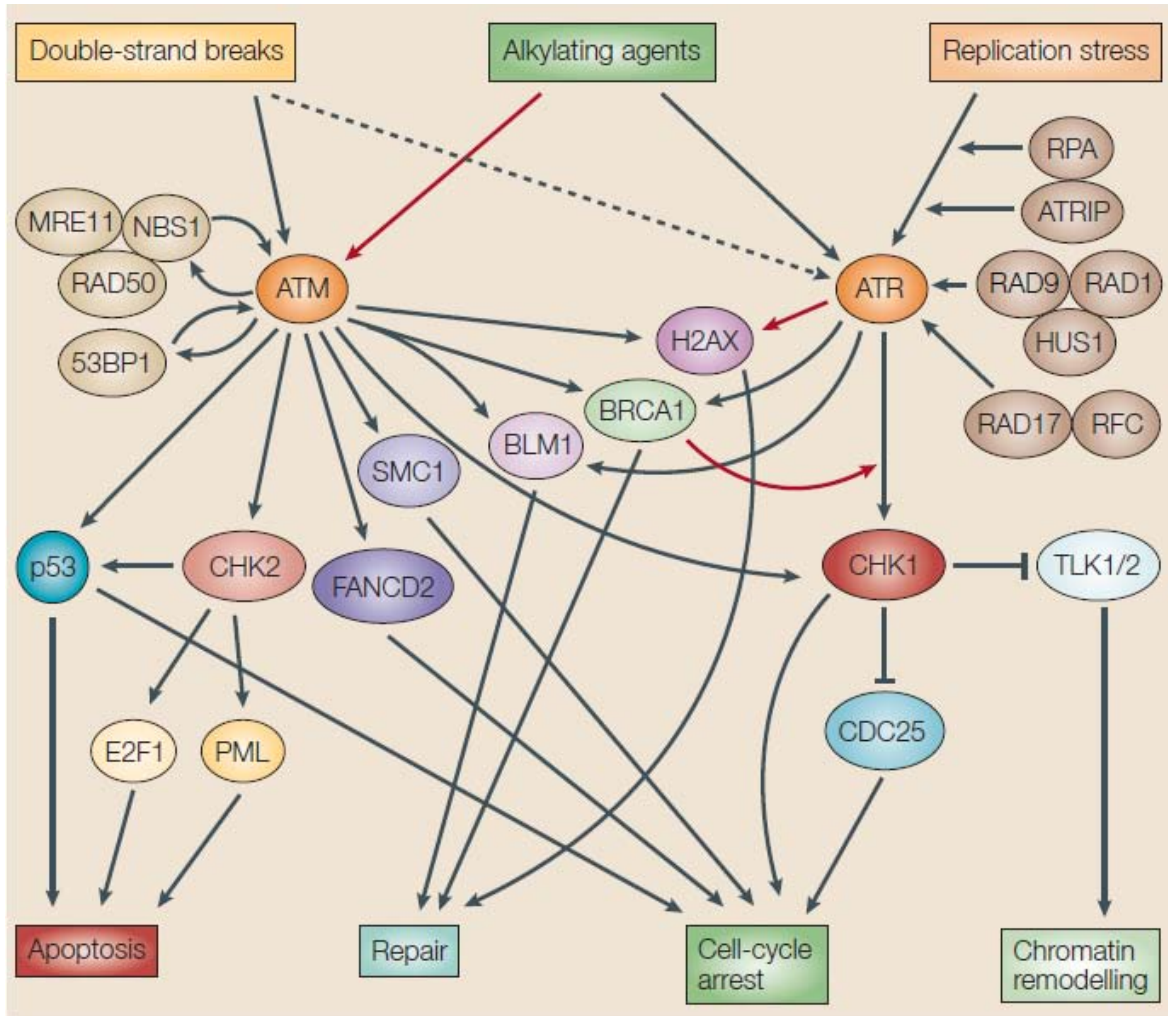


Figura 1.5. Red de transducción de señales en la respuesta al daño en el DNA. Representación de las dos vías paralelas que responden a los diferentes tipos de daño en el DNA. La vía de ATM responde a la presencia de roturas de doble cadena (DSB) y actúa en todas las fases del ciclo celular. Esta vía también puede activar muchos de los componentes de la vía de ATR, que responde a las DSB pero más lentamente. Además, la vía de ATR puede responder a agentes que interfieren con la función de las horquillas de replicación del DNA. Los agentes alquilantes del DNA pueden activar ambas vías. La proteína RPA es necesaria para el reclutamiento de ATR, y la proteína ATRIP para su reclutamiento en los sitios de DSB y para mediar la activación de CHK1 por ATR. Por otra parte, el complejo MRN se une a ATM y al DNA. Las quinasas ATM, ATR, CHK1 y CHK2 forman el núcleo de la red de respuesta al daño en el DNA, cuyas señales activan varios efectores. Estos efectores incluyen proteínas implicadas en la reparación del DNA, la regulación de la transcripción, la replicación, el control del ciclo celular y la apoptosis, como BRCA1, FANCD2, NBS1, H2AX, BLM1, 53BP1, CDC25 y p53. CHK1 es importante en el punto de control y replicación de la respuesta a las lesiones del DNA, mientras que CHK2 es importante en la apoptosis inducida por el daño. Figura tomada de Zhou and Bartek (2004).

Los dos mecanismos principales de reparación de DSB en humanos son HR y NHEJ. Estas dos vías operan independientemente, pero comparten algunas proteínas comunes. La ruta utilizada para reparar el daño en el DNA depende principalmente del origen de la DSB y de la fase del ciclo celular en la que ésta se produce (Takata et al, 1998). HR es una vía libre de errores que depende de la proximidad de la cromátida hermana, de modo que sólo se lleva a

cabo a finales de la fase S y en la fase G₂ del ciclo celular (O'Driscoll & Jeggo, 2006). NHEJ, como su nombre indica, une dos extremos de DNA roto y por tanto no requiere la síntesis de una hebra molde complementaria, por lo que puede ocurrir en cualquier etapa del ciclo celular. Sin embargo, su principal actuación se produce antes de la replicación en G₀ y G₁ (Chu, 1997).

1.3.2. Reparación de DSB: recombinación homóloga (HR)

La recombinación homóloga desempeña un papel importante en la reparación de DSB que surgen como resultado de horquillas de replicación detenidas ante SSB no reparadas (Helleday et al, 2007). En este proceso y una vez activada, ATM fosforila una serie de proteínas, entre las que se incluyen: BRCA1, la histona H2AX, Chk1, Chk2 y el complejo MRN (Mre-11-Rad50-NBS1) (Figura 1.6, panel izquierdo). Tras esta fosforilación, el complejo MRN corta, a través de su actividad exonucleasa 5'-3', la secuencia dañada de DNA, dejando expuestos los extremos cohesivos 3' del DNA en cada lado de la DSB. A continuación Rad51, uno de los principales componentes de HR, localiza el sitio de daño a través de BRCA2, al que se une (Yang et al, 2002), y facilita, mediante la ayuda de la proteína RPA (del inglés *replication protein A*), el ensamblaje de un filamento de nucleoproteína helicoidal conocido como filamento pre-sináptico (mostrado en la Figura 1.6 II). Se cree que en este proceso también están involucradas las proteínas XRCC2, XRCC3 y Rad51B, C y D. Rad51, con la ayuda de Rad54, identifica una secuencia homóloga de DNA intacto y facilita su invasión en el sitio de la rotura. Esta secuencia actúa como molde para sintetizar una nueva secuencia idéntica de DNA. Finalmente los extremos intercambiados, conocidos como uniones de *Holliday*, se unen por resolvasas (Constantinou et al, 2001).

1.3.3. Reparación de DSB: recombinación no homóloga (NHEJ)

La recombinación de extremos no homólogos o NHEJ es el principal mecanismo en células de mamífero mediante el cual se reparan las DSB (Chu, 1997). Es una vía propensa a errores que puede dar lugar a la delección o inserción de pares de bases. Los componentes principales del sistema NHEJ (que se muestran en el panel derecho de la Figura 1.6) son DNA-PK (del inglés *DNA-dependent protein kinase*), DNA ligasa 4, XRCC4 (del inglés *X-ray cross complementation group 4*) y la nucleasa Artemis (Collis et al, 2005). La DNA-PK, el componente principal de este sistema, es una serín/treonín proteína quinasa nuclear que consiste en una subunidad catalítica (cs) (DNA-PKcs) y una subunidad reguladora de unión al DNA (Ku). Tras una DSB, el heterodímero de Ku (Ku70+Ku80) se une a ambos extremos libres del DNA de la DSB, manteniéndolos localizados (Bernstein et al, 2002). A continuación

el heterodímero Ku recluta a la DNA-PKcs para formar el complejo Ku+DNA-PKcs, que estimula la actividad de la DNA-PKcs a través de su fosforilación (Chan & Lees-Miller, 1996; Gottlieb & Jackson, 1993). Ésta se convierte ahora en la proteína quinasa activa DNA-PK. Esta proteína une los extremos de la rotura para su procesamiento antes de la re-ligación. En este procesamiento participan el complejo MRN, FEN1 y Artemis, reclutados en la zona dañada para eliminar excesos de DNA en los extremos y preparar la zona (Collis et al, 2005). A continuación, los nuevos extremos de DNA son sintetizados por una DNA polimerasa y, finalmente, el procesamiento y ligación de los mismos se logra por acción del complejo XRCC4/ligasa IV para formar una única molécula de DNA (Christmann et al, 2003).

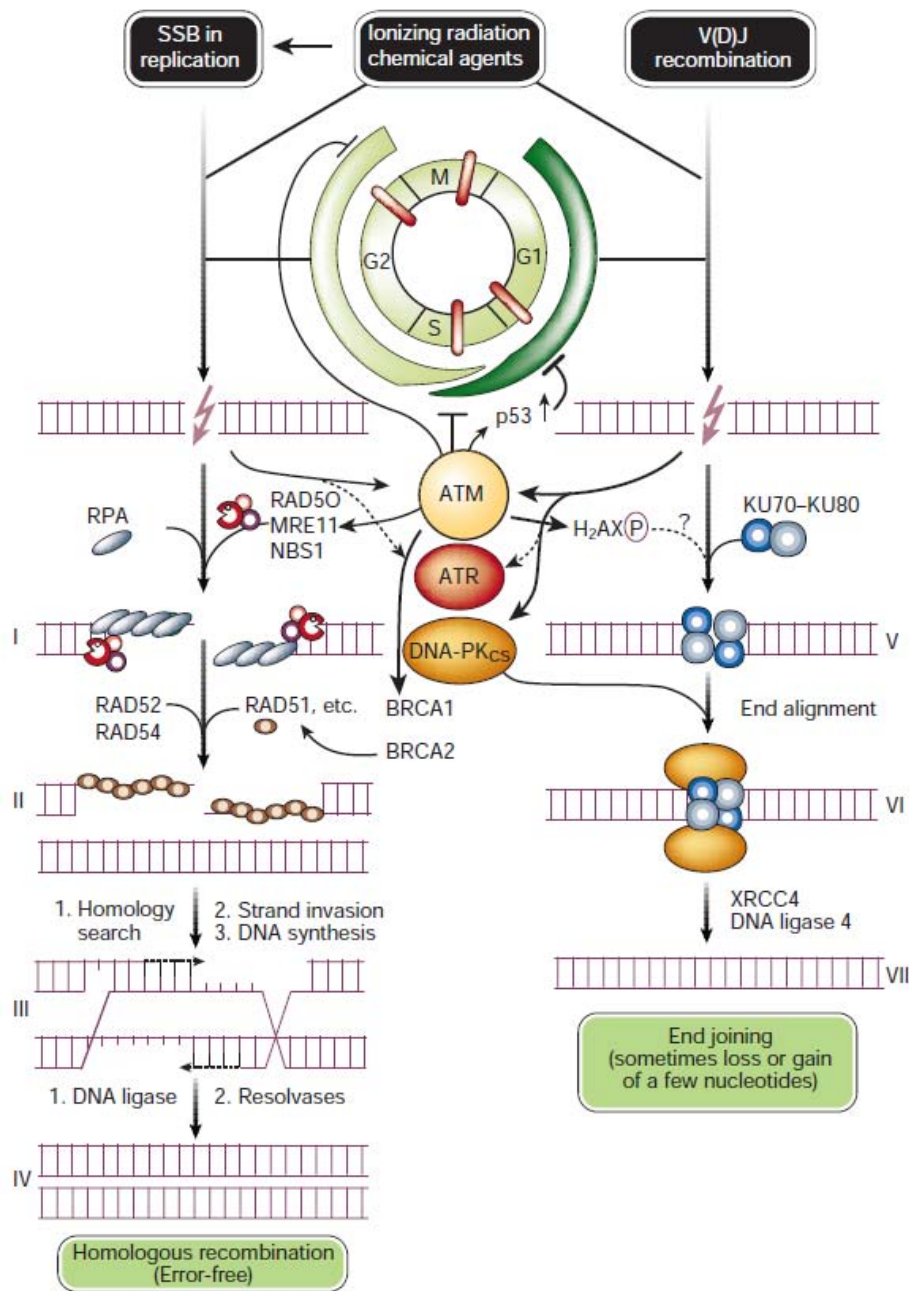


Figura 1.6. Vías de reparación de DSB del DNA. *Recombinación homóloga:* (I) Tras la DSB, el DNA es cortado por el complejo MRN y Rad51 localiza la rotura vía BRCA2. (II) Rad51 y proteínas relacionadas, con la ayuda de la proteína RPA, ensamblan el filamento pre-sináptico. (III) Rad51 y Rad54 identifican la secuencia homóloga de DNA, facilitan la invasión del sitio dañado y se sintetiza la nueva secuencia de DNA. (IV) Los extremos intercambiados (uniones de *Holliday*) son religados por resolvasas. *Recombinación de extremos no homólogos (NHEJ):* (V) el heterodímero de Ku (Ku70 + Ku80) se une al DNA dañado para iniciar NHEJ. (VI) La proteína quinasa activa DNA-PK (Ku + DNA-PKcs) une los extremos de la rotura para procesarlos antes de la re-ligación. (VII) El complejo MRN, FEN1 y Artemis eliminan excesos de DNA en los extremos. La síntesis del nuevo DNA es llevada a cabo por una polimerasa y la ligación se produce vía XRCC4 y DNA ligasa 4. Figura tomada de Hoeijmakers (2001).

1.3.4. Proteína quinasa dependiente de DNA (DNA-PK) e inhibidores

La DNA-PK es uno de los componentes principales del sistema NHEJ en la reparación de DSB producidas en el DNA. Esta molécula es una serín/treonín proteína quinasa nuclear con una masa molecular de aproximadamente 470KDa, cuyo gen está localizado en el cromosoma humano 8. Está formada por una subunidad reguladora, que contiene las subunidades Ku70 y Ku80, y por una subunidad catalítica, DNA-PKcs (Jeggo et al, 1995; Smith & Jackson, 1999). DNA-PK es miembro de la superfamilia fosfatidilinositol 3-quinasa (PIKK) (Collis et al, 2005), junto con ATM y ATR (Shiloh, 2003; Yang et al, 2003).

DNA-PKcs tiene una estructura con forma de corona en su parte alta, separada de una forma redondeada en la parte inferior, que sugiere que el mecanismo funcional de esta proteína incluye la internalización de la doble hebra de DNA (Boskovic et al, 2003; Leuther et al, 1999; Llorca & Pearl, 2004). Una de las funciones de DNA-PKcs es proteger y alinear los extremos rotos del DNA, así como actuar de proteína guía al sitio de daño para otras proteínas reparadoras (Collis et al, 2005). Asimismo, DNA-PKcs se encuentra en el extremo de los cromosomas, sugiriendo un papel en el mantenimiento de la estabilidad telomérica y en la prevención de la fusión de los extremos de los cromosomas (d'Adda di Fagagna et al, 2001; Gilley et al, 2001). También ha sido implicada en la reparación por recombinación homóloga, en la sensibilidad a la radiación y en interacciones con NFκB en la respuesta inflamatoria (Kong et al, 2011).

Estudios recientes han revelado la importancia de DNA-PKcs en la estabilización de la formación del huso mitótico, en la prevención de la inducción de husos multipolares y células multinucleadas y en la prevención de la catástrofe mitótica en respuesta al daño en el DNA (Shang et al, 2010). Las células que carecen de DNA-PK son hipersensibles a la radiación ionizante y a agentes reticulantes, así como defectuosas en la reparación de DSB (Caldecott & Jeggo, 1991; Gu et al, 1997; Smith & Jackson, 1999; Tanaka et al, 1993).

Partiendo de la base de que la inhibición de la reparación del DNA es una estrategia atractiva en la terapia del cáncer, se ha demostrado que inhibidores específicos de la DNA-PK pueden utilizarse como una herramienta eficaz en combinación con otros agentes. El primer inhibidor identificado de la familia PIKK fue el metabolito fúngico wortmanina. Aunque se utilizó principalmente como un inhibidor de PIKK, se demostró que potenciaba la citotoxicidad inducida por IR e inhibía la reparación de DSB del DNA a concentraciones que inhiben la DNA-PK celular (Boulton et al, 1999; Boulton et al, 1996; Izzard et al, 1999; Rosenzweig et al, 1997).

Posteriormente se sintetizaron los inhibidores NU7026 y NU7441, utilizados en este trabajo. El NU7026 (*2-(morpholin-4-yl)-benzo[h]chromen-4-one*), desarrollado por la Universidad de Newcastle, es un inhibidor competitivo y altamente selectivo de DNA-PK, con una potencia 60 veces mayor para esta enzima que para otras de la familia PIKK, e inactivo tanto para ATM como para ATR (Veuger et al, 2003). Además, NU7026 es un potente radiosensibilizador e inhibidor de la reparación de DSB (Veuger et al, 2003). Willmore y colaboradores describieron los efectos del NU7026 sobre los mecanismos citotóxicos de varios inhibidores de topoisomerasa II en la línea celular humana de leucemia K562, poniendo de manifiesto el potencial de esta molécula inhibidora de DNA-PK en clínica (Willmore et al, 2004).

Por otra parte, el inhibidor NU7441 (*2-N-morpholino-8-dibenzothiophenyl-chromen-4-one*), desarrollado en la Universidad de Newcastle en colaboración con la farmacéutica KuDOS (ahora Astrazeneca), es un inhibidor potente y selectivo de DNA-PK, con una potencia 100 veces mayor para esta enzima que para otras de la familia PIKK (Zhao et al, 2006). Se ha demostrado que la inhibición de DNA-PK por NU7441 incrementa la citotoxicidad de la radiación ionizante y de la doxorubicina en hámsters y líneas tumorales humanas competentes para DNA-PK, no incrementando estos efectos en las células deficientes para esta proteína (Tavecchio et al, 2012).

1.3.5. Ataxia telangiectasia mutada (ATM) e inhibidores

La ATM es una proteína perteneciente a la familia de proteína quinasas PIKK (Zakian, 1995), que juega un papel crítico en el mantenimiento de la integridad del genoma (Abraham, 2001; Shiloh, 2003). La mutación de ATM se produce en el síndrome autosómico recesivo humano ataxia-telangiectasia (A-T), caracterizado por varios síntomas, entre los que se incluyen la degeneración cerebelosa, telangiectasia oculocutánea, retraso del crecimiento, deficiencias inmunitarias y características de envejecimiento prematuro (Lavin & Shiloh, 1997; Rotman & Shiloh, 1998). A nivel celular, A-T se caracteriza por una hipersensibilidad a la radiación ionizante y a las drogas radiomiméticas, inestabilidad cromosómica y un fallo de la detención el ciclo celular tras daño en el DNA, reduciendo la oportunidad para reparar el genoma antes de la replicación o de la mitosis (Lavin & Shiloh, 1997; Rotman & Shiloh, 1998).

ATM destaca por su papel como movilizador de la respuesta celular ante las lesiones del DNA (Shiloh & Ziv, 2013). Las moléculas de ATM permanecen inactivas en células normales, como dímeros o multímeros de orden superior. Sin embargo, fosforilaciones

intermoleculares rápidas tras la inducción de daño liberan inmediatamente los monómeros activos de ATM (Bakkenist & Kastan, 2003). Tras la inducción de DSB y activación de esta proteína, ATM sufre una relocalización espacial, reclutándose rápidamente una parte en los sitios de daño y permaneciendo la otra parte libre en el núcleo (Shiloh, 2003). Las moléculas de ATM asociadas al sitio de daño transducen la alarma de DSB a numerosos efectores, a través de eventos de fosforilación y otras modificaciones postraduccionales. Éstos, a su vez, activan tanto vías de supervivencia como de muerte celular, cuyo resultado final dependerá de un equilibrio entre estos dos procesos opuestos (Shiloh & Ziv, 2013) (Figura 1.7).

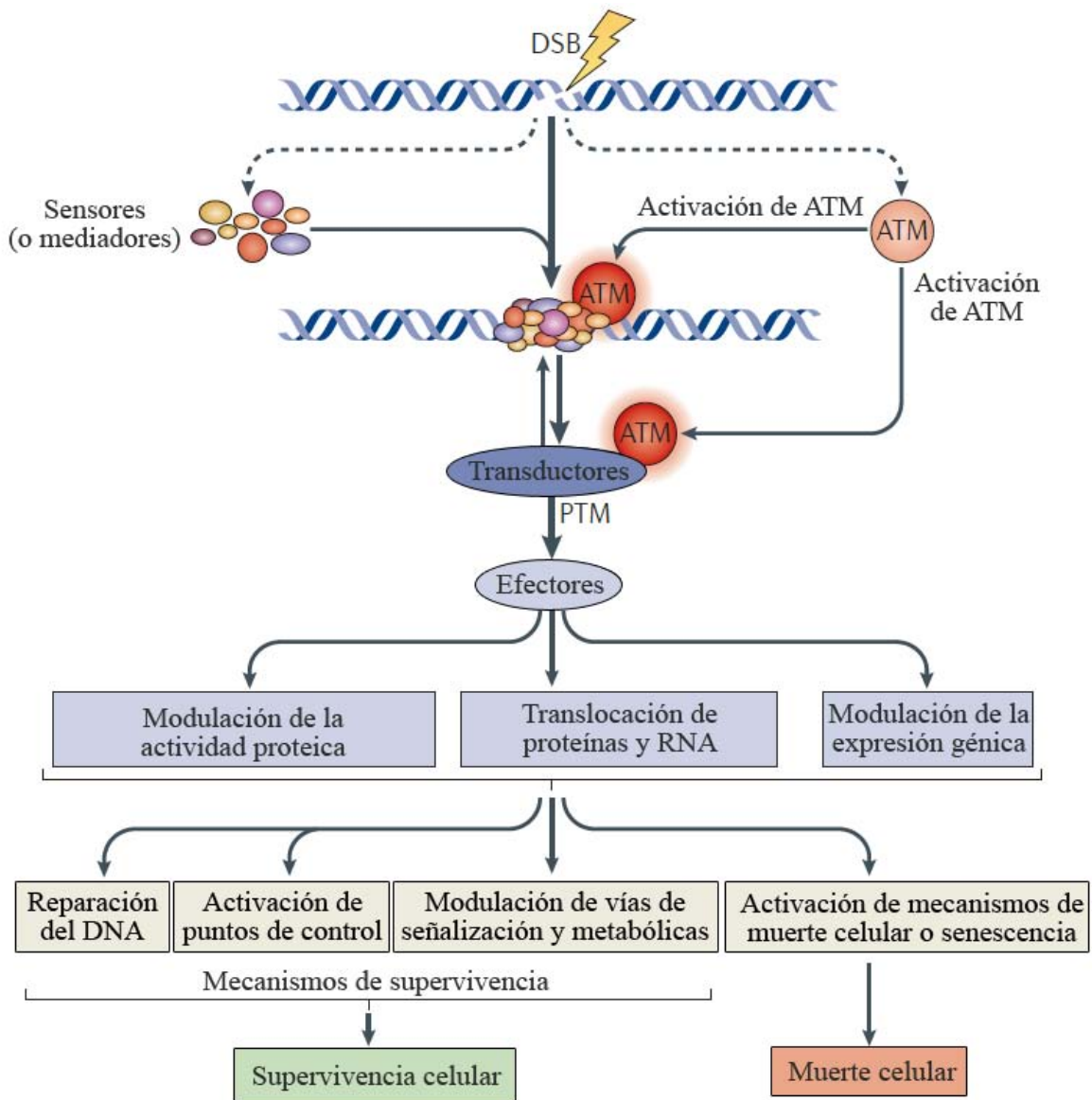


Figura 1.7. Cascada de respuesta al daño en el DNA y ATM. La amplia y estructurada cascada de respuesta al daño en el DNA es iniciada por la formación de grandes complejos de proteínas (que incluyen sensores o mediadores) en los sitios de roturas por DSB, que aparecen como acúmulos nucleares bajo el microscopio. La amplia actividad en estos acúmulos (incluyendo la reorganización de la cromatina y

amplificación de la señal de daño), acompañada de modificaciones postraduccionales de una amplia gama de proteínas, prepara el lugar para la reparación y conduce a la activación de proteína quinasa, especialmente de ATM. ATM transduce la alarma de DSB a numerosos efectores que, a su vez, activan tanto vías de supervivencia celular como vías de muerte. El resultado final dependerá de un delicado equilibrio entre estos dos mecanismos. Figura adaptada de Shiloh and Ziv (2013).

Tras exposición a la radiación ionizante, se ha demostrado que las células A-T muestran roturas cromosómicas residuales (Cornforth & Bedford, 1985) y fallos en la reparación de DSB del DNA (Foray et al, 1997), lo que podría explicar la radiosensibilidad e inestabilidad genómica asociada con este síndrome (Lavin & Shiloh, 1997). En base a estos hallazgos, se ha propuesto que la inhibición de ATM podría dar lugar a radiosensibilización y que, por tanto, ATM representa un objetivo atractivo para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos (Sarkaria & Eshleman, 2001).

Inicialmente, en los estudios diseñados para probar los efectos de la inhibición de ATM se utilizaron los inhibidores relativamente inespecíficos de PIKK y PI3K wortmannina y cafeína (Sarkaria et al, 1998). Posteriormente se han desarrollado nuevos compuestos, como el inhibidor específico y potente KU55933 (*2-morpholin-4-yl-6-thianthren-1-yl-pyran-4-one*) (Hickson et al, 2004) utilizado en este trabajo. KU55933 posee una estructura similar a LY294002 y demostró una selectividad por ATM 100 veces mayor en comparación con otras quinasas PIKK (Hickson et al, 2004). Este compuesto sensibiliza células tumorales a los inhibidores de topoisomerasa II (como etopósido, doxorrubicina o camptotecina) mediante la prevención de la fosforilación directa de p53 en serina 15 y/o la fosforilación de p53 en serina 20 (que mantiene la interacción p53/MDM2 e impide la estabilización de p53), ambas llevadas a cabo por ATM (Hickson et al, 2004).

1.4. Estructura y dinámica de los microtúbulos

Los microtúbulos son polímeros del citoesqueleto no covalentes que se encuentran en todas las células eucariotas, y que están involucrados en procesos como la mitosis, la motilidad celular, el transporte intracelular, la secreción, el mantenimiento de la forma celular y la polarización (Conde & Caceres, 2009). Los microtúbulos son estructuras polarizadas compuestas por subunidades de heterodímeros de α y β -tubulina, ensamblados en protofilamentos lineales. Un solo microtúbulo está compuesto por 10-15 protofilamentos (generalmente 13 en células de mamíferos), que se asocian lateralmente para formar un cilindro con un hueco de 24 nm (Figura 1.8 a) (Desai & Mitchison, 1997).

La asociación cabeza-cola de los heterodímeros α/β hace de los microtúbulos estructuras polares, con diferentes velocidades de polimerización en los dos extremos. En cada

protofilamento, los heterodímeros α/β están orientados con los monómeros de β -tubulina hacia el extremo más dinámico (extremo positivo), y los monómeros de α -tubulina hacia el extremo de crecimiento más lento (extremo negativo) (Figura 1.8 a). Una tercera isoforma de la tubulina, la γ -tubulina, participa en el correcto ensamblaje de los microtúbulos (Erickson, 2000).

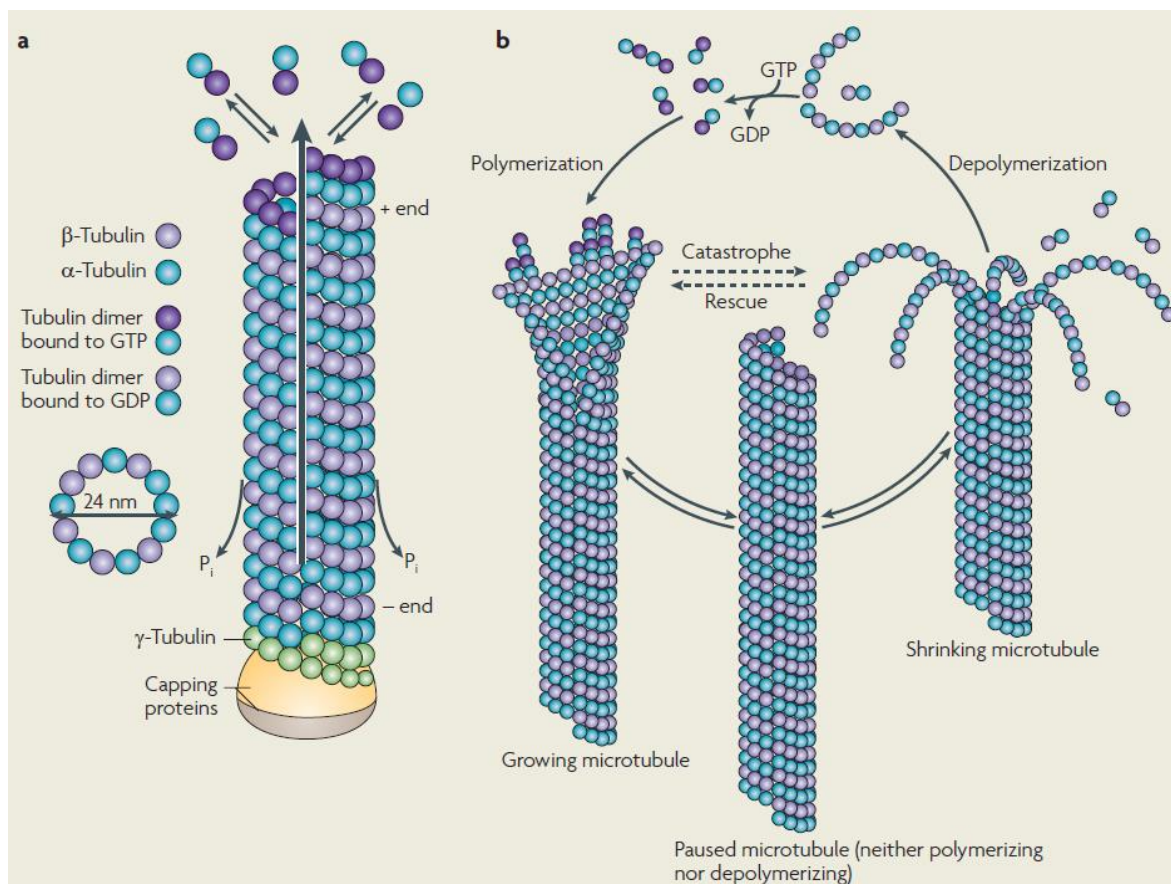


Figura 1.8. Estructura y dinámica de los microtúbulos. a) Estructura polarizada de los microtúbulos, compuesta por subunidades de heterodímeros de α y β -tubulina ensamblados en protofilamentos lineales y asociados para formar un cilindro con un hueco de 24 nm. En cada protofilamento, los heterodímeros α/β están orientados con los monómeros de β -tubulina hacia el extremo más dinámico (extremo positivo), y los monómeros de α -tubulina hacia el extremo de crecimiento más lento (extremo negativo). b) Dinámica de polimerización y despolimerización de los microtúbulos, controlada por moléculas de GTP unidas a β -tubulina. Figura tomada de Conde and Caceres (2009).

Los microtúbulos están constantemente alternando entre crecimiento (polimerización) y acortamiento (despolimerización), con una fase de pausa donde no hay ninguna actividad detectable (Stanton et al, 2011) (Figura 1.8 b). Los procesos de polimerización y despolimerización están controlados por la molécula de GTP unida a la β -tubulina. Así, una molécula de GTP debe estar enlazada a la β -tubulina para que los heterodímeros polimericen, pero ésta se convertirá en GDP una vez se incorpore el dímero. Si el GTP se convierte en GDP

pero el heterodímero unido a GTP no se fija, el extremo positivo se despolimeriza rápidamente (Risinger et al, 2009), desencadenando el desensamblaje de los componentes y formando heterodímeros de GDP-tubulina libres. Estos cambios en la longitud del extremo positivo se denominan “inestabilidad dinámica”. Por otra parte, el extremo negativo del microtúbulo se acorta a la misma velocidad a la que el extremo positivo se alarga, en un proceso conocido como *treadmilling* (Jordan & Wilson, 2004).

Los centrosomas contienen dos centriolos y funcionan como centros organizadores de microtúbulos (MTOC, del inglés *microtubule organising centres*). Antes del inicio de la mitosis, los centrosomas se duplican y forman los dos polos del huso mitótico durante la mitosis (Hinchcliffe & Sluder, 2001). Cuando la envoltura nuclear se rompe, los microtúbulos de los dos centrosomas interactúan con los cromosomas para organizarlos y dividirlos (Tanenbaum & Medema, 2010). Esta duplicación del centrosoma está estrechamente regulada y es esencial para la correcta separación de las cromátidas hermanas, y por lo tanto esencial para el mantenimiento de la estabilidad genómica.

1.4.1. Agentes que interfieren con los microtúbulos (MIAs)

Los microtúbulos tienen una amplia gama de funciones incluyendo la formación del cinetocoro para separar los cromosomas durante la mitosis. Debido a la naturaleza esencial de los microtúbulos, los fármacos dirigidos a los microtúbulos en las células en división pueden prevenir la mitosis celular completa, inducir células tetraploides y conducir a la activación de la apoptosis (Janssen & Medema, 2011). Esta clase de fármacos de unión a tubulina son conocidos como fármacos antimitóticos. En función de los efectos que producen en la masa de los microtúbulos polimerizados a altas concentraciones, los fármacos antimitóticos se clasifican en: 1) agentes desestabilizantes de los microtúbulos (como por ejemplo los alcaloides de la vinca y la colchicina) y 2) agentes estabilizantes de los microtúbulos (como los taxanos, las epotilonas y la discodermolida) (Dumontet & Jordan, 2010). Los agentes desestabilizantes de los microtúbulos inhiben la polimerización de los mismos cuando están presentes a altas concentraciones, mientras que los agentes estabilizantes aumentan la polimerización de los microtúbulos (Dumontet & Jordan, 2010).

1.4.1.1. Alcaloides de la vinca (VAs)

Los alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina), aislados originalmente de la planta *Catharanthus rosea*, es la familia más antigua y más diversificada (en términos del número de compuestos aprobados en una determinada familia) de agentes

dirigidos a los microtúbulos. La vincristina y vinblastina se utilizan principalmente en el tratamiento de neoplasias hematológicas, como leucemias y linfomas (Dumontet & Jordan, 2010), mientras que la vinorelbina, vindesina y vinflunina se utilizan en el tratamiento de cáncer de mama, pulmón y vejiga (Bellmunt et al, 2009; Dumontet & Jordan, 2010). Desafortunadamente, estos agentes están asociados con toxicidades, como la neuropatía y la mielosupresión (Swain & Arezzo, 2008).

Los alcaloides de la vinca se unen a los heterodímeros de α/β -tubulina a través del “dominio de unión de la vinca” (Dumontet & Jordan, 2010). Estos agentes, a elevadas concentraciones, despolimerizan los microtúbulos y destruyen los husos mitóticos (Jordan et al, 1991), dejando a las células cancerosas en división bloqueadas en mitosis con los cromosomas condensados. A concentraciones bajas pero clínicamente relevantes, la vinblastina no despolimeriza los microtúbulos del huso, aunque bloquea fuertemente la mitosis (Jordan et al, 1991) y las células mueren por apoptosis. Varios estudios sobre la acción del bloqueo mitótico de los alcaloides de la vinca a bajas concentraciones en células cancerosas indican que el bloqueo es debido a la supresión de la dinámica de los microtúbulos en lugar de a su despolimerización (Jordan, 2002).

1.4.1.2. Taxanos

El otro grupo importante de agentes dirigidos a los microtúbulos son los taxanos. Los principales taxanos utilizados clínicamente son el paclitaxel y el docetaxel. Inicialmente se descubrió que el paclitaxel promovía el ensamblaje de los microtúbulos y su polimerización, a diferencia de los demás agentes que interfieren con los microtúbulos (Schiff & Horwitz, 1980). Sin embargo, y en contraste con el gran número de moléculas del taxano necesarias para aumentar la polimerización de los microtúbulos, se encontró que la unión de un número muy pequeño de moléculas de paclitaxel suprime la dinámica de los microtúbulos, bloqueando la división celular (Wilson & Jordan, 1995). Debido a la estabilización de los microtúbulos, se produce un déficit de tubulina libre y los microtúbulos se acumulan dentro de las células, resultando en la incapacidad para formar el huso mitótico en las células en división y en el inicio de la apoptosis (Jordan et al, 1996; Yvon et al, 1999).

El paclitaxel se utiliza principalmente en el tratamiento de cáncer de ovario, mama y pulmón (Dumontet & Jordan, 2010), mientras que el docetaxel, un análogo semisintético del paclitaxel (Clarke & Rivory, 1999), se utiliza en el tratamiento de cáncer de pulmón, mama, próstata, estómago, cabeza y cuello (Dumontet & Jordan, 2010). Algunos de los principales

efectos secundarios del docetaxel son neutropenia, reacciones de hipersensibilidad y retención de líquidos (Baker et al, 2009).

Los fármacos antimetabólicos utilizados en este trabajo fueron la vincristina y el paclitaxel.

1.5. Muerte celular

1.5.1. Apoptosis

La apoptosis es un modo de muerte celular utilizado por los organismos multicelulares para deshacerse de las células no deseadas en una diversidad de escenarios. Las células sometidas a apoptosis son destruidas de una manera controlada, que minimiza el daño y la interrupción de las células vecinas. El desecho celular resultante es eliminado, normalmente por fagocitos, y generalmente una nueva célula toma el lugar de la antigua en cuestión de horas (Kerr et al, 1972).

Las células que se someten a esta forma de muerte celular se caracterizan por sufrir una reducción de su volumen celular (Taylor et al, 2008). Esto va acompañado por la formación de rugosidades en la membrana plasmática y por el desprendimiento de pequeñas vesículas llamadas cuerpos apoptóticos, estructuras formadas por porciones de la célula recubiertas de membrana (Taylor et al, 2008). Estas estructuras son rápidamente fagocitadas para el reciclaje de su contenido (Kerr et al, 1972; Savill & Fadok, 2000; Wyllie et al, 1980), y para minimizar la activación del sistema inmune. A nivel molecular, una de las características más notables es la condensación de la cromatina y la fragmentación del núcleo en pequeñas piezas (Kerr et al, 1972; Robertson et al, 1978; Wyllie et al, 1980). Los primeros estudios sobre la apoptosis dependían fuertemente de esta característica para su identificación en ausencia de marcadores moleculares específicos. Otra característica que define este modo de muerte celular es la fragmentación de DNA en numerosos fragmentos de unas 200pb (Williams et al, 1974), así como la exposición de la fosfatidilserina de la membrana plasmática al espacio extracelular. Aunque más sutilmente, el aparato de Golgi, retículo endoplásmico (ER) y las redes mitocondriales también sufren una fragmentación pronunciada durante la apoptosis, y numerosas proteínas son liberadas del espacio mitocondrial intermembranoso, como el citocromo c, que puede desencadenar la activación del complejo activador de caspasas o apoptosoma (Taylor et al, 2008).

1.5.1.1. Las caspasas

Las caspasas son una familia de cisteín proteasas que hidrolizan enlaces peptídicos tras un residuo de ácido aspártico (Johnson & Kornbluth, 2008; Kumar, 2007). Estas enzimas son sintetizadas en las células sanas como precursores inactivos (zimógenos) con poca o ninguna actividad proteasa (Nicholson, 1999). Sin embargo, todos los estímulos que desencadenan apoptosis parecen hacerlo mediante el inicio de eventos que culminan en la activación de las caspasas, aunque por diferentes vías. Galluzzi y colaboradores han descrito hasta trece rutas diferentes de muerte celular regulada, seis de las cuales son dependientes de la actividad de estas proteínas (Galluzzi et al, 2012).

De entre las principales caspasas identificadas, diez han sido categorizadas como iniciadoras (caspasa 2, 8, 9, 10), efectoras o ejecutoras (caspasa 3, 6, 7) e inflamatorias (caspasa 1, 4, 5) (Cohen, 1997; Rai et al, 2005). Las caspasas iniciadoras 8 y 10 están implicadas en la vía extrínseca de la apoptosis, mientras que las caspasas 9 y 2 actúan en la vía intrínseca. Ambas vías finalizan con la fase efectora, el final de la apoptosis, desencadenada por la activación de las caspasas efectoras. Estas caspasas activan endonucleasas citoplasmáticas, que degradan el material nuclear, y proteasas, que degradan proteínas nucleares y citoesqueléticas (Slee et al, 2001), produciendo los cambios bioquímicos y morfológicos característicos de las células apoptóticas mencionados anteriormente.

1.5.1.2. Vías de activación de la apoptosis

1.5.1.2.1 Apoptosis extrínseca

El término “apoptosis extrínseca” se utiliza para indicar los casos de muerte celular apoptótica que son inducidos por señales de estrés extracelulares detectadas y propagadas por receptores específicos transmembrana (Mehlen & Bredesen, 2011; Schutze et al, 2008; Wajant, 2002). La apoptosis extrínseca puede ser iniciada por la unión de ligandos letales, como FAS/CD95 (FASL/CD95L), el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) o el miembro 10 de la superfamilia del TNF (TNFSF10, más conocido como TRAIL, del inglés *TNF-related apoptosis inducing ligand*) a varios receptores de muerte (FAS/CD95, receptor 1 de $TNF\alpha$ (TNFR1) y los receptores 1 y 2 de TRAIL (TRAILR), respectivamente) (Wajant, 2002). Como alternativa, una señal pro-apoptótica extrínseca puede ser enviada por los llamados “receptores de dependencia”, como los receptores de netrina, que sólo ejercen funciones letales cuando las concentración de sus ligandos específicos caen por debajo de un nivel umbral crítico (Mehlen & Bredesen, 2011).

Una vía de señalización característica de la apoptosis extrínseca se produce tras la unión de FAS (Galluzzi et al, 2012) (Figura 1.9). La unión del ligando al receptor induce la trimerización del mismo, que provoca el reclutamiento de una serie de proteínas que forman un complejo citoplasmático alrededor del receptor. Esto ocurre debido a una secuencia conservada de 80 residuos que es compartida por todos los receptores de muerte, el llamado “dominio de muerte” (DD, del inglés *death domain*) (Boldin et al, 1995; Schulze-Osthoff et al, 1998). Las proteínas reclutadas en el DD de FAS incluyen, entre otras: RIPK1 (del inglés *receptor-interacting protein kinase 1*), FADD (del inglés *FAS-associated protein with a DD*), c-FLIPs, cIAPs (del inglés *cellular inhibitor of apoptosis proteins*) y procaspasa 8 (ó 10). El complejo supramolecular resultante denominado DISC (del inglés *death-inducing signaling complex*), constituye una plataforma que regula la activación de la caspasa 8 (ó 10) (Kischkel et al, 1995; Muzio et al, 1996). Dentro del disco, c-FLIPs y cIAPs ejercen señales de supervivencia. Sin embargo, cuando las señales letales prevalecen, la caspasa 8 se activa y puede desencadenar directamente la fase ejecutora de apoptosis mediante la maduración proteolítica de la caspasa 3 (Srinivasula et al, 1996) (en células de tipo I como linfocitos) o la estimulación de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) mediante la escisión de la proteína BID (del inglés *BH3-interacting domain death agonist*) (Yin et al, 1999) (en células de tipo II, como hepatocitos o células pancreáticas β).

Por tanto, según Galluzzi y colaboradores, la apoptosis extrínseca es una vía de muerte celular dependiente de caspasas, que presenta una de entre estas tres grandes cascadas de señalización letal: (i) señalización del receptor de muerte, activación de caspasa 8 (ó 10) y vía de caspasa 3; (ii) señalización del receptor de muerte y activación de la caspasa 8, tBID, MOMP, caspasa 9 y vía de caspasa 3; ó (iii) señalización del receptor de dependencia inducida por la privación de ligando seguido de la activación de caspasa 9 (directa o dependiente de MOMP) y vía de caspasa 3 (Galluzzi et al, 2012).

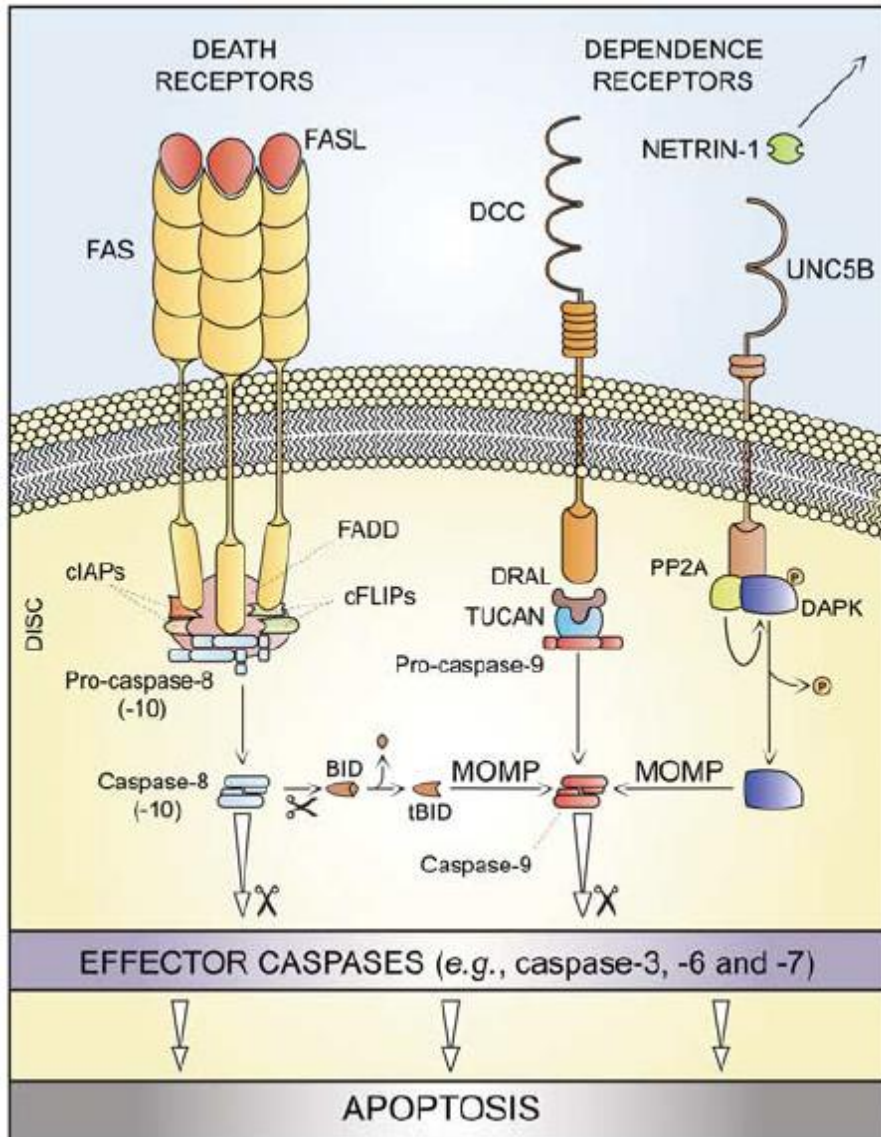


Figura 1.9. Apoptosis extrínseca. Tras la unión del ligando FAS (FASL) al receptor se induce la trimerización del mismo, que provoca el reclutamiento de una serie de proteínas que forman un complejo citoplasmático alrededor del receptor. Las proteínas reclutadas en la secuencia llamada “dominio de muerte” (DD) del receptor de FAS incluyen, entre otras: RIPK1, FADD, c-FLIPs, cIAPs y procaspasa 8 (ó 10). El complejo supramolecular resultante denominado DISC, o complejo de señalización inductor de muerte, regula la activación de la caspasa 8 (ó 10). Dentro del disco, c-FLIPs y cIAPs ejercen señales de supervivencia. Sin embargo, cuando las señales letales prevalecen, la caspasa 8 se activa y puede desencadenar directamente la fase ejecutora de apoptosis mediante la maduración proteolítica de la caspasa 3 (en células tipo I) o estimulando la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) mediante la escisión de la proteína BID (en células de tipo II). La apoptosis extrínseca también puede activarse por los receptores de dependencia DCC ó UNC5B, que retransmiten señales letales en ausencia de su ligando (netrina-1). En ambos casos se llegará, en última instancia, a la estimulación de MOMP y a la activación de caspasas efectoras. tBID, BID truncada. Figura tomada de Galluzzi et al (2012).

1.5.1.2.2 Apoptosis intrínseca dependiente o independiente de caspasas

En respuesta a múltiples condiciones de estrés intracelular, como daños en el DNA, estrés oxidativo o la sobrecarga de Ca^{2+} citosólico, se generan señales de supervivencia y

señales de muerte, que convergen en un mecanismo de control mitocondrial (Kroemer et al, 2007). Cuando las señales letales prevalecen, tiene lugar la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), debido a la actividad de los miembros proapoptóticos de la familia de proteínas BCL-2 BAK y BAX o a la actividad del complejo multiproteico PTPC (del inglés *permeability transition pore complex*) en la membrana mitocondrial interna. Este proceso conduce a la disipación del potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), a la detención de la síntesis mitocondrial de ATP y a la detención de actividades de transporte dependientes de $\Delta\psi_m$. Además, las cadenas respiratorias se desacoplan, conduciendo a una superproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la liberación de proteínas al citosol que se encuentran normalmente dentro del espacio intermembrana mitocondrial (IMS). Entre éstas, el citocromo c (CYTC), junto con la proteína citoplasmática APAF1 (del inglés *Apoptosis Protease-Activating Factor 1*) y dATP, participan en la formación del apoptosoma, un complejo multiproteico que desencadena la cascada proteolítica caspasa 9-caspasa 3 (Li et al, 1997; Zou et al, 1997) (Figura 1.10).

SMAC/DIABLO (del inglés *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases y Direct IAP-Binding protein with LOw pI*) y la proteína HTRA2 facilitan la activación de caspasas secuestrando y/o degradando varios miembros de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) (Chai et al, 2000; Vande Walle et al, 2007). Por el contrario, el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G (ENDOG) se trasladan al núcleo, y median la fragmentación del DNA a gran escala en un mecanismo independiente de caspasas (Joza et al, 2001). La serín proteasa HTRA2 también contribuye a la apoptosis independiente de caspasas mediante la escisión de una amplia gama de sustratos celulares (incluyendo proteínas del citoesqueleto) (Figura 1.10).

Galluzzi y colaboradores definen la apoptosis intrínseca como un proceso de muerte celular mediado por MOMP y que por lo tanto está siempre asociado con: (i) una disipación generalizada e irreversible del potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$); (ii) la liberación de proteínas IMS al citosol (y su posible relocalización a otros compartimentos subcelulares); (iii) la inhibición de la cadena respiratoria. Asimismo, proponen diferenciar entre apoptosis intrínseca dependiente o independiente de caspasas (Galluzzi et al, 2012).

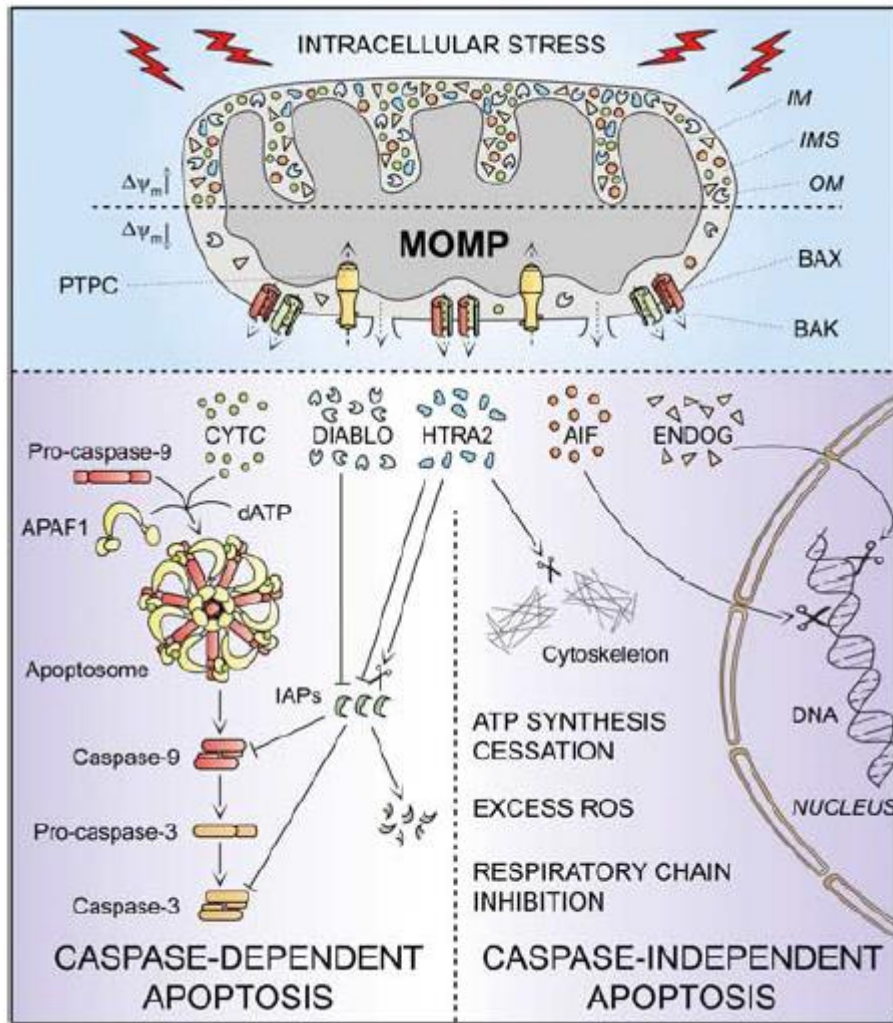


Figura 1.10. Apoptosis intrínseca dependiente o independiente de caspasas. En respuesta a múltiples condiciones de estrés intracelular (por ejemplo, daños en el DNA, estrés oxidativo o sobrecarga de Ca^{2+} citosólico) se generan señales de supervivencia y de muerte, que convergen en un mecanismo de control mitocondrial. Cuando las señales letales prevalecen, tiene lugar la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP), que conduce a la disipación del potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), a la detención de la síntesis mitocondrial de ATP y a la detención de actividades de transporte dependientes de $\Delta\psi_m$. Además, las cadenas respiratorias se desacoplan, conduciendo a una superproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la liberación de proteínas al citosol que se encuentran normalmente dentro del espacio intermembrana mitocondrial (IMS). Entre éstas, el citocromo c (CYTC) junto con la proteína citoplasmática APAF1 y dATP, participan en la formación del apoptosoma, un complejo multiproteico que desencadena la cascada proteolítica caspasa 9-caspasa 3. Por otra parte, SMAC/DIABLO y HTRA2 facilitan la activación de caspasas mediante el secuestro y/o degradación de varios miembros de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs). Por el contrario, el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G (ENDOG) se trasladan al núcleo, y median la fragmentación del DNA a gran escala en un mecanismo independiente de caspasas. HTRA2 también contribuye a la apoptosis independiente de caspasas mediante la escisión de sustratos celulares (incluyendo proteínas del citoesqueleto). IM, membrana mitocondrial interna; OM, membrana mitocondrial externa; PTPC, transición de la permeabilidad del poro mitocondrial. Figura tomada de Galluzzi et al (2012).

1.5.2. Necroptosis

La necrosis regulada o necroptosis es un proceso desencadenado por varios factores, como la alquilación del DNA, excitotoxinas o la ligación de receptores de muerte (Cho et al, 2009; He et al, 2009). En este último caso, tras la unión del factor de necrosis tumoral α (TNF α), la colas citoplasmáticas del receptor TNFR1 reclutan las proteínas TRADD (del inglés *TNFR-associated death domain*), RIP1 (*receptor-interacting protein kinase 1*), cIAP1 (del inglés *cellular inhibitor of apoptosis 1*), cIAP2, TRAF2 (del inglés *TNFR-associated factor 2*) y TRAF5. Dentro del llamado complejo I, RIP1 es poliubiquitinado por cIAPs, proporcionando así un sitio de acoplamiento para el reclutamiento de otras proteínas (como TAK1, del inglés *transforming growth factor β (TGF β)-activated kinase 1*; TAB2, del inglés *TAK1-binding protein 2*; y TAB3). Cuando las caspasas (y en particular la caspasa 8) están inhibidas por manipulaciones genéticas o bloqueadas por agentes farmacológicos, RIP1 deubiquitinada por CYLD (del inglés *cylindromatosis*) y su homólogo RIP3 no son degradadas y participan en interacciones físicas y funcionales que, en última instancia, activan la ejecución de la muerte celular necrótica (Cho et al, 2009; He et al, 2009).

La necrosis regulada también puede ser inducida por la alquilación del DNA, posiblemente por la sobreactivación de la poli (ADP-ribosa) polimerasa 1 (PARP1) (Galluzzi et al, 2012).

1.5.3. Catástrofe mitótica

Según Galluzzi y colaboradores, la catástrofe mitótica no constituye una vía ejecutora de muerte celular en sí, sino un mecanismo oncosupresivo que: (i) se inicia por perturbaciones del aparato mitótico (por ejemplo, los cromosomas y la maquinaria que asegura su correcta segregación); (ii) es iniciado durante la fase M del ciclo celular; (iii) es paralelo a un cierto grado de detención de la mitosis; y (iv) provoca, en última instancia, la muerte celular o senescencia (Galluzzi et al, 2012).

En ausencia de perturbaciones químicas y genéticas del aparato mitótico, las células progresan a través de las diferentes fases del ciclo celular para generar una descendencia diploide. Por el contrario, si defectos cromosómicos o problemas que afectan a la maquinaria mitótica se detectan durante la fase M, las células se detienen en mitosis debido a la activación de la catástrofe mitótica. Estas células sufrirán entonces diferentes destinos: 1) pueden morir sin salir de la mitosis; 2) pueden alcanzar la fase G₁ del ciclo celular posterior (a través de un fenómeno que se conoce como deslizamiento mitótico) y, posteriormente, morir; ó 3) salir de

la mitosis y sufrir senescencia. Independientemente de los resultados, la catástrofe mitótica se define como un mecanismo oncosupresivo que precede y es distinto de la muerte celular y la senescencia, aunque opera a través de ellas (Galluzzi et al, 2012).

2. OBJETIVOS

Actualmente el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata se aborda con terapias de primera línea, como la cirugía, la radioterapia o fármacos antiandrógenos, aunque su progreso hacia un estado refractario hormonal hace que la quimioterapia sea el tratamiento más eficaz. Aunque estos tratamientos han aumentado la supervivencia de los pacientes, la resistencia y la producción de efectos secundarios destaca la importancia de identificar nuevas dianas terapéuticas en este tipo de tumores.

Los fármacos inhibidores de la reparación del DNA han demostrado sensibilizar, tanto en combinación como en solitario, una gran variedad de células tumorales, por lo que constituyen una estrategia atractiva y prometedora en la terapia del cáncer actual.

El objetivo general de esta tesis ha sido investigar el efecto de la combinación de inhibidores de topoisomerasa II con fármacos inhibidores de la reparación del DNA en una línea tumoral de cáncer de próstata, con los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de los inhibidores de TOP2 mitoxantrona y doxorubicina en la línea celular PC-3.
2. Estudiar el efecto de los inhibidores de DNA-PK NU7026 y NU7441, así como del inhibidor de ATM KU55933.
3. Analizar el efecto de la combinación de la mitoxantrona y la doxorubicina con los inhibidores de DNA-PK y KU55933.
4. Estudiar los mecanismos de muerte celular inducidos por los fármacos objeto de este estudio.

3. MATERIALES

3.1. Líneas celulares

Durante el desarrollo de la tesis doctoral se han utilizado las líneas celulares tumorales: HeLa (células epiteliales de adenocarcinoma cervical; N° ATCC: CCL-2), MCF7 (células tumorales de adenocarcinoma mamario; N° ATCC: HTB-22), A549 (células epiteliales de adenocarcinoma alveolar; N° ATCC: CCL-185) y PC-3 (células procedentes de un adenocarcinoma de próstata independiente de andrógenos, N° ATCC: CRL-1435). No obstante, para la realización de los experimentos descritos en el presente trabajo se ha utilizado la línea PC-3, proporcionada por la Dra. Rosa Sáinz Menéndez y el Dr. Juan Carlos Mayo Barrallo de la Universidad de Oviedo (Oviedo, Asturias). Este tipo celular es p53 $-/-$ y posee bajos niveles de receptor de andrógenos, el cual a su vez no es funcional.

3.2. Compuestos para el tratamiento celular

Los compuestos indicados en la Tabla 3.1 se utilizaron para el tratamiento de la línea celular PC-3, a las concentraciones indicadas en el apartado de Resultados.

| Compuesto | Concentración en el stock | Disolvente | Casa comercial |
|---------------|---------------------------|----------------|----------------|
| Mitoxantrona | 1mM | Agua destilada | Sigma-Aldrich |
| Doxorrubicina | 1mM | DMSO | Selleckchem |
| Vincristina | 1mM | Etanol | Sigma-Aldrich |
| Paclitaxel | 1mM | DMSO | Sigma-Aldrich |
| NU7026 | 2mM | DMSO | Sigma-Aldrich |
| NU7441 | 2mM | DMSO | Selleckchem |
| KU55933 | 2mM | DMSO | Selleckchem |
| Staurosporina | 1mM | DMSO | Sigma-Aldrich |

Tabla 3.1. Compuestos utilizados para el tratamiento de la línea celular PC-3. Se indican los compuestos correspondientes, la concentración del stock, el disolvente y la casa comercial correspondiente. DMSO: dimetil sulfóxido.

3.3. Kits y enzimas principales

Cell Proliferation Kit I (MTT) (Roche, #11465007001), *CometAssay® Kit* (Trevigen, #4250-050-K), *Caspase-Glo® 3/7 Assay* (Promega, #G8090), *NucView™ 488 and MitoView™ 633 Apoptosis Assay Kit* (LabNet, #30062), *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Sigma-Aldrich, #APOAF), *RNase-Free DNase* (Qiagen, # 79254), *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen, #28025-013), *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Invitrogen, #4367659), *RT²*

Profiler™ PCR Array Human Cell Death PathwayFinder™ (Qiagen, #PAHS-212ZA-12) y *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Invitrogen, #23225).

3.4. Anticuerpos

Los anticuerpos empleados en el presente trabajo se muestran en la Tabla 3.2.

| Anticuerpo | Casa comercial | Referencia | Aplicación | Dilución |
|----------------------------------|-----------------|---------------|------------|----------|
| Phospho-DNA-PK (Ser2056) | Abcam | ab18192 | WB | 1:500 |
| DNA-PKcs | Thermo Shanden | MS-370-P | WB | 1:100 |
| Phospho-ATM (Ser1981) | Cell Signalling | 5883 | WB | 1:1000 |
| ATM | Cell Signalling | 2873 | WB | 1:1000 |
| Cyclin B1 | SCBT | sc-245 | WB | 1:500 |
| Cyclin A | SCBT | sc-239 | WB | 1:100 |
| p-Histone H3 (Ser10) | SCBT | sc-8656-R | WB | 1:50000 |
| β - Actin | Sigma- Aldrich | A5441 | WB | 1:10000 |
| Actin | Sigma- Aldrich | A5060 | WB | 1:10000 |
| Actin | Calbiochem | CP01 | WB | 1:10000 |
| p54 [nrb] | BD | 611278 | WB | 1:10000 |
| EEF1G | Abnova | H00001937-M01 | WB | 1:10000 |
| Annexin II | BD | 610068 | WB | 1:10000 |
| Phospho-Histone H2A.X (Ser139) | Cell Signalling | 2577 | WB | 1:1000 |
| H2A.X | Cell Signalling | 2595 | WB | 1:1000 |
| Rad51 | SCBT | sc-8349 | WB | 1:100 |
| Phospho-Chk2 (T68) | Cell Signalling | 2661 | WB | 1:500 |
| Anti-rabbit IgG - HRP | Cell Signalling | 7074 | WB | 1:2000 |
| Anti-Mouse IgG - Peroxidase | Sigma- Aldrich | A9044 | WB | 1:10000 |
| IRDye 800CW Goat anti-Mouse IgG | LI-COR | 926-32210 | WB | 1:15000 |
| IRDye 680LT Goat anti-Rabbit IgG | LI-COR | 926-68021 | WB | 1:15000 |

Tabla 3.2. Relación de anticuerpos empleados. Se representan los diversos anticuerpos utilizados, indicándose la casa comercial de procedencia, número de referencia, aplicación y dilución de cada uno. WB: Análisis Western.

3.5. Oligonucleótidos

En la Tabla 3.3 se muestran los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la cuantificación por RT-qPCR de los genes indicados.

| Gen | Secuencia (5'-3') | Tamaño del producto |
|--------|------------------------------------|---------------------|
| BCL2L1 | Sentido: GGTCGCATTGTGGCCTTT | 62 pb |
| | Antisentido: TCCTTGTCTACGCTTTCACG | |
| CASP9 | Sentido: CTCTACTTTCAGGTTTTG | 148 pb |
| | Antisentido: TTTCACCGAAACAGCATTAG | |
| FASLG | Sentido: GTTTTTCATGGTCTGGTTG | 139 pb |
| | Antisentido: GCCTATTTGCTTCTCAAAG | |
| IGF1 | Sentido: CCCAGAAGGAAGTACATTTG | 142 pb |
| | Antisentido: GTTAAACAGGTAACCTCGTGC | |
| IGF1R | Sentido: AAAGACAAAATCCCCATCAG | 188 pb |
| | Antisentido: TGCAGGAAATTCTCAAAGAC | |
| TP53 | Sentido: ACCTATGGAACTACTTCCTG | 149 pb |
| | Antisentido: ACCATTGTTCAATATCGTCC | |
| ACTB | Sentido: GACGACATGGAGAAAATCTG | 131 pb |
| | Antisentido: ATGATCTGGGTCATCTTCTC | |

Tabla 3.3. Relación de oligonucleótidos empleados para la cuantificación por RT-qPCR de los genes indicados. En la tabla se muestra la secuencia, orientación y tamaño del producto (en pares de bases, pb) de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes BCL2L1 (BCL2 tipo 1); CASP9 (caspasa 9), FASLG (Fas ligando), IGF1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1), IGF1R (receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1), TP53 (proteína tumoral p53) y ACTB (actina B).

3.6. RT-qPCR array

En la Tabla 3.4 se muestran los 84 genes analizados en el kit denominado *RT² ProfilerTM PCR Array Human Cell Death PathwayFinderTM*, utilizado para la cuantificación por RT-qPCR de los genes indicados.

| Descripción del gen | Símbolo | Referencia (GenBank) |
|---|----------|----------------------|
| C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase | ABL1 | NM_005157 |
| V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 | AKT1 | NM_005163 |
| Apoptotic peptidase activating factor 1 | APAF1 | NM_001160 |
| Amyloid beta (A4) precursor protein | APP | NM_000484 |
| ATG12 autophagy related 12 homolog (S. cerevisiae) | ATG12 | NM_004707 |
| ATG16 autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae) | ATG16L1 | NM_017974 |
| ATG3 autophagy related 3 homolog (S. cerevisiae) | ATG3 | NM_022488 |
| ATG5 autophagy related 5 homolog (S. cerevisiae) | ATG5 | NM_004849 |
| ATG7 autophagy related 7 homolog (S. cerevisiae) | ATG7 | NM_006395 |
| ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G2 | ATP6V1G2 | NM_130463 |
| BCL2-associated X protein | BAX | NM_004324 |
| B-cell CLL/lymphoma 2 | BCL2 | NM_000633 |
| BCL2-related protein A1 | BCL2A1 | NM_004049 |

| | | |
|--|----------|--------------|
| BCL2-like 1 | BCL2L1 | NM_138578 |
| BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) | BCL2L11 | NM_006538 |
| Beclin 1, autophagy related | BECN1 | NM_003766 |
| Baculoviral IAP repeat containing 2 | BIRC2 | NM_001166 |
| Baculoviral IAP repeat containing 3 | BIRC3 | NM_001165 |
| Bcl2 modifying factor | BMF | NM_033503 |
| Chromosome 1 open reading frame 159 | C1orf159 | NM_017891 |
| Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase) | CASP1 | NM_033292 |
| Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP2 | NM_032982 |
| Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP3 | NM_004346 |
| Caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP6 | NM_032992 |
| Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP7 | NM_001227 |
| Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP9 | NM_001229 |
| Coiled-coil domain containing 103 | CCDC103 | NM_213607 |
| CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5 | CD40 | NM_001250 |
| CD40 ligand | CD40LG | NM_000074 |
| CASP8 and FADD-like apoptosis regulator | CFLAR | NM_003879 |
| COMM domain containing 4 | COMMD4 | NM_017828 |
| Cathepsin B | CTSB | NM_001908 |
| Cathepsin S | CTSS | NM_004079 |
| Cylindromatosis (turban tumor syndrome) | CYLD | NM_015247 |
| Defensin, beta 1 | DEFB1 | NM_005218 |
| DENN/MADD domain containing 4A | DENND4A | NM_005848 |
| DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide | DFFA | NM_004401 |
| Dihydropyrimidinase-like 4 | DPYSL4 | NM_006426 |
| Eukaryotic translation initiation factor 5B | EIF5B | NM_015904 |
| Estrogen receptor 1 | ESR1 | NM_000125 |
| Fas (TNF receptor superfamily, member 6) | FAS | NM_000043 |
| Fas ligand (TNF superfamily, member 6) | FASLG | NM_000639 |
| Forkhead box I1 | FOXI1 | NM_012188 |
| Glucosidase, alpha; acid | GAA | NM_000152 |
| Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha | GADD45A | NM_001924 |
| UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 (GalNAc-T5) | GALNT5 | NM_014568 |
| Growth factor receptor-bound protein 2 | GRB2 | NM_002086 |
| HSPB (heat shock 27kDa) associated protein 1 | HSPBAP1 | NM_024610 |
| Huntingtin | HTT | NM_002111 |
| Interferon, gamma | IFNG | NM_000619 |
| Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) | IGF1 | NM_000618 |
| Insulin-like growth factor 1 receptor | IGF1R | NM_000875 |
| Insulin | INS | NM_000207 |
| Immunity-related GTPase family, M | IRGM | NM_001145805 |

| | | |
|--|-----------|--------------|
| Junctophilin 3 | JPH3 | NM_020655 |
| Kv channel interacting protein 1 | KCNIP1 | NM_014592 |
| Myelin associated glycoprotein | MAG | NM_002361 |
| Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha | MAP1LC3A | NM_181509 |
| Mitogen-activated protein kinase 8 | MAPK8 | NM_002750 |
| Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related) | MCL1 | NM_021960 |
| Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 | NFKB1 | NM_003998 |
| Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain) | NOL3 | NM_003946 |
| Olfactory receptor, family 10, subfamily J, member 3 | OR10J3 | NM_001004467 |
| Poly (ADP-ribose) polymerase 1 | PARP1 | NM_001618 |
| Poly (ADP-ribose) polymerase 2 | PARP2 | NM_005484 |
| Phosphoinositide-3-kinase, class 3 | PIK3C3 | NM_002647 |
| Poliovirus receptor | PVR | NM_006505 |
| RAB25, member RAS oncogene family | RAB25 | NM_020387 |
| Ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1 | RPS6KB1 | NM_003161 |
| S100 calcium binding protein A7A | S100A7A | NM_176823 |
| Synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor) | SNCA | NM_000345 |
| Spermatogenesis associated 2 | SPATA2 | NM_006038 |
| Sequestosome 1 | SQSTM1 | NM_003900 |
| Synaptonemal complex protein 2 | SYCP2 | NM_014258 |
| Transmembrane protein 57 | TMEM57 | NM_018202 |
| Tumor necrosis factor | TNF | NM_000594 |
| Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a | TNFRSF10A | NM_003844 |
| Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b | TNFRSF11B | NM_002546 |
| Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A | TNFRSF1A | NM_001065 |
| Tumor protein p53 | TP53 | NM_000546 |
| TNF receptor-associated factor 2 | TRAF2 | NM_021138 |
| Thioredoxin-like 4B | TXNL4B | NM_017853 |
| Unc-51-like kinase 1 (C. elegans) | ULK1 | NM_003565 |
| X-linked inhibitor of apoptosis | XIAP | NM_001167 |
| Actin, beta | ACTB | NM_001101 |
| Beta-2-microglobulin | B2M | NM_004048 |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | GAPDH | NM_002046 |
| Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 | HPRT1 | NM_000194 |
| Ribosomal protein, large, P0 | RPLP0 | NM_001002 |

Tabla 3.4. Relación de genes analizados en el kit *RT² ProfilerTM PCR Array Human Cell Death PathwayFinderTM*. En la tabla se muestran los 84 genes analizados en el array para RT-qPCR denominado *RT² ProfilerTM PCR Array Human Cell Death PathwayFinderTM* y que son genes clave en los mecanismos de

muerte celular apoptosis, autofagia y necrosis. En la tabla se indica la descripción de cada gen, su símbolo y su referencia (GenBank).

3.7. Otros materiales

El material fungible de cultivos celulares es de Falcon (pipetas serológicas, placas de cultivo de 10 cm de diámetro, placas de 6, 12 y 96 pocillos, rascadores, etc). Los reactivos químicos generales (NaCl, Glicina, EDTA, SDS, etc), así como los antibióticos, son de Sigma-Aldrich.

Para la extracción de proteínas de células en cultivo se utilizó el reactivo *PhoshoSafe™ Extraction Reagent* (Merck Millipore, #71296-3) y el cóctel de inhibidores de proteasas *Protease inhibitor cocktail, Complete EDTA-free* (Roche, #11873580001).

Para la extracción de RNA en los experimentos de RT-qPCR se utilizó *TRI Reagent®* (Sigma, #T9424), *UltraPure™ DEPC-Treated Water* (Invitrogen, #750024), oligo dT (Roche, #12011428), *First-Strand buffer* (Invitrogen) y *RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor* (Invitrogen, #10777-019).

En la elaboración de los geles para proteína se empleó acrilamida/bisacrilamida de Bio-Rad, así como TEMED (N,N,N,N-tetrametilendiamina) y PSA (persulfato amónico) de Sigma-Aldrich. En los análisis Western se utilizaron marcadores de referencia preteñidos para determinar el tamaño de las proteínas (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*, #SM1841, Fermentas; y *HiMark™ Pre-stained Protein Standard*, # LC5699, Fisher). Las membranas de PVDF empleadas para la transferencia fueron suministradas por Millipore (*Immobilon-P transfer membrane* para los análisis Western detectados por quimioluminiscencia, e *Immobilon-FL transfer membrane* para los análisis Western detectados por infrarrojos). Los reactivos para la reacción de quimioluminiscencia ECL fueron proporcionados por GE Healthcare, mientras que las películas empleadas para el revelado (X-OMAT™ LS, Kodak) así como las disoluciones de revelado y fijado, fueron suministradas por Sigma-Aldrich.

El yoduro de propidio y la RNasa A empleados en los análisis de citometría de flujo fueron proporcionados por Sigma-Aldrich y Roche, respectivamente.

Para las 2DE se utilizaron urea y ASB-14 de BioRad y Calbiochem, respectivamente, mientras que la tiourea y el HED fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Las columnas de desalado son de Pierce y todo el material necesario para el isoelectroenfoco (tiras de pH, IPG buffer y aceite mineral) fue suministrado por GE Healthcare. Los marcadores utilizados con

fosfoproteínas (*PeppermintStick*TM *Phosphoprotein Molecular Weight Standards*, #P27167) fueron suministrados por Invitrogen.

En las desfosforilaciones “in vitro” se utilizó la λ -fosfatasa de New England Biolabs y un cóctel de inhibidores de proteasas (PI mix) de Roche, mientras que para la eliminación de los diferentes tampones se empleó un Microcon YM-10 de Millipore.

La mayoría de los reactivos utilizados para la determinación proteica por espectrometría de masas (agua, acetonitrilo, bicarbonato amónico, metanol, ácido trifluoroacético, ácido fórmico, DTT, iodoacetamida, inhibidores de fosfatasa, etc.) fueron suministrados por Sigma- Aldrich. La cuantificación proteica de las muestras se realizó por BCA (Invitrogen) o Bradford (BioRad). Las tres proteasas utilizadas fueron: la tripsina de Promega, la endoproteinasa GluC de Roche y la LysC de Wako. Para la determinación proteica por MALDI-ToF, los péptidos fueron cocrystalizados con la matriz CHCA (ácido α -ciano-4-hidroxicianamínico) de Waters.

4. MÉTODOS

4.1. Condiciones de cultivo

La línea celular PC-3 fue mantenida en medio de cultivo DMEM/F-12 (1:1)+GlutaMAX (Gibco), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado (Lonza) y con un cóctel de antibióticos de penicilina (10.000 U/ml), estreptomycin (10 mg/ml) y gentamicina (50 mg/ml) (suministradas por Sigma-Aldrich). La inactivación de las proteínas del complemento presentes en el suero se realizó mediante tratamiento térmico a 56°C durante 1 hora.

La línea celular se creció de forma rutinaria en monocapa adherida al sustrato en placas de 10 cm de diámetro (Falcon) con 10 ml de medio de cultivo, cultivándose a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

Para realizar el subcultivo de la línea PC-3 las células se lavaron con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (Lonza) y se despegaron por la acción de tripsina/EDTA 1x [10x = tripsina 0,5% (p/v); EDTA 5,3 mM].

4.2. Ensayo de reducción de MTT

La viabilidad celular se midió mediante el ensayo colorimétrico basado en la reducción del aceptor electrónico MTT ó 3-(4,5-dimetil-2-tiazol-il] 2,5-difenil tetrazolio por la succinato deshidrogenasa mitocondrial activa en las células. Este ensayo permite cuantificar las células viables presentes en un cultivo celular. Tras la reducción del MTT (amarillo) se generan cristales de formazán (morado), que una vez disueltos se pueden cuantificar midiendo la absorbancia a 570 nm de longitud de onda. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas (Denizot & Lang, 1986). Los ensayos se realizaron según las instrucciones del proveedor.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos en un volumen final de 100 µl y a una densidad de 5x10⁴ células/ml. Cada experimento fue repetido al menos tres veces, analizando cada muestra por triplicado. Una vez realizados los tratamientos correspondientes con los distintos fármacos durante 72 horas, se añadió a cada pocillo 10 µL del reactivo MTT (*MTT Labeling Reagent*, Roche), incubándose las células durante 4 horas a 37°C y en una atmósfera con 5% de CO₂ en oscuridad. Tras este tiempo, se añadieron 100 µl de una solución de solubilización (*Solubilization Solution*, Roche) y se incubó toda la noche a 37°C y en oscuridad. Las muestras se midieron a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro Power Wave XS (BioTek).

4.3. Evaluación de los efectos combinados de los fármacos

Para evaluar los efectos combinados de la mitoxantrona con los inhibidores de la reparación del DNA los datos de los ensayos MTT fueron analizados de acuerdo con el método de Chou-Talalay (1981, 1984), utilizando los programas *CalcuSyn 2.1* (Biosoft, Cambridge, UK) y *CompuSyn* (EEUU). El programa realiza las curvas dosis-respuesta de cada fármaco por separado y las ajusta a las gráficas Chou-Talalay. Después, los fármacos fueron combinados en diferentes dosis de cada uno. Cada experimento fue repetido tres veces, analizando cada dosis por triplicado. La curva de la combinación fue ajustada a la gráfica Chou-Talalay y se aplicó la llamada “ecuación del efecto medio” para fármacos cuyos efectos son mutuamente no excluyentes, es decir, que actúan de forma independiente. Mediante esta ecuación se obtuvieron los índices de combinación (CIs), que nos indicaron si lo que se produce es antagonismo ($CI > 1,1$), aditividad (CI entre 0,9 y 1,1) o sinergismo ($CI < 0,9$).

4.4. Sincronización celular en fase S

Los experimentos de sincronización celular se llevaron a cabo mediante un doble bloqueo con timidina, compuesto que, en exceso, inhibe la síntesis de DNA y sincroniza el cultivo celular al comienzo de la fase S (Jackman & O'Connor, 2001). Para ello, las células fueron cultivadas en placas de 60 mm durante 24 horas. Tras este tiempo fueron crecidas en medio suplementado con timidina 2mM durante 16 horas (primer bloqueo). A continuación, se realizaron dos lavados con PBS para eliminar completamente el medio de bloqueo y las células se crecieron en medio fresco sin timidina durante 10 horas. Posteriormente, las células fueron bloqueadas de nuevo con medio suplementado con timidina 2 mM durante 16 horas, con el fin de obtener un cultivo celular sincronizado al comienzo de la fase S. Finalmente, las células se lavaron dos veces con PBS y se les añadió medio fresco sin timidina o suplementado con diferentes tratamientos según las condiciones del experimento. Las células fueron recogidas en los tiempos seleccionados y analizadas por citometría de flujo.

4.5. Análisis del ciclo celular

Una manera de analizar el ciclo celular es mediante la citometría de flujo, técnica que permite, entre otras muchas aplicaciones, cuantificar la muerte celular en una población concreta y/o establecer la distribución de esta población en las distintas fases del ciclo celular. Mediante los protocolos de Vindelov y de fijado y permeabilizado celular con etanol, basados en la tinción específica del DNA con un colorante fluorescente denominado yoduro de propidio

(IP), se consigue cuantificar la cantidad de DNA que contiene cada una de las células analizadas. Esto permite determinar la fracción de células hipodiploides, que contienen una menor cantidad de DNA debido a que han sufrido algún proceso de muerte celular, y el porcentaje de células presentes en las fases G₀/G₁, S y G₂/M del ciclo celular.

El equipo utilizado para medir la fluorescencia de las muestras es un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter). Para el análisis de los resultados se utilizó el programa *CXP software* (Beckman Coulter) y para la captura de las imágenes el programa *MWSnap*.

4.5.1. Protocolo de Vindelov

Mediante el protocolo de Vindelov (Vindelov & Christensen, 1994) las células son procesadas instantáneamente y se consigue el marcaje específico del DNA mediante una tinción fluorescente de yoduro de propidio. Las células crecidas en placas de seis pocillos se recogen por tripsinizado y se lavan con PBS. A continuación, las células se resuspenden e incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente en 300 µl de solución A [Tris-HCl 0,5 mM pH 7,6; Nonidet P-40 0,1% (v/v); citrato trisódico 3,4 mM; espermina 1,5 mM; tripsina 30 µg/ml]. Posteriormente se añaden 250 µL de solución B [Tris-HCl 0,5 mM pH 7,6; Nonidet P-40 0,1% (v/v); citrato trisódico 3,4 mM; espermina 1,5 mM; inhibidor de tripsina 500 µg/ml y RNAsa A 100 µg/ml] y se incuban durante otros 10 minutos a temperatura ambiente. Como último paso, se añaden 250 µl de solución C [Tris-HCl 0,5 mM pH 7,6; Nonidet P-40 0,1% (v/v); citrato trisódico 3,4 mM; espermina 4,83 mM y yoduro de propidio 416 µg/ml]. Las células procesadas se mantienen en oscuridad durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente antes de ser analizarlas en el citómetro de flujo.

4.5.2. Tinción con IP tras fijación y permeabilización con etanol

Este protocolo, también denominado protocolo de etanol, permite teñir el DNA con IP tras el fijado y permeabilizado de las células con etanol. Las células crecidas en placas de seis pocillos se recogen por tripsinizado y se lavan con 4 ml de PBS frío. Posteriormente se resuspenden por pipeteo en 500 µl de PBS frío y se añaden 3,5 ml de etanol al 70% enfriado a -20 °C, gota a gota y agitando suavemente en el vórtex, para dejarlas a continuación fijando y permeabilizando a -20 °C durante al menos 30 minutos (las células así procesadas son estables de 1 a 4 semanas). Posteriormente el sobrenadante es eliminado tras centrifugado a 4°C durante 5 minutos a 2.000 rpm. Las células se lavan nuevamente con PBS y se resuspenden finalmente en 500 µl de tampón de tinción [citrato de sodio 0,1% (p/v) pH 7,4; RNAsa A 10 mg/ml; yoduro de propidio 1 mg/ml; disueltos en PBS]. Finalmente, se incuban a temperatura

ambiente y en oscuridad durante al menos 15 minutos antes de ser analizadas en el citómetro de flujo.

4.6. Análisis western

4.6.1. Preparación de los extractos celulares

La extracción de proteínas del cultivo celular se llevó a cabo de dos formas distintas, según el tipo de experimento:

1) las células se recogieron de las placas de cultivo mediante rascado, se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 250 mM; Tritón X-100 1%; DTT 1 mM; ortovanadato sódico 1 mM; aprotinina 2 µg/ml; leupeptina 2 µg/ml; β-glicerofosfato 25 mM). Las células fueron lisadas durante 30 minutos en hielo y, posteriormente, se centrifugaron a 4°C a 13.000 rpm durante 15 minutos.

2) las células fueron recogidas por tripsinización y recogidos los pelets tras centrifugación a 2.000 rpm durante 5 minutos. A continuación se resuspendieron en tampón de extracción [*PhosphoSafe™ Extraction Reagent*, según las instrucciones del proveedor; *Protease inhibitor cocktail, Complete EDTA-free* 1x; aprotinina 2 µg/µl; leupeptina 2 µg/µl; EDTA 10 mM; DTT 1mM]. Las células fueron lisadas en hielo durante 30 minutos y, posteriormente, se centrifugaron a 4°C a 13.000 rpm durante 10 minutos.

La cantidad total de proteína se determinó mediante el ensayo BCA (*Pierce™ BCA Protein Assay Kit*). A cantidades equivalentes de proteína de cada una de las muestras a analizar (30-50 µg) se les añadió tampón de carga Laemmli 1x (Laemmli 4x: Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; Glicerol 10%; SDS 1%; azul de bromofenol 0,005%; β-mercaptoetanol 10%) y se hirvieron durante 5 minutos a 90°C.

4.6.2. Electroforesis y electrotransferencia

La electroforesis de muestras proteicas en geles de poliacrilamida mediante SDS-PAGE o electroforesis bidimensional (2DE) se llevó a cabo durante 2 horas a 90 V.

A continuación las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de PVDF (*Immobilon -P* o *-FL Transfer Membrane*) utilizando un sistema de transferencia húmeda (*Mini Trans-Blot Cell*, Bio-Rad). La transferencia se realizó durante 90 minutos a 100 V en tampón de transferencia [Tris base 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,1% (p/v); isopropanol 20% (v/v)]. La transferencia de 2DE se realizó con una refrigeración mayor (a 4 °C),

contrarrestando el calor generado durante el proceso debido a los geles con urea, y se realizó durante 2 horas a una intensidad constante de 150 mA.

4.6.3. Incubación con anticuerpos

Tras la electrotransferencia, las membranas se incubaron durante 1 hora en agitación en TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 150 mM) en el caso del análisis Western por infrarrojos o en TBS-T [TBS-Tween 20 0,1% (v/v)] en el caso del análisis Western por quimioluminiscencia, con leche desnatada en polvo o BSA al 5% (p/v). Seguidamente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en TBS-T, con leche desnatada en polvo o BSA al 5% (p/v) (según las instrucciones del proveedor), durante toda la noche a 4 °C y en agitación. Posteriormente, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con TBS-T y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario. Tanto los anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa como los marcados con fluoróforo (anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón) se diluyeron en TBS-T suplementado con leche en polvo al 5% (p/v). En ambos casos, las membranas se incubaron en agitación durante 1 hora (en oscuridad en el caso de los anticuerpos secundarios marcados con fluoróforo). Tras 3 lavados iguales a los anteriores más un lavado adicional de 15 minutos se procedió al revelado o escaneado del análisis Western.

4.6.4. Escaneado por infrarrojos

Las membranas incubadas con los anticuerpos secundarios marcados con fluoróforo se escanearon mediante el sistema *Odyssey® Infrared Imaging System* de detección de infrarrojos. La señal emitida por los anticuerpos secundarios (con longitudes de onda de emisión de 680 ó 800 nm) es captada por el detector y transmitida al software, que permite la captación simultánea de la señal de ambos anticuerpos (rojo o verde para las emisiones de 680 y 800 nm, respectivamente).

4.6.5. Revelado por quimioluminiscencia

Para revelar el análisis Western mediante quimioluminiscencia se utilizó el sistema ECL de GE Healthcare, basado en la oxidación enzimática del luminol por la peroxidasa conjugada con el anticuerpo. Para ello, las membranas se bañaron durante 1 minuto en una mezcla que contiene luminol y se expusieron a una película fotográfica X-OMAT™ LS durante el tiempo necesario, realizando posteriormente el revelado y fijado de las mismas con las soluciones *Kodak fixer and developer*.

4.7. Electroforesis bidimensional

Para la realización de la electroforesis bidimensional (2DE) las células se sembraron en placas de 60 mm y, tras los tratamientos correspondientes, se lisaron sobre las placas con 600 μ L de tampón UTATH [urea 7 M; tiourea 2 M; ASB-14 1% (p/v); HED 50 mM]. Los extractos obtenidos se sonicaron durante 1 hora en un sonicador de baño. Este tampón es incompatible con los ensayos de medida de proteína, por lo que para cargar la misma cantidad de proteína en cada muestra se realizó un gel de carga con distintas cantidades de cada una, para luego igualar las concentraciones de los extractos. Tras añadir 0,5% (v/v) de tampón de isoelectroenfoco, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. A continuación se pasaron 125 μ l de muestra por columnas de desalado (*Protein desalting Spin Columns*) previamente equilibradas con tampón UTATH suplementado con 0,5 % de tampón de anfolitos, para posteriormente ser depositados en un contenedor para tiras de 7 cm. Las proteínas se enfocaron en tiras con un rango de pH de 3 a 11 no lineal, utilizando un equipo Ettan IPGphor II (Amersham). En esta primera dimensión las condiciones para el enfoque fueron: 12 h a 30 V, 250 Vh a 500 V, 500 Vh a 1000 V y 8000 Vh a 5000 V (Vh = voltios-hora, siendo éstos la integral de los voltios aplicados a lo largo del tiempo). Una vez finalizado el isoelectroenfoco, las tiras se lavaron y se equilibraron dos veces durante 30 minutos en un tampón de equilibrio [urea 6 M; glicerol 30 % (v/v); Tris 50 mM pH 6,8; SDS 2 %; azul de bromofenol 0,002 % (p/v)]. La separación de las proteínas en la segunda dimensión se realizó mediante un gel de SDS-PAGE al 8 ó 10 % suplementado con HED 50 mM y urea 6 M. Los geles obtenidos fueron teñidos utilizando azul de Coomassie R250 y/o los colorantes fluorescentes SYPRO[®] Ruby y Pro-Q[®] Diamond Phosphoprotein (Invitrogen), siguiendo en cada caso las instrucciones del fabricante. Los geles fueron escaneados en un escáner de fluorescencia Typhoon TRIO (GE Healthcare).

4.8. Espectrometría de masas MALDI-ToF

Las manchas procedentes de geles de electroforesis bidimensional a analizar por espectrometría de masas se recortaron del gel y se trocearon en fragmentos de aproximadamente 1 mm³. Se destiñeron incubándose dos veces durante 30 minutos en bicarbonato amónico 25 mM/acetronitrilo (70/30 v/v) suplementado con HED 50 mM, y a continuación se secaron los trozos de gel a 90°C durante 15 minutos. Una vez secos se les añadió tripsina (12 ng/ μ l en bicarbonato amónico 25 mM) y se dejó digiriendo durante 1 hora a 60°C. Tras la digestión las muestras se acidificaron añadiendo un volumen adecuado de TFA 1

% para dejar el pH ≤ 2 . Las muestras fueron sonicadas durante 10 minutos y, finalmente, se realizó la purificación de los péptidos resultantes mediante cromatografía de fase reversa con una resina de C-18, utilizando puntas ZipTip® (Millipore). Para ello, el C-18 se humedeció con acetonitrilo y se equilibró con TFA 0,1 %. A continuación los péptidos se fijaron a la resina y se lavaron 10 veces con TFA 0,1 %. Finalmente se eluyeron con 3 μ l de matriz (CHCA 10 mg/ml; TFA 0,1 %; acetonitrilo 50 %) sobre una placa de 96 x 2 pocillos (Applied Biosystems).

Las muestras se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-ToF (Voyager-DE STR, Applied Biosystems). Los datos de 200 disparos de láser se utilizaron para generar un espectro de masas para determinar las huellas peptídicas de las muestras mediante el programa *Data Explorer* (Applied Biosystems). Las masas obtenidas se compararon con las teóricas recogidas en la base de datos *Swiss-Prot* mediante el programa *Aldente* (www.expasy.org).

4.9. Desfosforilación “in vitro”

Para llevar a cabo la desfosforilación de las proteínas las células se lisaron sobre las placas de 60 mm con 600 μ L de tampón UTATH y los extractos obtenidos se sonicaron durante 1 hora. A continuación, se eliminó el UTATH con un Microcon YM-10 y se recuperaron las proteínas en 400 μ l de agua. Tras cuantificar la cantidad de proteína en la muestra por Bradford, se incubaron 350 μ g de muestra en presencia o ausencia de 5 U/ μ g de λ -fosfatasa durante 1 hora a 30 °C, en una solución que contenía tampón fosfato 1x (*Phosphatase Buffer*; New England BioLabs), un cóctel de inhibidores de proteasas 1x (*PI mix*; Roche), MgCl₂ 1x (New England BioLabs) y agua hasta 200 μ L. Finalmente, se sustituyó ese tampón por tampón UTATH con un Microcon YM-10 y se separaron las proteínas mediante 2DE.

4.10. Ensayo del cometa en condiciones alcalinas

El ensayo del cometa es un ensayo de electroforesis que permite la visualización directa del daño en el DNA en células individualizadas (Ostling & Johanson, 1984). Este ensayo se utiliza para la detección de roturas de DNA de cadena sencilla y doble, provocadas tanto por agentes exógenos como endógenos (véase apartado 1.3. de “Introducción”). El principio de este ensayo se basa en la capacidad de los fragmentos de DNA desnaturalizados y rotos de migrar fuera del núcleo bajo la influencia de un campo eléctrico, mientras que el DNA intacto migra más lento y se mantiene dentro de los límites del núcleo. Estas migraciones se producen bajo una forma característica similar a la “cola” de un cometa y su evaluación

permite determinar el nivel de generación de roturas del DNA. La electroforesis alcalina de células individuales es la versión más habitual a la hora de realizar este ensayo.

Para realizar el ensayo del cometa en condiciones alcalinas (Figura 4.1), las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en PBS frío e inmovilizadas sobre portaobjetos con agarosa (*CometAssay® Kit*). Tras una lisis celular durante 30 minutos a 4°C en tampón de lisis (*Lysis solution*, Trevigen), las muestras fueron tratadas con una solución alcalina (NaOH 200 mM; EDTA 1 mM, pH>13) durante 30 minutos a temperatura ambiente, con el fin de desnaturalizar el DNA e hidrolizar los sitios de daño. Los portaobjetos fueron colocados en oscuridad durante todo el proceso para evitar daños espontáneos en el DNA. A continuación las muestras fueron colocadas en un tanque de electroforesis y sometidas a una corriente de 18 V y 300mA durante 40 minutos en oscuridad, en tampón de electroforesis (NaOH 300 mM; EDTA 1 mM, pH>13) enfriado previamente a 4°C. Tras eliminar el exceso de tampón, los portaobjetos fueron lavados dos veces en agua, inmersos durante 5 minutos en etanol al 70% y dejados secar en oscuridad y a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Pasadas varias horas, las muestras fueron teñidas con el colorante intercalante de DNA fluorescente *SYBR® Green I* (Trevigen) durante 1 hora a 4°C, y se dejaron secar a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente la fluorescencia fue visualizada en un microscopio de fluorescencia Olympus BX61 y una cámara DP70, mediante los programas *DP manager* y *DP controler* (Olympus).

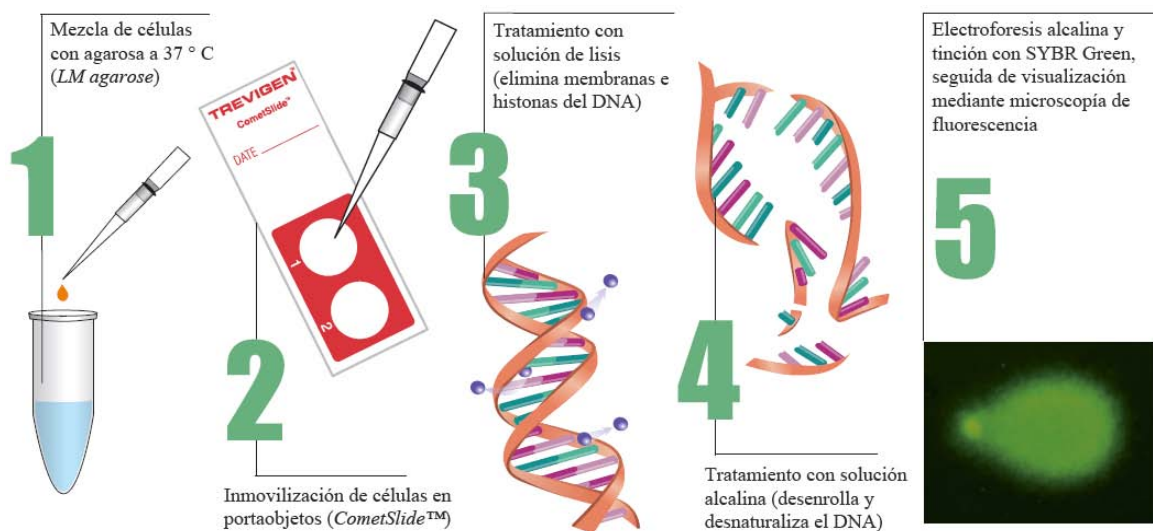


Figura 4.1. Ensayo del cometa en condiciones alcalinas. www.trevigen.com.

4.10.1. Análisis de las imágenes

El análisis de las imágenes se llevó a cabo mediante el programa *Komet 5.0* (Kinetic, Inglaterra), cuantificando 100 células por tratamiento en cada experimento y realizando al menos un duplicado de los mismos. Tras analizar las fotografías una a una, se obtuvieron los valores de diferentes parámetros. Dentro de éstos, y según Olive y colaboradores, destacan el *momento de la cola* y el *porcentaje de DNA en la cola* (Olive & Banath, 2006; Olive et al, 1990). El *momento de la cola* es el producto entre la longitud de la cola y el porcentaje de DNA en la cola. Por otro lado, el *porcentaje de DNA en la cola* es una medida normalizada del porcentaje total de DNA encontrado en la cola. En el análisis de nuestros resultados utilizamos el *momento de la cola*, por ser uno de los parámetros más representativos hasta ahora del daño inducido (Lee et al, 2004; Olive, 1999). No obstante, en los últimos años se está utilizando el *porcentaje de DNA en la cola* como medida del daño en el DNA, por no estar relativamente afectado por los valores de configuración del programa de análisis de imágenes y por permitir una discriminación del daño en el rango más amplio posible (de 0 a 100% del DNA en la cola) (Collins, 2004).

El *momento de la cola* se define como: $Olive\ Tail\ Moment = (Tail\ mean - Head\ mean) * Tail\ \% DNA / 100$.

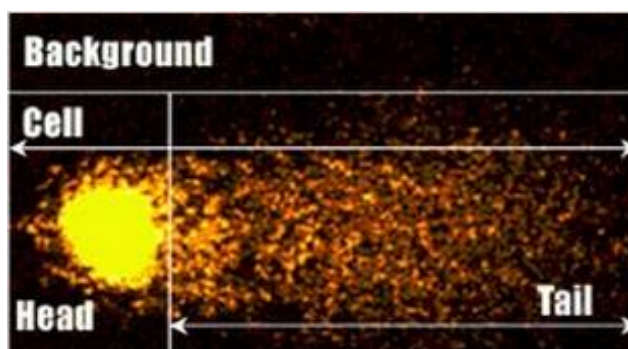


Figura 4.2. Imagen de análisis del cometa. Imagen representativa de análisis del cometa en la que se muestra el análisis de una célula diferenciando entre cabeza del cometa (núcleo celular), cola del cometa y fondo. *Cell*: célula; *head*: cabeza; *tail*: cola; *background*: fondo.

4.11. Determinación de apoptosis: ensayo de adhesión de la Anexina V

La apoptosis se caracteriza por ciertas características morfológicas, entre ellas la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, siendo éste uno de los sucesos acaecidos durante los estadios iniciales del proceso apoptótico. En las células apoptóticas, el fosfolípido

de membrana fosfatidilserina es translocado de la parte interna de la membrana plasmática a la parte externa. La anexina V es una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina, uniéndose a las células que la exponen en su superficie (Pigault et al, 1994). De esta manera, la anexina V sirve de indicador de apoptosis en combinación con otros marcadores, como el yoduro de propidio (IP). El IP es un compuesto fluorescente de alta afinidad por el DNA que, al no ser permeable, únicamente interacciona con el DNA cuando las membranas celulares se encuentran fragmentadas. De esta manera, en combinación con la anexina V, sirve como indicador de los procesos de apoptosis tardía. El marcaje celular único con IP actúa como indicador de un proceso de necrosis celular y el marcaje celular único con anexina V actúa como indicador de procesos de apoptosis temprana.

El protocolo se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del kit *Annexin V-FITC Apoptosis Detection*. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a la densidad apropiada. Tras realizar los tratamientos pertinentes, se recogieron y se centrifugaron durante 5 minutos a 1.200 rpm a 4°C. Una vez retirado el sobrenadante se lavaron dos veces con PBS. A continuación se resuspendieron en 500 µl de tampón de unión (*annexin V binding buffer* 1x, Sigma-Aldrich) a una densidad aproximada de 10^6 células /ml, a los que se añadieron 5 µl de anexina V (conjugada con el fluorocromo FITC) y 2,5 µl de IP. Las células se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras este tiempo las muestras se midieron en un citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman Coulter), siendo recogida la señal de fluorescencia emitida por el IP y por el FITC. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa *CXP software* (Beckman Coulter).

4.12. Ensayo de la actividad de caspasas 3 y 7

Para la determinación de la actividad de las caspasas 3 y 7 se utilizó el kit luminométrico *Caspase-Glo® 3/7 Assay*. El ensayo se basa en la hidrólisis de un sustrato luminogénico que contiene la secuencia DEVD por las caspasas 3 y 7, liberándose un sustrato de luciferasa y resultando en la generación de una señal luminiscente. La luminiscencia es proporcional a la cantidad de actividad de caspasas presente.

Para la realización de este ensayo las células se sembraron en placas de 96 pocillos blancas a una densidad de 5×10^4 células/ml. Cada experimento fue repetido al menos tres veces, analizando cada muestra por triplicado. Tras el tratamiento de las células con los fármacos y tiempos correspondientes en un volumen final de 100 µl, se extrajeron 50 µl de cada pocillo y se añadieron 50 µl del reactivo de caspasas (*Caspase-Glo® 3/7 Reagent*,

Promega). Las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y las muestras se midieron en un luminómetro Synergy™ HT (BioTek). El análisis de los resultados se realizó mediante el programa *Gen5 2.0* (BioTek).

4.13. Determinación de apoptosis: marcaje mitocondrial

El sustrato de caspasa 3 *NucView 488* y el colorante mitocondrial *MitoView 633* permiten detectar el perfil de células apoptóticas en base a la actividad de las caspasas 3/7 y a los cambios en el potencial de membrana mitocondrial, respectivamente. El *NucView 488* consiste en un colorante fluorogénico de DNA y un sustrato de caspasa 3. El sustrato (no fluorescente) cruza rápidamente las membranas celulares para entrar en el citoplasma de la célula, donde es cortado por caspasas 3/7 para formar un colorante de alta afinidad por el DNA. El colorante de DNA liberado migra al núcleo de la célula para teñirlo de verde brillante. Por tanto, *NucView 488* es bifuncional, siendo capaz de detectar tanto actividad intracelular de caspasas 3/7 como de teñir el núcleo de las células. El marcaje con este compuesto es un indicador de procesos de apoptosis.

MitoView 633 es un colorante fluorescente mitocondrial fotorreceptor de luz roja lejana. Este reactivo difunde a través de la membrana plasmática y se acumula en las mitocondrias. Las mitocondrias teñidas con este compuesto se vuelven fluorescentes brillantes tras la acumulación del colorante y su tinción depende del potencial de membrana mitocondrial. Por tanto, las células apoptóticas presentarán una tinción de *MitoView 633* mucho menor que las células sanas.

El protocolo se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del kit *NucView™ 488 and MitoView™ 633 Apoptosis Assay*. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a la densidad apropiada. Tras realizar los tratamientos correspondientes, se recogieron y se centrifugaron durante 5 minutos a 1.200 rpm a 4°C. Una vez retirado el sobrenadante, se resuspendieron en 200 µl de medio junto con 1 µl de *NucView 488* y 1 µl de *MitoView 633*. Las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se centrifugaron durante 5 minutos a 1.200 rpm a 4°C y se resuspendieron en 500 µl de PBS. Finalmente las muestras se filtraron para eliminar agregados y se midieron en un separador-analizador celular MoFlo XDP (Beckman Coulter). Para el análisis de los datos se utilizaron los programas *Summit 5.2* y *MoFlo XDP* (Beckman Coulter).

4.14. Microscopía y *time-lapse*

Para llevar a cabo el análisis morfológico las células PC-3 se sembraron en placas de 35 mm a la densidad adecuada. Tras realizarse los tratamientos adecuados a cada experimento, las células fueron fotografiadas en un microscopio de fluorescencia Axiovert 200M (Zeiss), con el que se adquirieron las imágenes a los tiempos correspondientes mediante el programa *AxioVision 4.7* (Zeiss).

La técnica de *time-lapse* o de microscopía “in vivo” es una técnica fotográfica que permite capturar fotografías a determinados intervalos de tiempo para unirlos en postproducción a una velocidad específica, logrando un efecto de movimiento. En nuestro caso, se realizaron fotografías a un cultivo celular vivo en tiempos determinados, para observar la respuesta celular a distintos tratamientos en ese periodo. Para ello, las células PC-3 se crecieron en placas de 35 mm a la densidad adecuada, se trataron con los correspondientes fármacos y se colocaron en una cámara con atmósfera saturada de H₂O y con niveles de CO₂ (5%) y temperatura (37 °C) controlados. La cámara de cultivo se acopla al microscopio de fluorescencia Axiovert 200M (Zeiss), con el que se tomaron imágenes cada 4 minutos para montar un vídeo de 5 fps (*frames per second*), es decir, 5 de las imágenes mostradas cada segundo. Las imágenes se obtuvieron mediante el programa *AxioVision 4.7* (Zeiss).

4.15. Estudios de expresión génica

4.15.1. Extracción de RNA y transcripción reversa

Para el desarrollo de este ensayo las células fueron sembradas en placas de 60 mm a la concentración y el volumen adecuados en cada caso. Tras realizar los tratamientos pertinentes, la extracción del RNA se llevó a cabo con el reactivo *TRI-Reagent*, siguiendo las especificaciones de la casa comercial. A continuación, para eliminar los restos del DNA genómico, las muestras fueron tratadas con la DNasa *RNase-Free DNase* según las instrucciones del proveedor. La limpieza del RNA se llevó a cabo según el método de extracción de fenol:cloroformo y precipitación con isopropanol (*recovery of the RNA*, manual de Ambion #AM1340). La concentración del RNA se determinó midiendo su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf BioPhotometer). La relación A₂₆₀/A₂₈₀, que indica la pureza del RNA, fue siempre de un valor $\geq 1,7$.

Para la realización de la transcripción reversa (RT) se utilizó el enzima M-MLV Transcriptasa Reversa. En un volumen total de 20 μ l se mezclaron 2 μ g de RNA, 1 μ l de oligo

dT y 1 μ l de dNTPs 10 mM, se incubaron durante 5 minutos a 65 °C y posteriormente en hielo durante 3 minutos. A continuación se añadieron 4 μ l de tampón *First-Strand buffer*, 2 μ l de DTT 0,1 M y 1 μ l de *RNaseOUT Inhibitor*. La mezcla se incubó durante 2 minutos a 37 °C, se añadió 1 μ l de la transcriptasa reversa y se incubó durante 50 minutos a 37 °C. Finalmente, se inactivó el enzima a 70°C durante 15 minutos.

4.15.2. PCR en tiempo real

Para el análisis cuantitativo de la expresión de los niveles de RNA de los oligonucleótidos correspondientes se utilizó el método de la PCR en tiempo real (qPCR) con el reactivo *Power SYBR® Green PCR Master Mix*, en un sistema ABI Prism 7300 (Applied Biosystems). Para realizar la PCR cuantitativa se preparó la siguiente mezcla de reacción en un volumen total de 10 μ l por pocillo: 5 μ l de SYBR Green, 0,5 μ l de la mezcla de oligonucleótidos sentido y antisentido (10 μ M) y 4,5 μ l de cDNA (diluído 1:5). Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes:

| Ciclos | Duración | Temperatura |
|--------|----------|-------------|
| 1 | 2 min | 50°C |
| 1 | 10 min | 95°C |
| 40 | 15 s | 95°C |
| | 1 min | 60°C |

Tabla 4.1. Condiciones de la reacción de PCR en tiempo real.

A estas condiciones se añadió un paso adicional que es la curva de disociación, que indica la correcta y específica amplificación del producto, así como su homogeneidad. Cada muestra se analizó por triplicado y la expresión relativa de los genes fue calculada utilizando el método $2^{-\Delta CT}$. Para calcular el incremento en los niveles de RNAm, el cambio en el ciclo umbral (CT) de cada gen fue calculado restando a su ciclo umbral el ciclo umbral de la ACTB que actúa como control interno. El ΔCT de las réplicas fue calculado haciendo un promedio de los valores CT de cada una de ellas. Los cambios en la expresión génica fueron definidos de una manera biológicamente significativa. Así, los valores de cambio de expresión mayores que 1 indican regulación positiva, y se expresaron como x veces de incremento ($2^{-\Delta CT}$) relativizadas al grupo control. Por el contrario, los valores de cambio de expresión menores de 1 indican regulación negativa, y se expresaron como el inverso negativo de $2^{-\Delta CT}$ relativizadas al grupo control. En nuestros resultados se eligieron aquellos cambios de expresión con respecto al

control $>1,95$ para indicar una regulación positiva del gen, mientras que se eligieron cambios de expresión $<-1,95$ para indicar una regulación negativa.

4.15.3. RT-qPCR Array

La RT-PCR en tiempo real es un método altamente sensible y fiable para el análisis de la expresión génica. Sin embargo, los RT-qPCR Arrays combinan el rendimiento de la RT-PCR en tiempo real y la capacidad de los microarrays de detectar la expresión simultánea de una amplia gama de transcritos, permitiendo estudiar la expresión de muchos genes simultáneamente. Estos arrays están diseñados principalmente para analizar paneles de genes relacionados con enfermedades o implicados en determinadas rutas bioquímicas.

En nuestro caso, se utilizó el kit denominado *RT² Profiler™ PCR Array Human Cell Death PathwayFinder*, que nos permitió analizar el RNAm de 84 genes importantes implicados en los mecanismos de muerte celular apoptosis, autofagia y necrosis (mostrados en la

Tabla 3.4 en Materiales). Además, el array contiene oligonucleótidos para el análisis de 5 genes cuya expresión no se ve modificada, utilizados para la normalización de los datos (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 y RPLP0).

Los arrays se llevaron a cabo a partir de los cDNAs obtenidos por transcripción reversa del RNAm extraído de las células según el método explicado en el apartado 4.13.1. Una vez obtenido el cDNA, se añadieron 91 μ l de agua libre de RNasas a cada muestra. Para realizar la PCR cuantitativa se preparó la siguiente mezcla de reacción por cada placa de array de 96 pocillos utilizada: 1350 μ l de *Power SYBR® Green PCR Master Mix*, 102 μ l de cDNA y 1248 μ l de agua libre de RNasas, en un volumen total de 2700 μ l. Se pipetearon 25 μ L de mezcla de reacción por pocillo, y la placa se selló herméticamente con tiras ópticas individuales (de 8 pocillos cada una). Las placas fueron centrifugadas durante 1 minuto a 1000 g a temperatura ambiente, y colocadas en hielo hasta el momento de realizar la PCR cuantitativa. Ésta se realizó en un sistema ABI Prism 7300 (Applied Biosystems) según las instrucciones del proveedor y en las siguientes condiciones:

| Ciclos | Duración | Temperatura |
|--------|----------|-------------|
| 1 | 10 min | 95°C |
| 40 | 15 s | 95°C |
| | 1 min | 60°C |

Tabla 4.2. Condiciones de la reacción de PCR en tiempo real para los RT-qPCR arrays.

A estas condiciones se añadió el paso adicional de la curva de disociación. La expresión relativa de los genes fue calculada utilizando el método $2^{-\Delta CT}$, y los cambios en los niveles de expresión de RNAm se expresaron como se indica en el apartado anterior (4.15.2.). Un esquema de la técnica se observa en la Figura 4.3, y una representación de la placa de array de 96 pocillos, en la Figura 4.4.

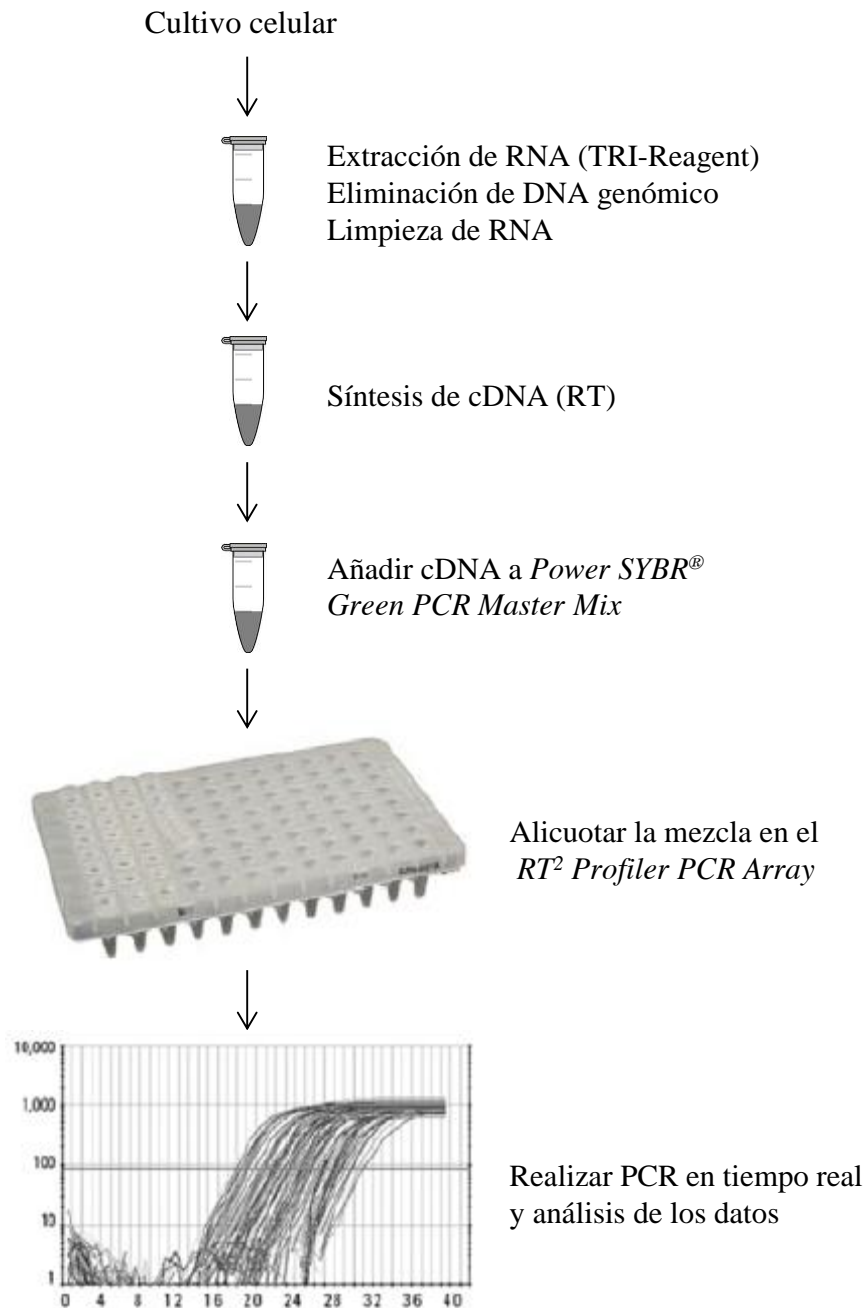


Figura 4.3. Esquema del procedimiento del RT-qPCR Array.

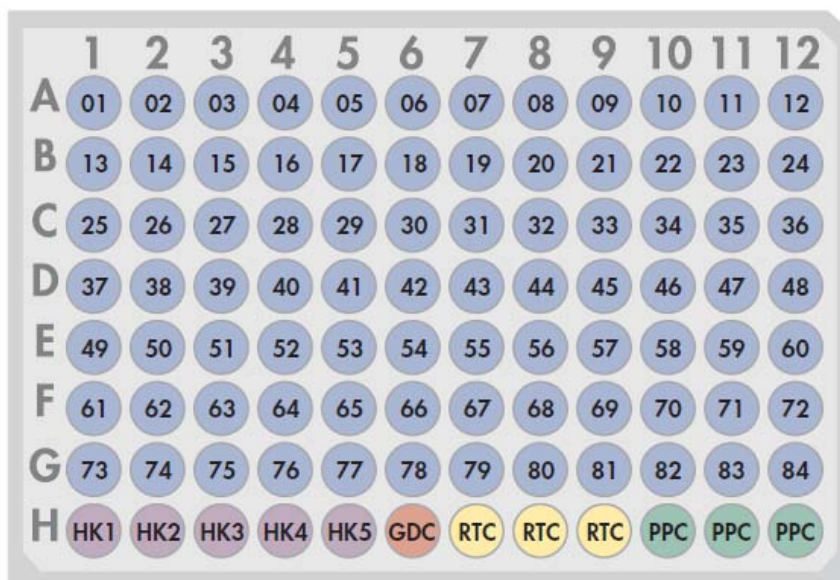


Figura 4.4. Placa de array de 96 pocillos del kit utilizado *RT² ProfilerTM PCR Array Human Cell Death PathwayFinderTM*. Los números del 01 al 84 señalan los pocillos con los oligonucleótidos liofilizados para los 84 genes de interés; HK1-HK5: genes para la normalización de los datos (*housekeeping genes*); GDC: control de DNA genómico (*genomic DNA control*); RTC: control de transcripción reversa (*reverse transcription control*); PPC: control positivo de PCR (*positive PCR control*).

4.16. Análisis estadístico

Los datos se presentaron como la media \pm S.E.M. (error estándar de la media). Las posibles diferencias entre ellos se estimaron mediante el test paramétrico t de Student (de datos desapareados y dos colas).

Los datos de los ensayos de reducción de MTT fueron analizados mediante un análisis de la varianza de una vía (ANOVA), seguido de un test de Student-Newman-Keuls. Los datos de los ensayos del cometa, debido a que el parámetro *momento de cola Olive* no sigue una distribución normal, fueron analizados mediante una prueba U de Mann-Whitney para cada una de las réplicas realizadas. A continuación se realizaron pruebas t de Student de datos pareados con las medias de los valores promedio de las réplicas.

En todos los casos se consideraron estadísticamente significativas las diferencias cuando el p valor fue $<0,05$. El análisis estadístico se llevó a cabo empleando los programas *GraphPad Prism* (GraphPad software) y *SigmaStat 3.1* (Systat Software).

5. RESULTADOS

5.1. Efecto de los inhibidores de topoisomerasa II: mitoxantrona y doxorubicina

La mitoxantrona y la doxorubicina son agentes quimioterapéuticos inhibidores de la topoisomerasa II (TOP2), de tipo no catalítico. Estos compuestos son agentes intercalantes del DNA que provocan su compactación y la inducción de roturas mediante la generación de complejos covalentes DNA-TOP2. En algunos casos, además, se pueden generar radicales libres. Los complejos DNA-TOP2 formados inhiben la correcta actividad de la TOP2, alterando los procesos de reparación del DNA y generando roturas de cadena sencilla y de doble cadena.

La mitoxantrona se intercala en el DNA, inhibiendo la síntesis del mismo y provocando un bloqueo del ciclo celular en la fase S tardía (Faulds et al, 1991). La doxorubicina, actuando de manera similar, produce un bloqueo del ciclo en la fase G₂/M (Shaheen et al, 2011). Ambos fármacos provocan roturas en el DNA y la consiguiente muerte de las células, aunque los mecanismos moleculares implicados continúan siendo desconocidos.

Con el objetivo de evaluar la acción de la mitoxantrona y la doxorubicina en la línea celular tumoral de próstata PC-3, realizamos una serie de ensayos para determinar tanto la viabilidad celular como los efectos sobre el ciclo celular, así como el estudio de roturas en el DNA tras el tratamiento con concentraciones crecientes de ambos fármacos.

5.1.1. La mitoxantrona y la doxorubicina inducen una citotoxicidad dependiente de la concentración

Los estudios de viabilidad celular se llevaron a cabo mediante el ensayo de reducción del MTT. Para ello, las células PC-3 se incubaron durante 72 horas con concentraciones crecientes de mitoxantrona (0,003-5 μ M) ó doxorubicina (0,003-5 μ M). Tras la lectura de las placas de cultivo en el espectrofotómetro, se determinó el porcentaje de células viables a las distintas concentraciones ensayadas. Como se puede observar en la Figura 5.1, la mitoxantrona y la doxorubicina producen una disminución en el número de células metabólicamente activas que es dependiente de la concentración. La incubación con mitoxantrona durante 72 horas (A) redujo el número de células a un 20 y 13% a las concentraciones de 3 y 5 μ M, respectivamente. La reducción del número de células se hizo significativa con respecto al control a partir de una concentración de 0,01 μ M, con valores de $p < 0,05$ y 0,001. Por otra parte, el tratamiento con doxorubicina durante el mismo tiempo de incubación (B) redujo el número de células a un 18

y 17% a las concentraciones de 3 y 5 μM , respectivamente. La reducción del número de células se hizo significativa con respecto al control a partir de una concentración de 0,003 μM , con valores de $p < 0,05$ y 0,001.

A partir de los porcentajes de células viables obtenidos a las distintas concentraciones ensayadas se calcularon, mediante el programa *CompuSyn*, los valores de EC50 (concentración a la que se obtiene el 50% del efecto) para cada fármaco. Como se puede observar en la Tabla 5.1, el EC50 para la mitoxantrona es de 0,36 \pm 0,04 μM , y para la doxorubicina es de 0,14 \pm 0,03 μM .

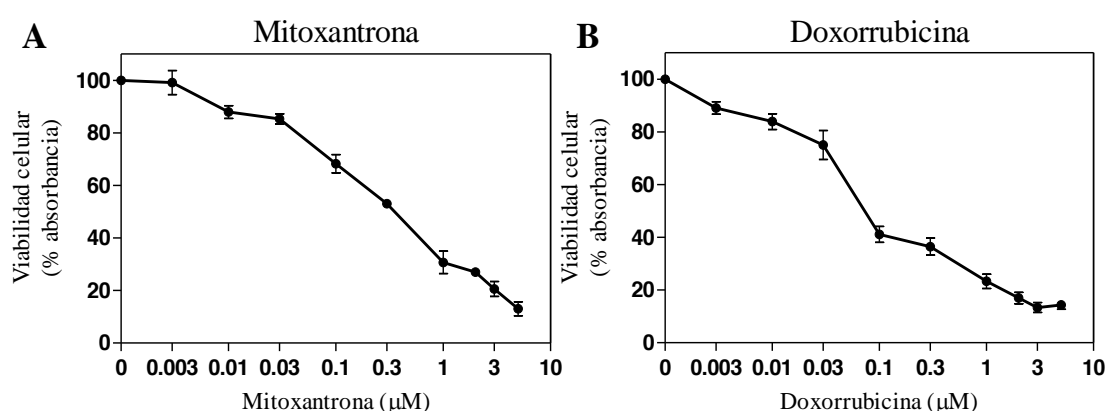


Figura 5.1. La mitoxantrona y la doxorubicina presentan una citotoxicidad que es dependiente de la concentración. Curvas dosis-respuesta de células PC-3 tratadas con concentraciones crecientes de: A) mitoxantrona (0,003-5 μM) ó B) doxorubicina (0,003-5 μM) durante 72 horas, obtenidas mediante el ensayo de reducción del MTT. En las gráficas se representa el porcentaje de células viables o metabólicamente activas, medido como tanto por cierto de absorbancia con respecto a las células control.

| Fármacos | EC50 - Citotoxicidad (μM) |
|--------------|--|
| Mitoxantrona | 0,36 \pm 0,04 |
| Doxorubicina | 0,14 \pm 0,03 |

Tabla 5.1. Valores de EC50 para la mitoxantrona y la doxorubicina, determinados tras el ensayo de reducción del MTT. Valores de EC50 para la mitoxantrona y la doxorubicina determinados a partir de los porcentajes de células viables obtenidos en los ensayos de reducción del MTT, mediante el programa *CompuSyn*. En la tabla se representan los valores de EC50 obtenidos \pm el error estándar de la media.

5.1.2. La mitoxantrona y la doxorubicina alteran la progresión del ciclo celular

A continuación se determinó si el efecto citotóxico producido por la mitoxantrona y la doxorubicina estaba acompañado de alteraciones durante el ciclo celular de las células tratadas. Los estudios se llevaron a cabo con cultivos asincrónicos y cultivos sincronizados.

5.1.2.1. La mitoxantrona bloquea el ciclo celular en fase S

Las células PC-3 se trataron con mitoxantrona 0,5, 1 y 2 μM durante 24 horas y, tras ser procesadas según el protocolo de Vindelov, fueron analizadas por citometría de flujo (Figura 5.2). Los resultados muestran que la mitoxantrona (0,5 y 1 μM) incrementa el porcentaje de células en fase S del 19,93% al 61,74% y 53,39%, respectivamente. Por el contrario, el porcentaje de células en fase G₀/G₁ y G₂/M disminuye considerablemente. Concentraciones mayores de mitoxantrona (2 μM) incrementan tanto el porcentaje de células en fase S (32,85%) como el porcentaje de células en fase G₀/G₁ (43,01%).

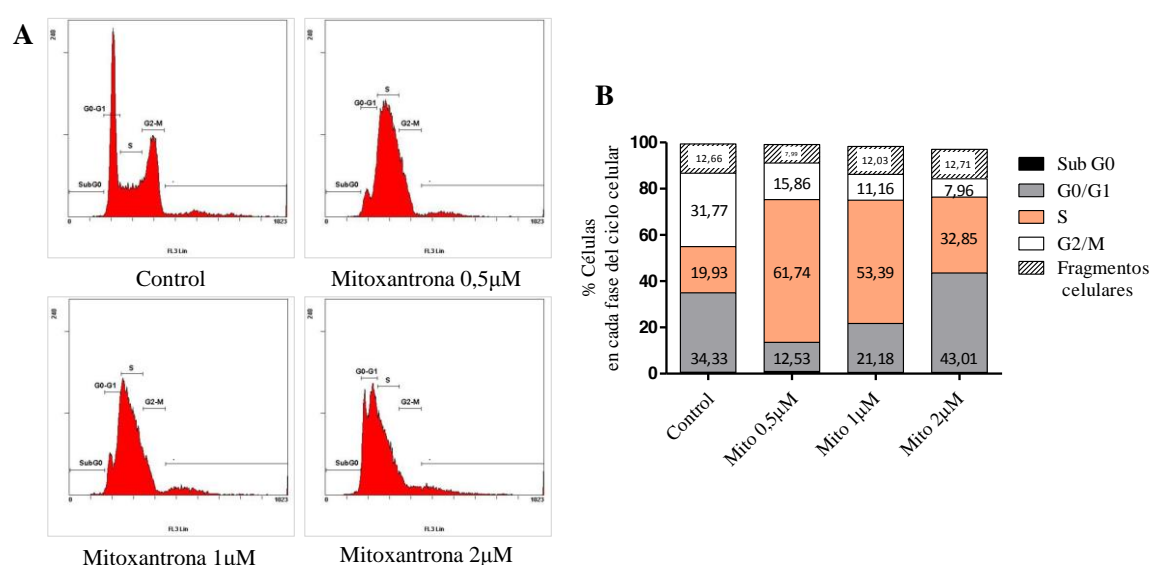


Figura 5.2. Efecto de la mitoxantrona en el ciclo celular de células PC-3. A) Histogramas de células PC-3 control o tratadas con mitoxantrona 0,5, 1 ó 2 μM durante 24 horas, obtenidos tras procesamiento según el protocolo de Vindelov y análisis por citometría de flujo. En los histogramas se representan las fases del ciclo celular: Sub G₀ (células hipodiploides), G₀/G₁, S ó G₂/M. B) Cuantificación de los histogramas, en la que se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

Para corroborar los resultados observados anteriormente se realizó un análisis Western de los extractos celulares en los que se determinó la presencia de ciclina B1, como marcador de fase G₂/M, e histona H3 fosforilada en Ser10, como marcador de mitosis. Se utilizó el tratamiento con vincristina 0,1 μM y paclitaxel 0,1 μM como controles positivos de células bloqueadas en mitosis. Los resultados (Figura 5.3) mostraron que las células tratadas con mitoxantrona no alcanzan la fase de mitosis.

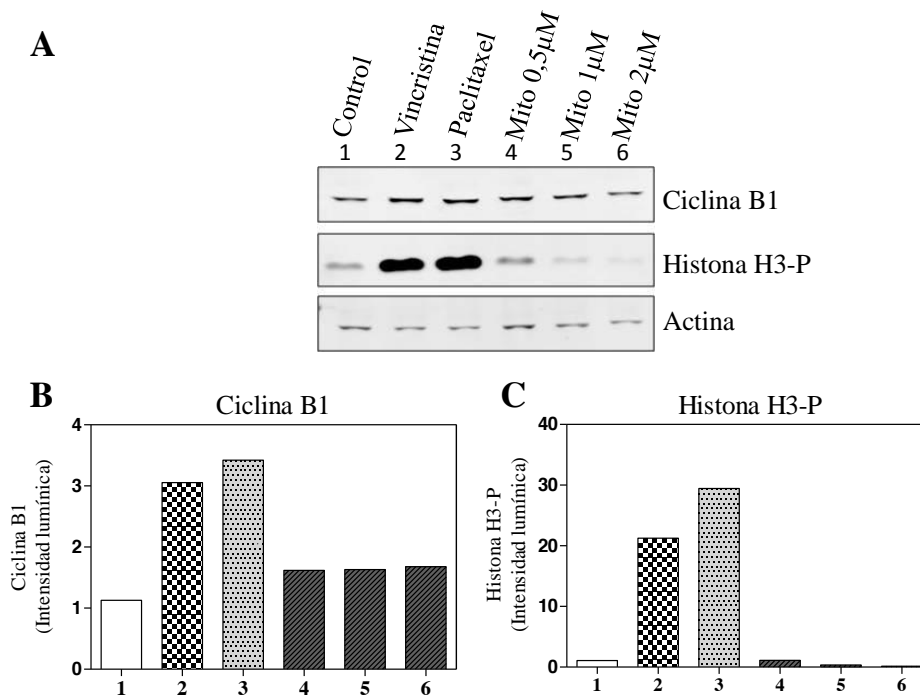


Figura 5.3. Estudio de ciclina B1 y de histona H3 fosforilada en células tratadas con vincristina, paclitaxel o mitoxantrona. A) Análisis Western de ciclina B1 e histona H3-P en extractos celulares obtenidos tras el tratamiento durante 24 horas con mitoxantrona 0,5, 1 ó 2 μ M. Se utilizó actina como control de carga, así como vincristina 0,1 μ M y paclitaxel 0,1 μ M como controles positivos de mitosis. B y C) Cuantificación de las bandas de ciclina B1 e Histona H3-P.

El análisis por citometría de flujo de células tratadas con mitoxantrona durante 48 horas puso de manifiesto que a concentraciones entre 0,5 y 2 μ M la mitoxantrona induce un aumento en el porcentaje de células en fase S, que en el caso de las concentraciones más altas se vió acompañado por un aumento en el porcentaje de fragmentos celulares o células hipodiploides (Sub G₀) (datos no mostrados).

5.1.2.2. Efecto de la mitoxantrona en células sincronizadas

Las células que crecen en un cultivo pueden encontrarse en cualquier fase del ciclo celular, por lo que para poder estudiar con más detalle el efecto de un fármaco se puede realizar una sincronización de las mismas. Así, se llevó a cabo un estudio del efecto de la mitoxantrona en un cultivo celular sincronizado al comienzo de la fase S, mediante un doble bloqueo con timidina, y se analizó su ciclo celular tras eliminar dicho bloqueo. Mediante esta sincronización, las células se encuentran al comienzo de la fase S del ciclo (considerado como tiempo 0h), progresando posteriormente el ciclo celular durante las horas siguientes tras la retirada de la timidina. Tras esta retirada, las células fueron tratadas en ausencia (control) o presencia de mitoxantrona 2 μ M y recogidos los extractos celulares correspondientes cada hora

durante 13 horas. Al realizar un análisis por citometría de flujo de las distribuciones de las diferentes fases del ciclo celular, observamos que la mitoxantrona produce un bloqueo del ciclo en la fase S (Figura 5.5), mientras que las células control tardan aproximadamente 13 horas en alcanzar la fase de mitosis para reiniciar un nuevo ciclo (fase G₀/G₁) (Figura 5.4).

Tras la liberación del bloqueo con timidina, las células control salen de la fase S y van completando el ciclo celular, hasta recuperar una distribución normal a las 13 horas (63,6% en G₀/G₁, 6,8% en S y 19,5% en G₂/M) (Figura 5.4). Sin embargo, las células tratadas con mitoxantrona experimentan una acumulación en fase S con porcentajes de entre el 41 y 64%, que se extiende a lo largo de las 13 horas de tratamiento. (Figura 5.5). Los resultados fueron muy similares con una concentración de mitoxantrona de 0,5 μM (datos no mostrados). Estos datos confirman que la mitoxantrona bloquea la progresión del ciclo celular en la fase S.

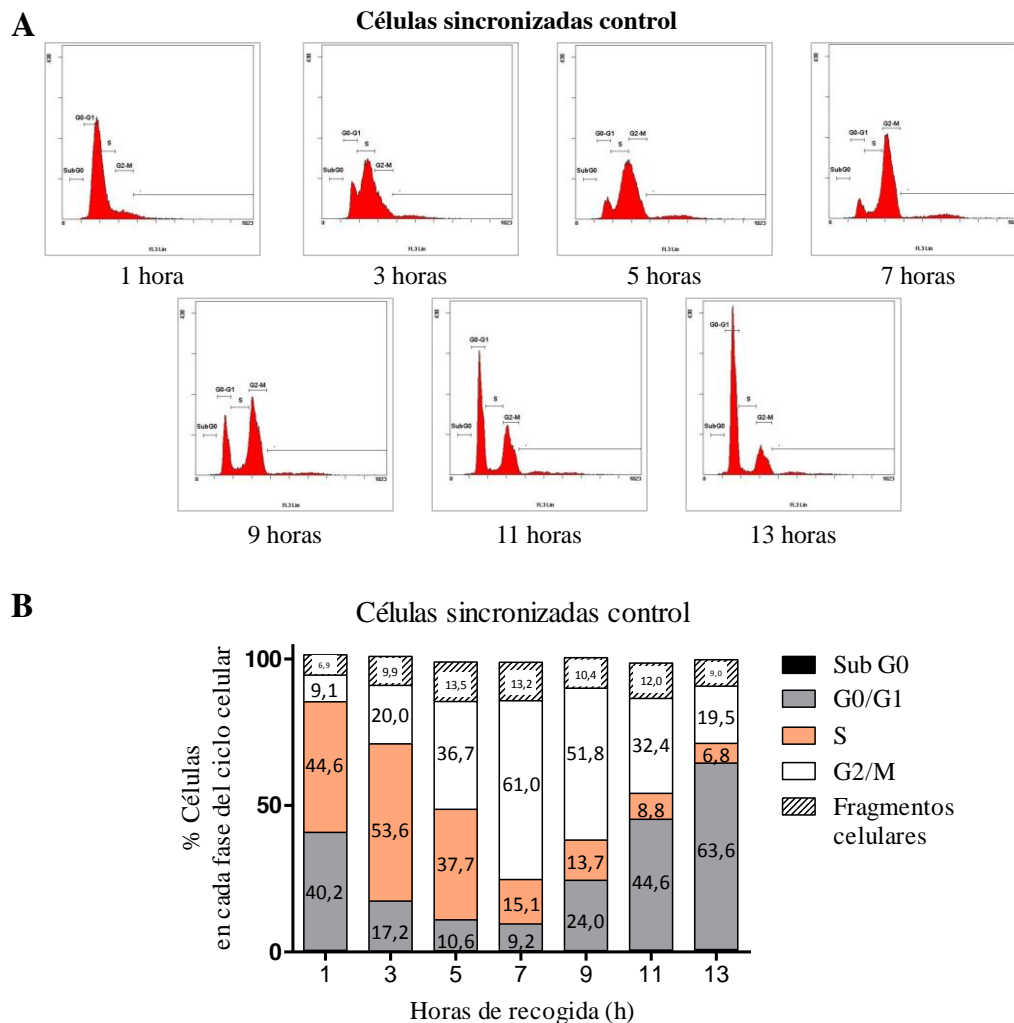


Figura 5.4. Análisis del ciclo celular en células sincronizadas control. A) Evolución del ciclo celular en células PC-3 sincronizadas control entre 0 y 13 horas tras la eliminación del bloqueo con timidina. Se

muestran los histogramas correspondientes a las horas impares, obtenidos tras procesamiento y análisis por citometría de flujo. B) Cuantificación de los histogramas, en la que se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

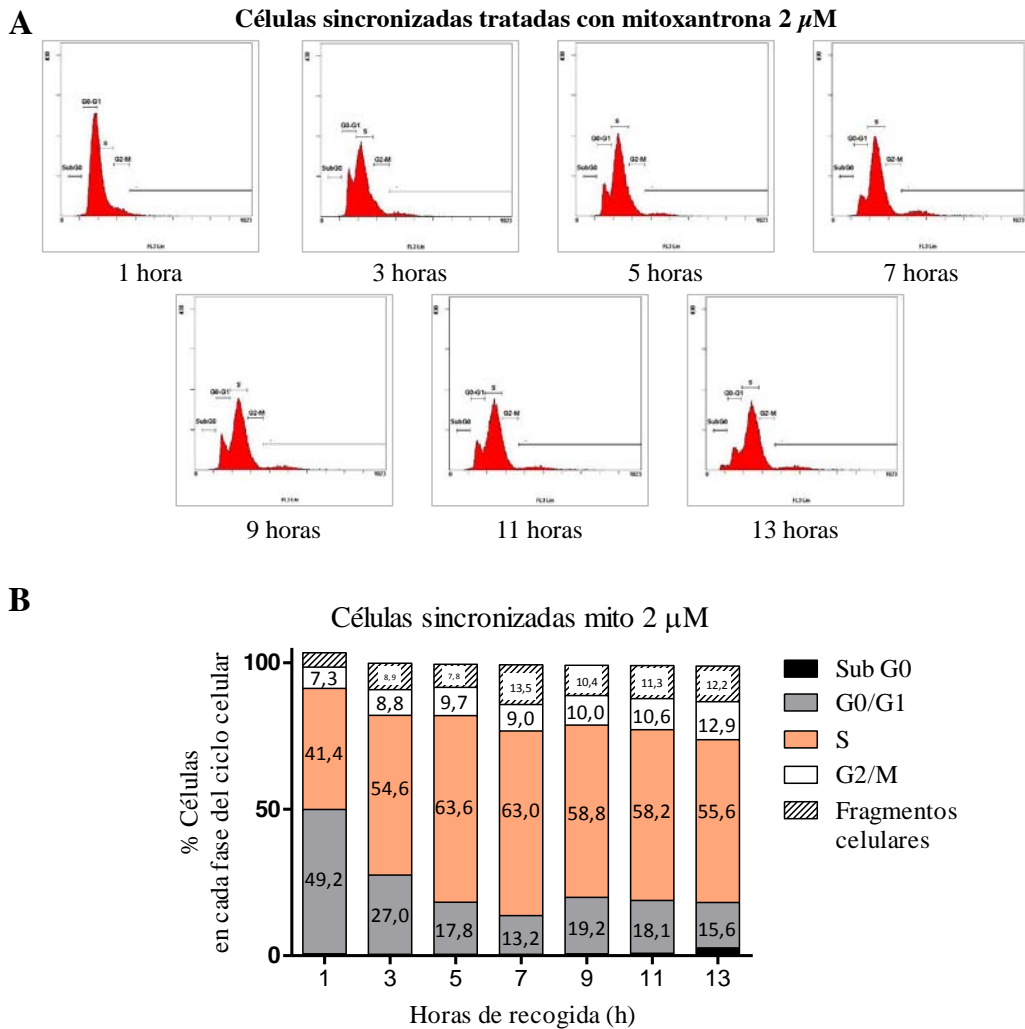


Figura 5.5. Análisis del ciclo celular en células sincronizadas y tratadas con mitoxantrona. A) Evolución del ciclo celular en células PC-3 sincronizadas y tratadas con mitoxantrona 2 μ M entre 0 y 13 horas tras la eliminación del bloqueo con timidina. Se muestran los histogramas correspondientes a las horas impares, obtenidos tras procesamiento y análisis por citometría de flujo. B) Cuantificación de los histogramas, en la que se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

El análisis del ciclo celular se complementó con un análisis Western de los extractos celulares en los que se determinó la presencia de ciclina A, como marcador de fase S/G₂ e histona H3 fosforilada en Ser10, como marcador de mitosis. Los resultados (Figura 5.6) mostraron que en las células control los niveles de ciclina A (Figuras A y C) aumentan progresivamente hasta las 10 horas, donde se alcanza el máximo, indicando que, en dicho momento las células se encuentran en fase G₂ del ciclo celular. Por lo que respecta a la histona H3-P (Figuras A y D), su nivel es prácticamente nulo hasta las 9 horas pero aumenta

notablemente desde las 10 hasta las 13 horas, coincidiendo este último intervalo con la salida de las células de la fase G₂ y con la disminución de la expresión de ciclina A. Por el contrario, en las células tratadas con mitoxantrona 2 μM, se observa un aumento progresivo en los niveles de expresión de ciclina A hasta las 13 horas, donde presenta el máximo de expresión (Figuras B y C), confirmando la parada en fase S. Los niveles de histona H3-P (B y D) permanecen muy bajos durante las 13 horas de tratamiento, indicando que las células no entran en mitosis.

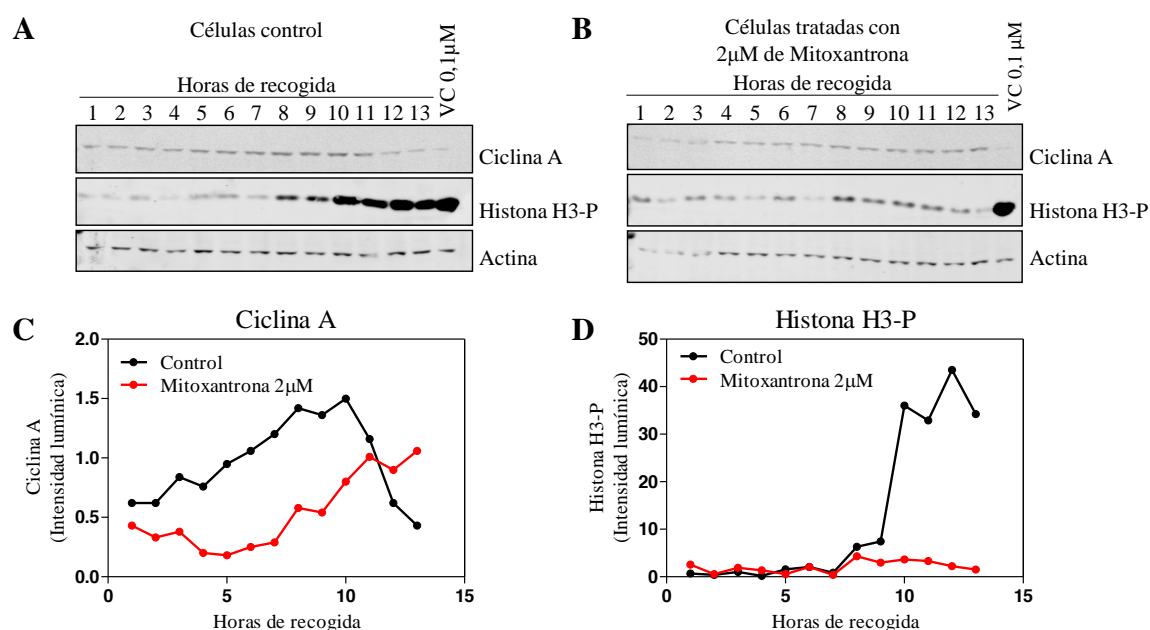


Figura 5.6. Expresión de ciclina A y fosforilación de histona H3 en células sincronizadas. Análisis Western de ciclina A e histona H3-P en extractos celulares obtenidos a partir de células PC-3 sincronizadas control (A) o tratadas con mitoxantrona 2 μM (B). Se utilizó actina como control de carga, y extracto de células tratadas con vincristina 0,1 μM (VC) como control de células bloqueadas en mitosis. C) Cuantificación de las bandas de ciclina A. D) Cuantificación de las bandas de histona H3-P.

5.1.3. La mitoxantrona inhibe la fosforilación de p54^{nrb}

Al final de la fase S tiene lugar la formación del complejo Cdk1-ciclina A, que junto con el complejo Cdk2-ciclina A, fosforila distintas proteínas implicadas en la transición S-G₂. Durante la fase G₂ de ciclo celular las ciclinas de tipo A son degradadas por el proteasoma, mientras que las ciclinas B son sintetizadas activamente. Como consecuencia, Cdk1 se une a la ciclina B, para iniciar el proceso de mitosis. El complejo Cdk1-ciclina B es capaz de fosforilar a más de 70 sustratos, implicados en numerosos procesos regulatorios y estructurales que controlan la correcta progresión de la mitosis (Malumbres & Barbacid, 2005). Así, por ejemplo, p54^{nrb} es una proteína nuclear fosforilada por Cdk1 durante la mitosis (Proteau et al,

2005). p54^{nrb}, también conocida como NonO, es un factor nuclear que participa en el “splicing” del mRNA (Kameoka et al, 2004; Shav-Tal & Zipori, 2002). Estudios previos en nuestro laboratorio (Casado et al, 2009) demostraron que los fármacos antimitóticos vincristina y paclitaxel inducen la fosforilación de p54^{nrb} en células HeLa, y que la parada del ciclo en fase G₂/M inducida por éstos es requerida para que tenga lugar dicha fosforilación.

El bloqueo del ciclo en fase S inducido por fármacos como los inhibidores de TOP2 impide la entrada de las células en mitosis, por lo que decidimos estudiar el efecto de la mitoxantrona sobre la fosforilación de p54^{nrb}. Para ello, se incubaron células PC-3 durante 24 horas con mitoxantrona 2 µM, y los extractos proteicos obtenidos fueron estudiados por electroforesis bidimensional (2DE) y análisis Western de p54^{nrb} (Figura 5.7).

Como control positivo de mitosis se utilizaron células PC-3 tratadas durante 24 horas con vincristina 0,1 µM y paclitaxel 0,1 µM, cuyos extractos celulares fueron procesados de la misma manera. El análisis Western (A y B) mostró la aparición de 3 formas ácidas de p54^{nrb} (manchas 4, 6 y 7) y la intensificación de la mancha 5 tras el tratamiento con vincristina y paclitaxel. Para confirmar que p54^{nrb} se fosforila se llevó a cabo un tratamiento de los extractos celulares con una fosfatasa inespecífica. Los extractos proteicos de células control o células tratadas con vincristina 0,1 µM durante 24 horas se incubaron con fosfatasa λ (una fosfatasa obtenida de células de *E. coli* infectadas con el bacteriófago λ) y analizados en paralelo. En la Figura C se observa que la desfosforilación “in vitro” realizada por la fosfatasa λ provoca la desaparición de las formas inducidas por el tratamiento.

El análisis de p54^{nrb} en células tratadas con mitoxantrona (D) mostró claramente que la mitoxantrona inhibe la fosforilación de p54^{nrb} al impedir la entrada de las células en mitosis.

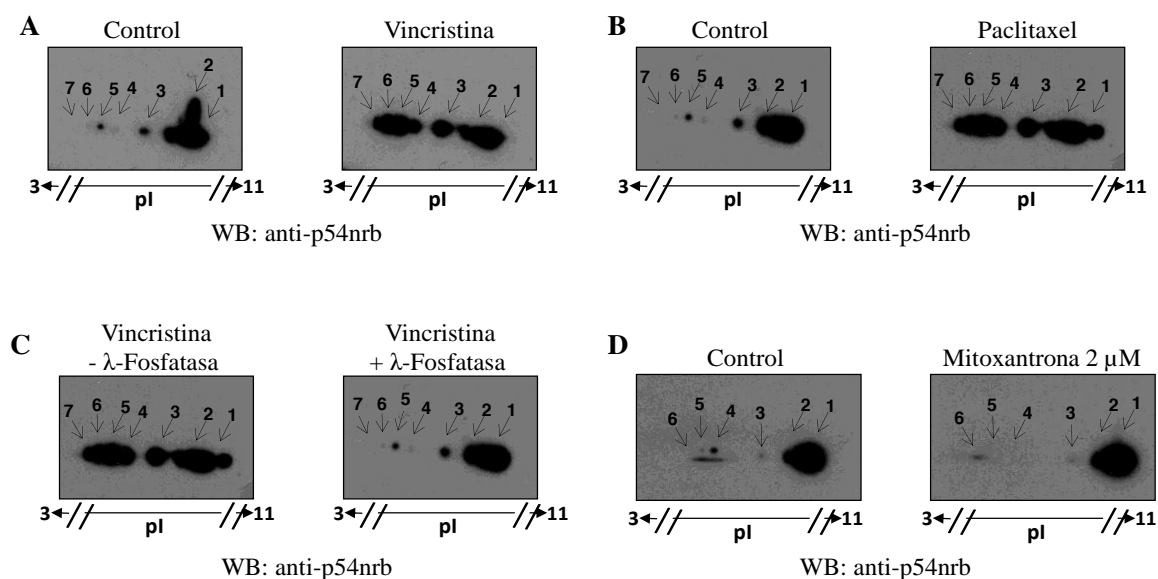


Figura 5.7. Efecto de vincristina, paclitaxel y mitoxantrona sobre la fosforilación de la proteína nuclear p54^{nrb}. Los extractos proteicos de células PC-3 tratadas durante 24 horas con: A) vincristina 0,1 μ M, B) paclitaxel 0,1 μ M, C) vincristina 0,1 μ M y tratados posteriormente con fosfatasa λ (λ -Fosfatasa) o D) mitoxantrona 2 μ M, fueron separados por electroforesis bidimensional y procesados para análisis Western de la proteína p54^{nrb}. Las flechas indican las diferentes formas de la proteína.

5.1.4. La doxorubicina bloquea el ciclo celular en fase G₂/M

Para estudiar si el efecto citotóxico de la doxorubicina está acompañado por alteraciones en el ciclo celular se trataron células PC-3 con doxorubicina 0,5, 1 y 2 μ M durante 24 horas. Tras ser procesadas según el protocolo de Vindelov las células fueron analizadas por citometría de flujo (Figura 5.8). Los resultados muestran que la doxorubicina (0,5 y 1 μ M) incrementa el porcentaje de células en fase G₂/M del 28,53% al 61,82% y 44,71%, respectivamente, mientras que el porcentaje de células en fase G₀/G₁ disminuye considerablemente. No obstante, a medida que aumenta la concentración de doxorubicina se incrementa también el porcentaje de células bloqueadas en fase S.

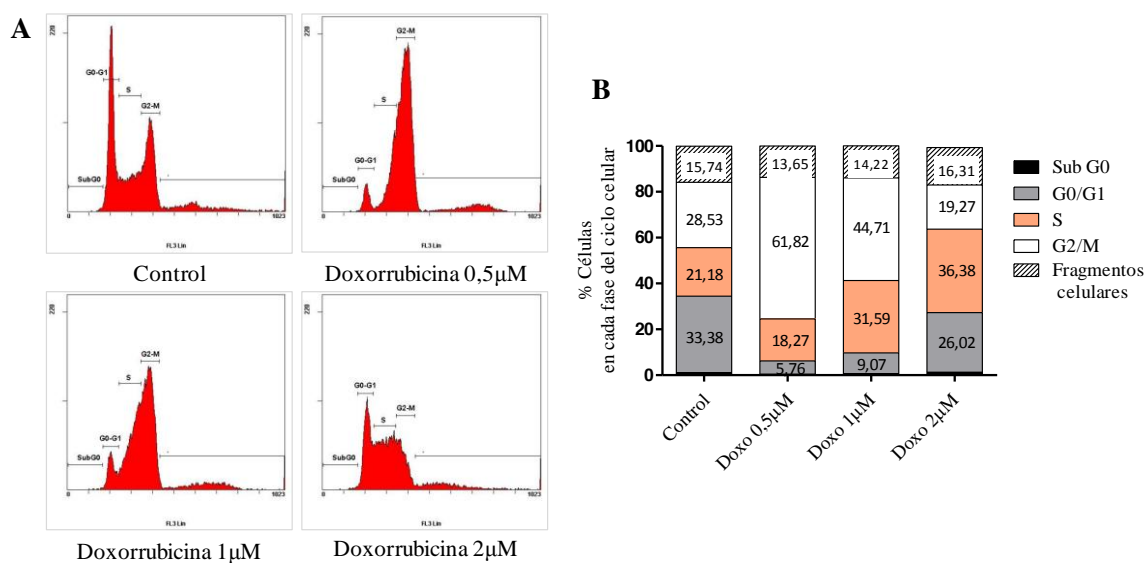


Figura 5.8. Efecto de la doxorubicina en el ciclo celular de células PC-3. A) Histogramas de células PC-3 control o tratadas con doxorubicina 0,5, 1 ó 2 μM durante 24h, obtenidos tras procesamiento y análisis por citometría de flujo. En los histogramas se representan las fases del ciclo celular: Sub G₀ (células hipodiploides), G₀/G₁, S ó G₂/M. B) Cuantificación de los histogramas, en la que se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

5.1.5. La mitoxantrona y la doxorubicina generan roturas en el DNA

Los fármacos inhibidores de la TOP2 tienen una importante incidencia en el metabolismo del DNA, que se refleja en un aumento en el número de roturas producidas en el mismo.

Para determinar la generación de roturas en el DNA realizamos el ensayo del cometa en condiciones alcalinas. En este ensayo se realizan electroforesis de células individuales que permiten evaluar el daño en el DNA, detectando roturas de cadena simple, roturas de cadena doble y lesiones de sitios sensibles al medio alcalino. Es una técnica electroforética basada en la capacidad de los fragmentos de DNA desnaturalizados y rotos de migrar fuera del núcleo bajo la influencia de un campo eléctrico, mientras que el DNA intacto migra más lento y se mantiene dentro de los límites del núcleo. Estas migraciones se producen bajo una forma característica similar a la cola de un cometa y su evaluación permite detectar el nivel de generación de roturas del DNA. El parámetro representativo del daño inducido en las células utilizado en este ensayo fue el *momento de la cola*, definido como el producto entre la longitud de la cola y el porcentaje de DNA en la cola (ver Métodos).

Para estudiar este efecto se incubaron células PC-3 con mitoxantrona (0,1, 0,5 y 2 μM) ó doxorubicina (0,1, 0,25 y 1 μM) durante 24 horas. Como se ha descrito anteriormente, estas concentraciones son tóxicas para las células PC-3. Tras el procesamiento de las células como

se describe en Métodos, las muestras fueron teñidas con *SYBR Green* y la fluorescencia visualizada por microscopía (Figura 5.9 y 5.10). Las imágenes capturadas y mostradas en la Figura 5.9A corresponden a las células tratadas con mitoxantrona, donde se observan colas largas y visibles de los cometas con respecto a las células control, cuya longitud incrementa a medida que aumenta la concentración del fármaco, indicativo de daño sustancial en el DNA. El análisis cuantitativo con el programa *Komet 5.0* (Figura 5.9B) mostró la diferencia entre la media del *momento de la cola* de las células tratadas con mitoxantrona y la media del *momento de la cola* de las células control, que solamente presentan un pequeño daño espontáneo del DNA.

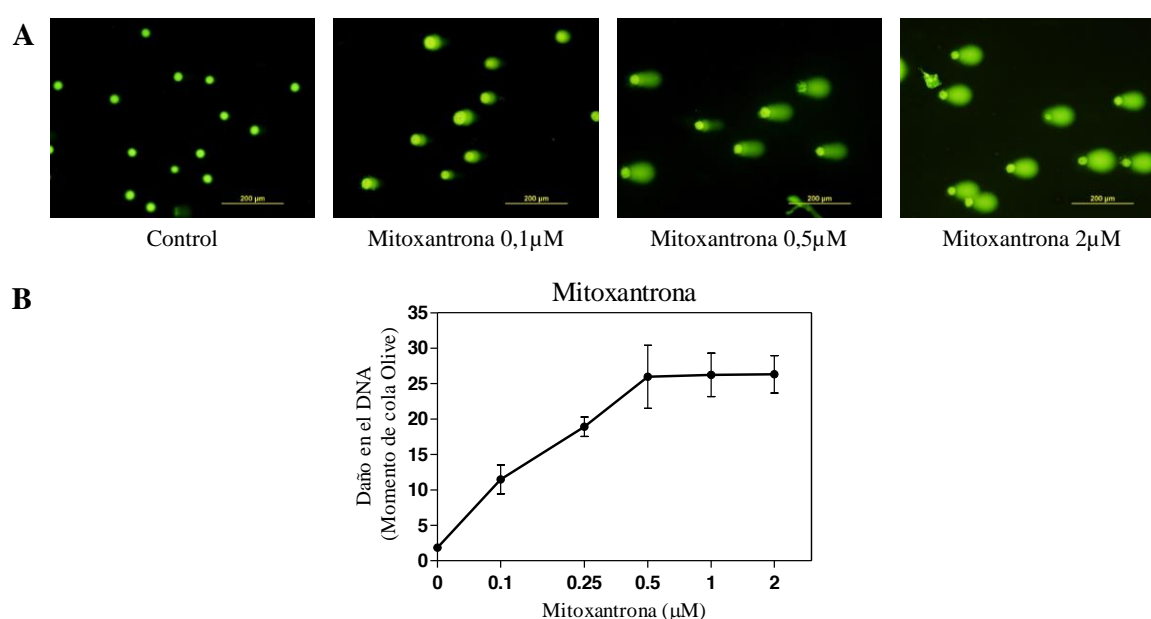


Figura 5.9. Imágenes y valores del *momento de cola Olive* obtenidos tras el ensayo cometa alcalino de células tratadas con mitoxantrona. A) Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de células PC-3 tratadas con mitoxantrona 0,1, 0,5 ó 2 μM durante 24 horas, sometidas a lisis, desnaturalización del DNA, electroforesis en condiciones alcalinas y teñidas posteriormente con *SYBR Green*. B) Valores del *momento de cola Olive* obtenidos tras la cuantificación de la señal de fluorescencia de cada célula mediante el programa *Komet 5.0*. Las barras indican el error estándar de la media. Los datos representan la media \pm SEM de experimentos realizados al menos en duplicado.

La Figura 5.10 muestra los resultados obtenidos tras el tratamiento con doxorubicina.

Estos resultados demuestran que la mitoxantrona y la doxorubicina generan roturas en el DNA, lo que muy probablemente contribuye a la citotoxicidad observada.

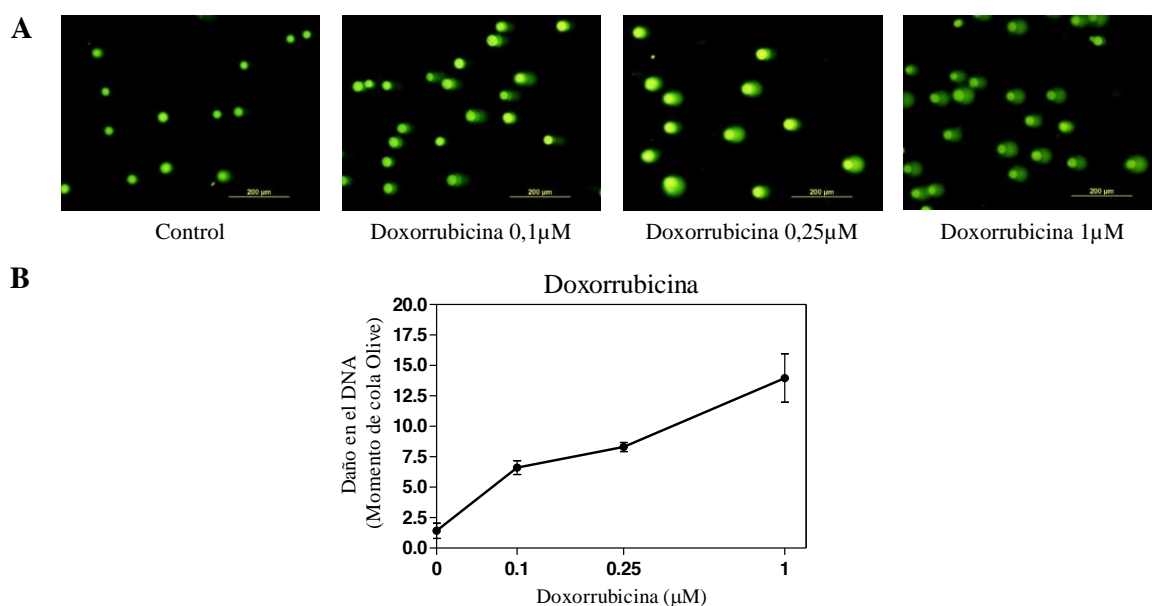


Figura 5.10. Imágenes y valores del momento de cola Olive obtenidos tras el ensayo cometa alcalino de células PC-3 tratadas con doxorubicina. A) Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de células PC-3 tratadas con doxorubicina 0,1, 0,25 ó 1 μM durante 24 horas, y procesadas como en la Figura 5.9. B) Valores del *momento de cola Olive* obtenidos tras la cuantificación de la señal de fluorescencia de cada célula mediante el programa *Komet 5.0*. Las barras indican el error estándar de la media. Los datos representan la media \pm SEM de experimentos realizados al menos en duplicado.

5.2. Efecto de fármacos antimitóticos: vincristina y paclitaxel

5.2.1. La vincristina y el paclitaxel inducen una citotoxicidad dependiente de la concentración

La vincristina y el paclitaxel son compuestos utilizados actualmente en quimioterapia que inducen un bloqueo mitótico de las células y la posterior muerte de las mismas. Con el objetivo de evaluar el efecto de la vincristina y el paclitaxel en la línea celular PC-3 se llevaron a cabo, en primer lugar, estudios de viabilidad celular mediante el ensayo de reducción del MTT.

Las células se incubaron durante 72 horas con concentraciones crecientes de vincristina (1-100 nM) ó paclitaxel (1-100 nM) y se determinó el porcentaje de células viables a las distintas concentraciones ensayadas. Como se puede observar en la Figura 5.11, la vincristina y el paclitaxel producen una disminución en el número de células metabólicamente activas dependiente de la concentración. La incubación con vincristina durante 72 horas (A) redujo el número de células a un 14 y 10% a las concentraciones de 30 y 100 nM, respectivamente. La reducción del número de células se hizo significativa con respecto al control a partir de una concentración de 1 nM con valores de $p < 0,001$. Por otra parte, el tratamiento con paclitaxel

durante el mismo tiempo de incubación (B) redujo el número de células a un 17 y 12% a las concentraciones de 30 y 100 nM, respectivamente. La reducción del número de células se hizo significativa con respecto al control a partir de una concentración de 2 nM, con valores de $p < 0,001$.

A partir de los porcentajes de células viables obtenidos a las distintas concentraciones ensayadas se calcularon, mediante el programa *CompuSyn*, los valores de EC50 para cada fármaco. Como se puede observar en la Tabla 5.2, el EC50 para la vincristina es de $1,33 \pm 0,14 \mu\text{M}$ y para el paclitaxel es de $5,87 \pm 0,77 \mu\text{M}$.

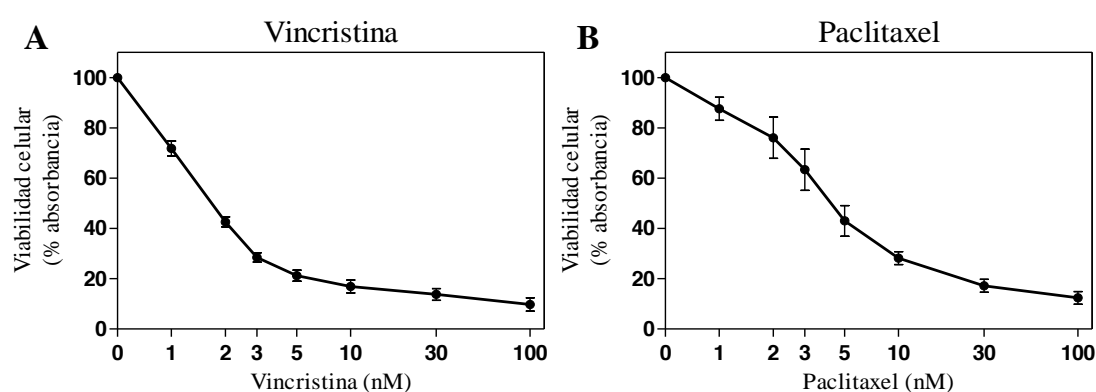


Figura 5.11. La vincristina y el paclitaxel reducen el número de células metabólicamente activas de forma dependiente de la concentración. Curvas dosis-respuesta de células PC-3 tratadas con concentraciones crecientes de: A) vincristina (1-100 nM) ó B) paclitaxel (1-100 nM) durante 72 horas, obtenidas mediante el ensayo de reducción del MTT. En las gráficas se representa el porcentaje de células viables o metabólicamente activas, medido como tanto por cierto de absorbancia con respecto a las células control. Las barras indican el error estándar de la media.

| Fármacos | EC50 - Citotoxicidad (μM) |
|-------------|--|
| Vincristina | $1,33 \pm 0,14$ |
| Paclitaxel | $5,87 \pm 0,77$ |

Tabla 5.2. Valores de EC50 para la vincristina y el paclitaxel, determinados tras el ensayo de citotoxicidad. Valores de EC50 para la vincristina y el paclitaxel determinados a partir de los porcentajes de células viables obtenidos en los ensayos de reducción del MTT, mediante el programa *CompuSyn*. En la tabla se representan los valores de EC50 obtenidos \pm el error estándar de la media.

5.2.2. La vincristina y el paclitaxel bloquean el ciclo celular en fase de mitosis

A continuación se determinó si el efecto citotóxico producido por la vincristina y el paclitaxel estaba acompañado por alteraciones en el ciclo celular. Para ello, se trataron células PC-3 con vincristina $0,1 \mu\text{M}$ ó paclitaxel $0,1 \mu\text{M}$ durante 24 horas. Tras ser procesadas según

el protocolo de Vindelov, fueron analizadas por citometría de flujo (Figura 5.12). Los resultados muestran que ambos fármacos incrementan el porcentaje de células en fase G₂/M, del 27,47% al 76,9% en el caso de la vincristina y del 27,47% al 71,62% en el caso del paclitaxel. Para determinar en qué fase concreta del ciclo (G₂ ó M) tiene lugar el bloqueo inducido por estos fármacos, se realizó un análisis Western de los extractos celulares en los que se determinó la presencia de ciclina B1 como marcador de fase G₂/M, e histona H3 fosforilada como marcador de mitosis (Figura 5.13). Los resultados muestran que la vincristina y el paclitaxel inducen el bloqueo de las células en mitosis.

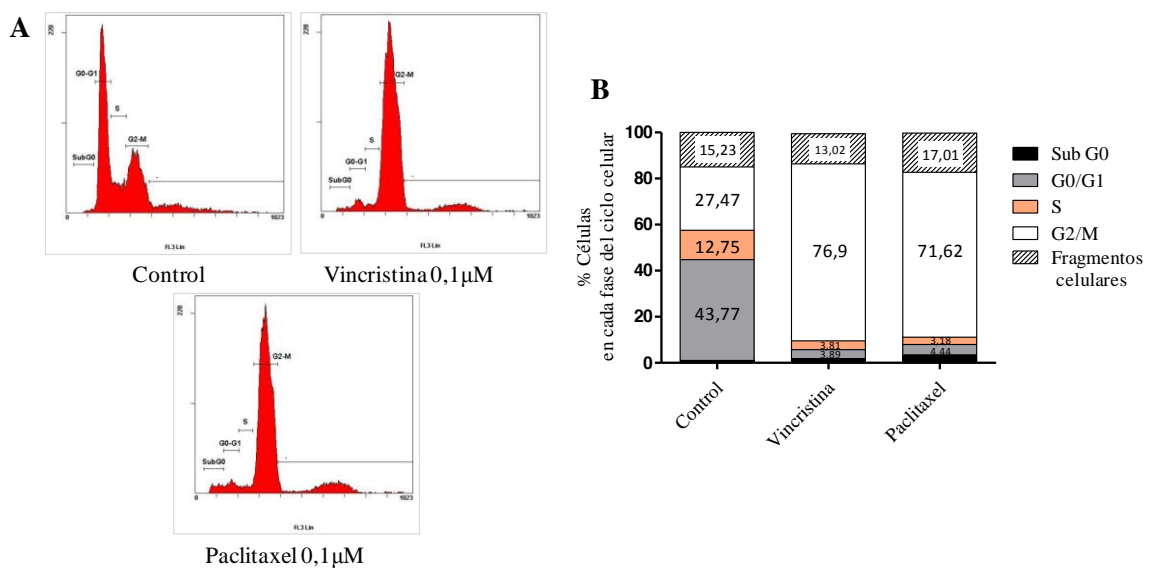


Figura 5.12. Efecto de la vincristina y el paclitaxel en el ciclo celular de células PC-3. A) Histogramas de células PC-3 control o tratadas con vincristina 0,1 μM ó paclitaxel 0,1 μM durante 24 horas, obtenidos tras procesamiento según el protocolo de Vindelov y analizados por citometría de flujo. En los histogramas se representan las fases del ciclo celular: Sub G₀ (células hipodiploides), G₀/G₁, S ó G₂/M. B) Cuantificación de los histogramas, en la que se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

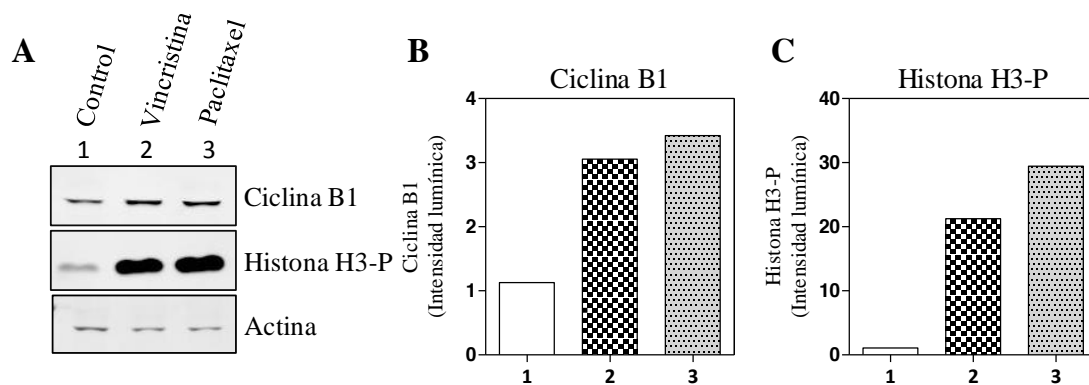


Figura 5.13. Estudio de la expresión de ciclina B1 y de la fosforilación de histona H3 en células PC-3 tratadas con vincristina o paclitaxel. A) Análisis Western de ciclina B1 e histona H3-P en extractos

celulares obtenidos tras el tratamiento durante 24 horas con vincristina 0,1 μM ó paclitaxel 0,1 μM . Se utilizó actina como control de carga. B) Cuantificación de las bandas de ciclina B1. C) Cuantificación de las bandas de histona H3-P.

5.2.3. La vincristina induce la fosforilación de eEF1B γ y Anxa2

Una de las consecuencias del bloqueo del ciclo celular en mitosis producido por la vincristina y el paclitaxel es la fosforilación de sustratos que, en condiciones normales, se observan durante una mitosis normal. Así, como se ha descrito anteriormente, la vincristina y el paclitaxel inducen la fosforilación de p54^{nrb} (Figura 5.7). Además de esta proteína, nos propusimos estudiar el efecto de la vincristina sobre otras dos proteínas estudiadas previamente en nuestro laboratorio y cuya fosforilación se produce también durante la mitosis. Éstas son el factor de elongación 1B γ (eEF1B γ) y la Anexina A2 (Anxa2) (Fernandez-Garcia et al, 2010; Prado et al, 2007). El factor eEF1B γ es un factor de elongación de la síntesis proteica que, junto con el eEF1B α y el eEF1B δ , forman el eEF1B encargado de intercambiar el GDP por GTP del eEF1A para mantenerlo en su forma activa y transferir los aminoacil-tRNAs a los ribosomas (Le Sourd et al, 2006). Por otra parte, la Anxa2 es una anexina que se une a fosfolípidos de membrana de manera dependiente de calcio y que está implicada en diferentes procesos como la endocitosis y exocitosis (Lorusso et al, 2006), la organización de dominios de membrana (Gerke & Moss, 2002) o la adhesión célula-célula (Mai et al, 2000).

Para estudiar si la vincristina induce la fosforilación del eEF1B γ y de la Anxa2 se trataron células PC-3 con vincristina 0,1 μM durante 24 horas. Los extractos proteicos obtenidos fueron analizados por electroforesis bidimensional (2DE) y tinción con un reactivo específico de proteínas fosforiladas (Pro-Q Diamond). Entre las manchas en las que se observó un aumento de la señal tras el tratamiento con vincristina se procesaron dos para su análisis por espectrometría de masas MALDI-ToF (ver Métodos). Las huellas peptídicas obtenidas y analizadas con el programa Aldente, utilizando la base de datos Swiss-Prot, permitieron identificar las manchas proteicas como eEF1B γ y Anxa2, con una valoración (“score”) significativa de 83,11 y 23,35 respectivamente (Tabla 5.3).

| Valoración | Masa (Da) | Longitud (aa) | pI | Aciertos | Cobertura | Nombre de la proteína | Nº acceso | Gen | Abreviatura |
|------------|-----------|---------------|------|----------|-----------|--|-----------|-------|----------------|
| 83,11 | 49988 | 437 | 6,26 | 11 | 27% | Factor de elongación eucariótico 1B γ | P26641 | EEF1G | eEF1B γ |
| 23,35 | 38473 | 339 | 7,54 | 7 | 21% | Anexina A2 | P07355 | ANXA2 | Anxa2 |

Tabla 5.3. Proteínas modificadas tras el tratamiento con vincristina. Los extractos proteicos de células PC-3 tratadas durante 24 horas con vincristina 0,1 μM fueron separados por electroforesis bidimensional y los geles teñidos con tinción fosfoespecífica Pro-Q Diamond. Las manchas proteicas de interés fueron cortadas, digeridas con tripsina, analizadas por MALDI-ToF e identificadas con el programa Aldente. Los

datos de cada fila corresponden a las proteínas identificadas eEF1B γ y Anxa2. Masa: Masa de la proteína en Daltons. pI: punto isoeléctrico. Aciertos: número de péptidos identificados. Cobertura: porcentaje de la proteína identificada. N° acceso: Número de acceso a la base de datos UniProt.

Para confirmar que el eEF1B γ y Anxa2 se fosforilan tras el tratamiento con vincristina los extractos proteicos de células PC-3 tratadas con vincristina 0,1 μ M durante 24 horas fueron analizados por electroforesis bidimensional y análisis Western (Figura 5.14). El análisis Western frente a eEF1B γ (A) mostró 4 formas proteicas en el control. Tras el tratamiento, la forma más ácida (4) incrementó su intensidad y apareció una nueva forma aún más ácida (5). El análisis Western frente a Anxa2 (B) mostró 3 formas proteicas en el control, incrementándose la intensidad de la forma más ácida (3) y apareciendo una forma aún más ácida (4) tras el tratamiento. Estos resultados apoyan la evidencia de que la vincristina induce la fosforilación del eEF1B γ y de Anxa2.

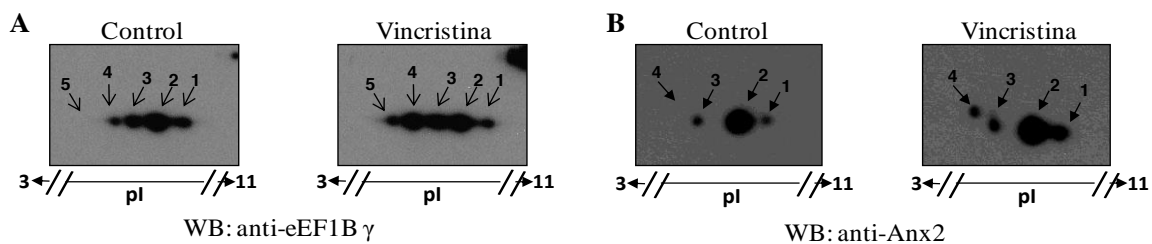


Figura 5.14. La vincristina induce la fosforilación de las proteínas eEF1B γ y Anxa2. Los extractos proteicos de células PC-3 tratadas durante 24 horas con vincristina 0,1 μ M fueron separados por electroforesis bidimensional y procesados para análisis Western de eEF1B γ y Anxa2. Las flechas indican las diferentes formas encontradas de cada proteína.

5.2.4. La vincristina y el paclitaxel no generan roturas en el DNA

Para comparar las causas de la citotoxicidad inducida por la vincristina y paclitaxel con la inducida por los inhibidores de TOP2 se estudió si se produce un aumento en el número de roturas en el DNA. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de cometa de células PC-3 tratadas con vincristina 0,1 y 1 μ M ó con paclitaxel 0,1 y 1 μ M, durante 24 horas. En la Figura 5.15 se muestran las imágenes correspondientes obtenidas por microscopía de fluorescencia. En todos los casos (B-E) las células tenían una apariencia similar a las células control (A). El análisis cuantitativo del *momento de la cola* con el programa *Komet 5.0* confirma que la vincristina y el paclitaxel no inducen roturas en el DNA (F).

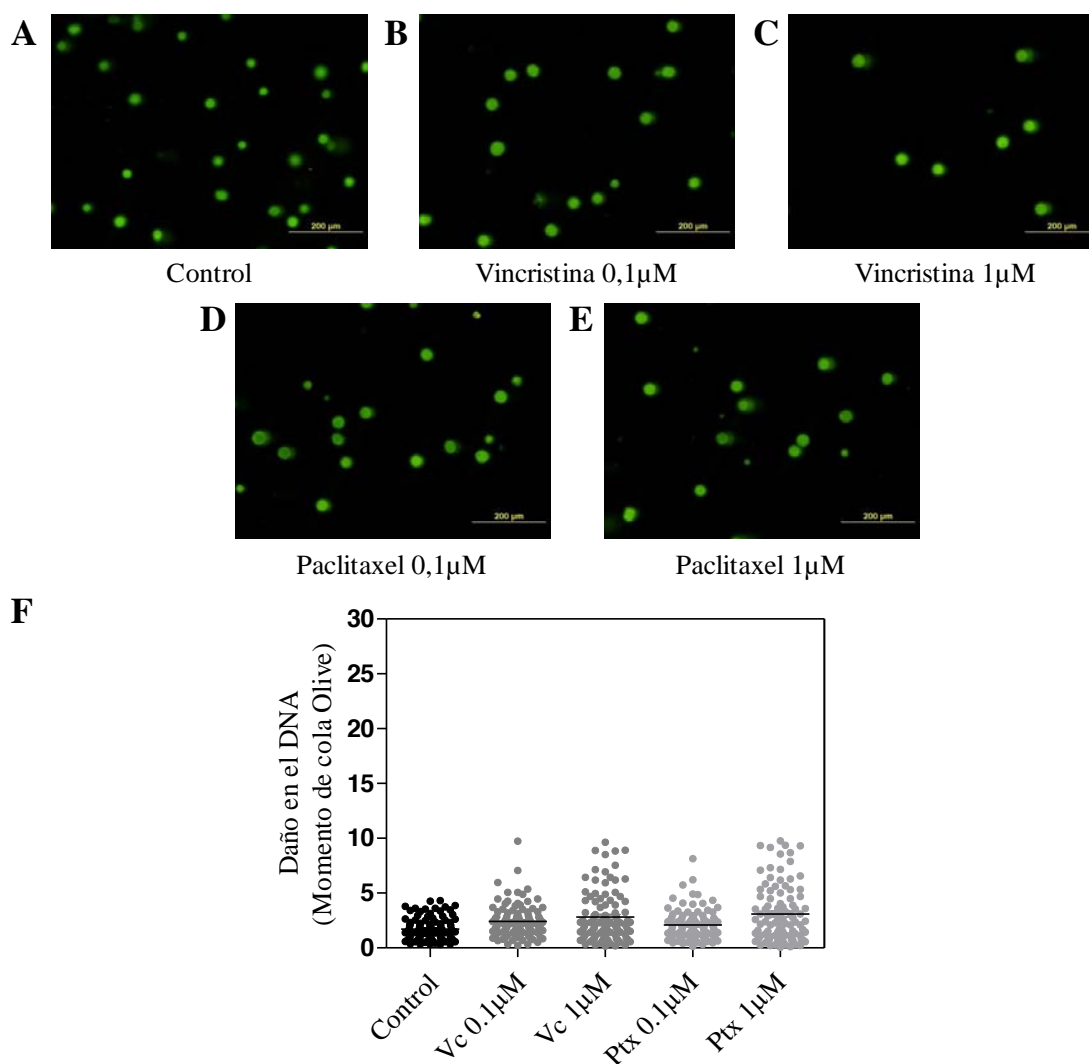


Figura 5.15. Imágenes y valores del *momento de cola Olive* obtenidos tras el ensayo cometa alcalino de células tratadas con vincristina o paclitaxel. A-E) Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de células PC-3 tratadas con vincristina 0,1 y 1 μM ó paclitaxel 0,1 y 1 μM durante 24 horas, sometidas a lisis, desnaturalización del DNA, electroforesis en condiciones alcalinas y teñidas posteriormente con *SYBR Green*. F) Valores del *momento de cola Olive* obtenidos tras la cuantificación de la señal de fluorescencia de cada célula mediante el programa *Komet 5.0*. Los datos representan experimentos realizados al menos en duplicado.

5.3. Efecto de inhibidores de la reparación del DNA: NU7026, NU7441 y KU55933

El NU7026 y el NU7441 son compuestos sintéticos que inhiben específicamente a la DNA-PK (Zhao et al, 2006). El NU7026 potencia la citotoxicidad causada por los inhibidores de TOP2 en células de leucemia (Willmore et al, 2004). Por su parte, el KU55933 es un inhibidor potente y específico de ATM (Hickson et al, 2004). Nosotros hemos estudiado si estos compuestos tienen acciones tóxicas sobre las células PC-3.

5.3.1. NU7026, NU7441 y KU55933 inducen una citotoxicidad dependiente de la concentración

Las células PC-3 se incubaron durante 72 horas con concentraciones crecientes de NU7026 (0,5-50 μM), NU7441 (0,1-10 μM) ó KU55933 (0,5-50 μM) y se determinó el porcentaje de células viables a las distintas concentraciones ensayadas (Figura 5.16). Como se puede observar en la figura, el NU7026 (A), NU7441 (B) y KU55933 (C) producen una disminución en el número de células metabólicamente activas dependiente de la concentración. La incubación con NU7026 y NU7441 durante 72 horas redujo el número de células a un 10% y un 36%, respectivamente, a las concentraciones de 50 y 10 μM . Por su parte, el KU55933 redujo el número de células a un 14 % a la concentración de 50 μM . Los valores de EC50 para cada fármaco obtenidos a partir de los porcentajes de células viables se muestran en la Tabla 5.4.

Las concentraciones de 10 μM para NU7026, 1 μM para NU7441 y 10 μM para KU55933 resultaron ser no tóxicas y óptimas para la inhibición de la DNA-PK y de ATM en estudios previos con células de linfoma (Willmore et al, 2004; Zhao et al, 2006). Los resultados de toxicidad que se acaban de describir indican que en el caso de las células PC-3 hay un comportamiento similar. Por ello, hemos elegido esas concentraciones para los estudios de combinación con estos inhibidores.

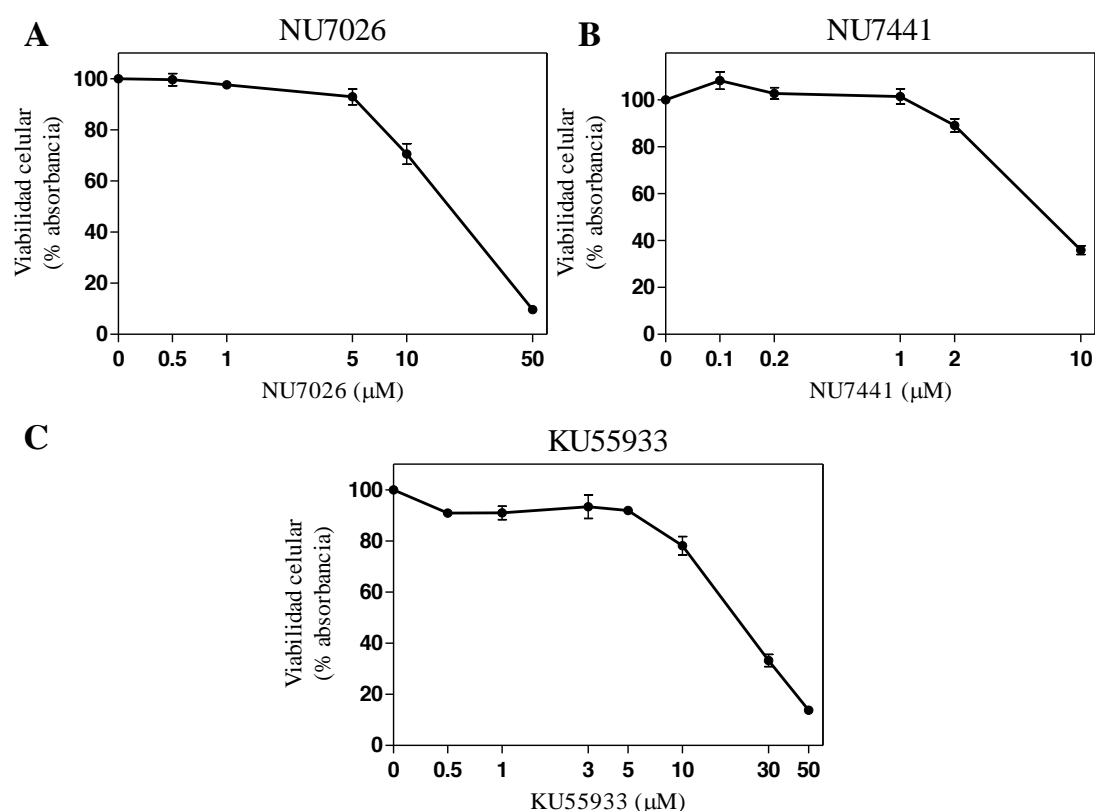


Figura 5.16. Efecto de los compuestos NU7026, NU7441 y KU55933 en la viabilidad de las células PC-3. Curvas dosis-respuesta de células PC-3 tratadas con concentraciones crecientes de: A) NU7026 (0,5-50 μM), B) NU7441 (0,1-10 μM) ó C) KU55933 (0,5-50 μM) durante 72 horas, obtenidas mediante el ensayo de reducción del MTT. En las gráficas se representa el porcentaje de células viables o metabólicamente activas, respecto a las células control. Las barras indican el error estándar de la media.

| Fármacos | EC50 - Citotoxicidad (μM) |
|----------|---------------------------|
| NU7026 | 15,04 +/- 0,55 |
| NU7441 | 8,71 +/- 1,21 |
| KU55933 | 20,85 +/- 0,26 |

Tabla 5.4. Valores de EC50 obtenidos para NU7026, NU7441 y KU55933. Valores de EC50 para NU7026, NU7441 y KU55933 determinados a partir de los porcentajes de células viables obtenidos en los ensayos de reducción del MTT, mediante el programa *CompuSyn*. En la tabla se representan los valores de EC50 obtenidos +/- el error estándar de la media.

5.3.2. NU7026 y KU55933 bloquean levemente el ciclo celular en fase G₀/G₁

Para estudiar si los inhibidores NU7026, NU7441 y KU55933 afectan al ciclo celular se incubaron células PC-3 con NU7026 10 μM, NU7441 1 μM ó KU55933 10 μM durante 24 horas. Tras ser procesadas según el protocolo de Vindelov, las células fueron analizadas por citometría de flujo (Figura 5.17). Los resultados muestran que NU7026 y KU55933 producen

un incremento significativo del porcentaje de células en fase G₀/G₁ (del 38,5% al 55,7% en el caso de NU7026 y del 38,5% al 50% en el caso del KU55933). El NU7441, por su parte, no produjo alteraciones en las fases del ciclo con respecto al control. Estos datos coinciden con los resultados de baja citotoxicidad observados a estas concentraciones.

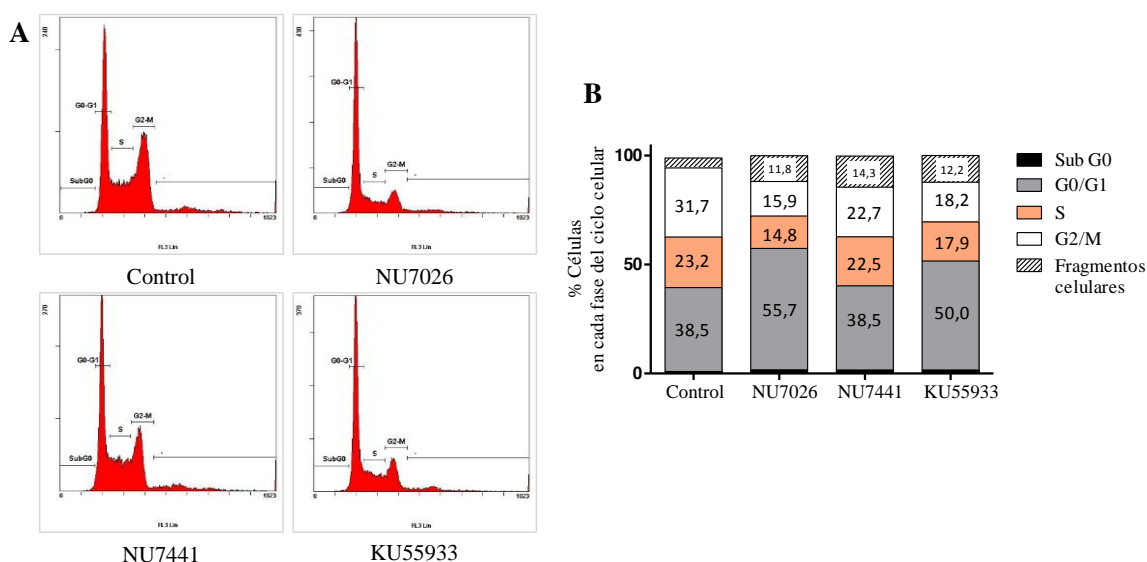


Figura 5.17. Efecto del NU7026, NU7441 y KU55933 en el ciclo celular de células PC-3. A) Histogramas de células PC-3 control o tratadas con NU7026 10 μ M, NU7441 1 μ M ó KU55933 10 μ M durante 24 horas, obtenidos tras procesamiento según el protocolo de Vindelov y analizados por citometría de flujo. En los histogramas se representan las fases del ciclo celular: fase Sub G₀ (células hipodiploides), G₀/G₁, S ó G₂/M. B) Cuantificación de los histogramas, en la que se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

5.3.3. NU7026, NU7441 y KU55933 no generan roturas en el DNA

Como en los casos anteriores hemos estudiado si los inhibidores NU7026, NU7441 y KU55933 generan roturas en el DNA. Para ello, se llevaron a cabo ensayos cometa en condiciones alcalinas de células tratadas con NU7026 10 μ M, NU7441 1 μ M o KU55933 10 μ M durante 24 horas. En la Figura 5.18 se muestran las imágenes correspondientes obtenidas por microscopía de fluorescencia. Las Figuras B, C y D corresponden a imágenes representativas de células tratadas con NU7026 10 μ M, NU7441 1 μ M y KU55933 10 μ M, respectivamente. Todas ellas mostraron una apariencia similar a las células control de la Figura A. El análisis cuantitativo del *momento de la cola* con el programa *Komet 5.0* confirma que ni los inhibidores de DNA-PK ni el inhibidor de ATM inducen roturas en el DNA.

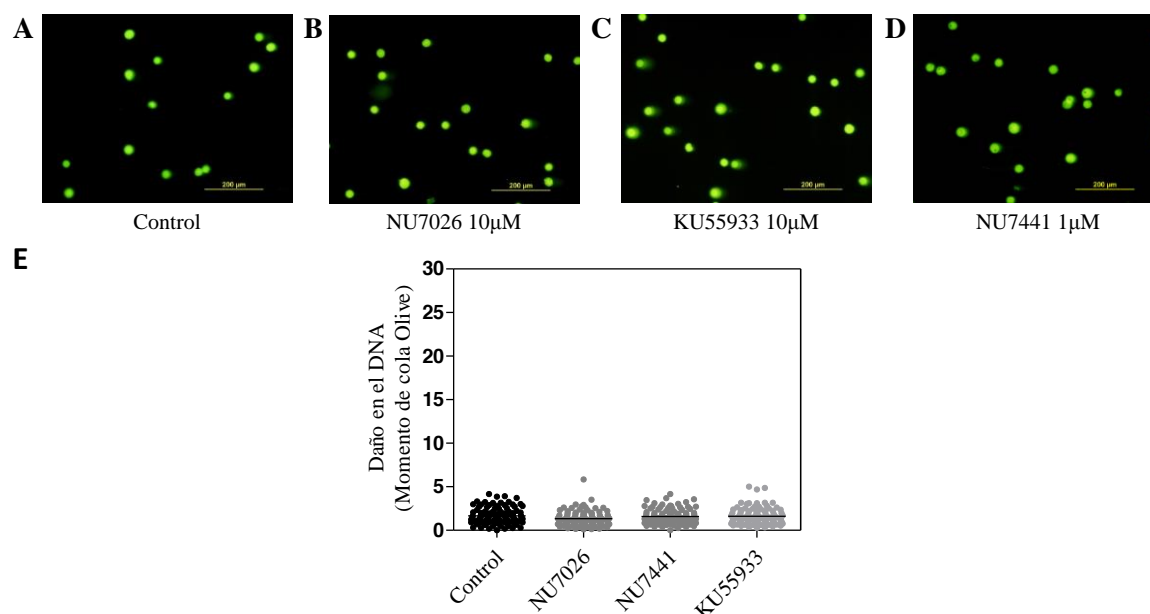


Figura 5.18. Imágenes y valores del *momento de cola Olive* obtenidos tras el ensayo cometa alcalino de células tratadas con NU7026, NU7441 ó KU55933. A) Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de células PC-3 tratadas con NU7026 10 µM, NU7441 1 µM ó KU55933 10 µM durante 24 horas, sometidas a lisis, desnaturalización del DNA, electroforesis en condiciones alcalinas y teñidas posteriormente con SYBR Green. B) Valores del *momento de cola Olive* obtenidos tras la cuantificación de la señal de fluorescencia de cada célula mediante el programa Komet 5.0. Los datos representan experimentos realizados al menos en duplicado.

5.4. Efecto de la combinación de inhibidores de TOP2 ó fármacos antimetabólicos con inhibidores de la reparación del DNA

La principal hipótesis planteada en este trabajo es que la inhibición de la DNA-PK, que es un enzima esencial en el sistema de reparación de extremos no homólogos (NHEJ) que repara roturas de cadena doble del DNA, sensibilizaría las células PC-3 al efecto de agentes inhibidores de TOP2 o de fármacos antimetabólicos, potenciando así su efecto y provocando una mayor muerte celular. Para inhibir la DNA-PK utilizamos los compuestos NU7026 y NU7441, a unas concentraciones con muy baja o nula toxicidad (10 µM y 1 µM, respectivamente). Asimismo, se realizaron algunos estudios de inhibición de ATM mediante el compuesto KU55933 (10 µM), con el fin de evaluar igualmente si existe una potenciación del efecto de los fármacos.

5.4.1. Efecto de la combinación de mitoxantrona y doxorubicina con inhibidores de DNA-PK y ATM en la viabilidad celular

Para evaluar los efectos de la inhibición de la actividad de DNA-PK y de ATM, se estudió previamente su activación en células PC-3 tratadas con mitoxantrona.

La activación de la DNA-PK se determinó midiendo su autofosforilación en el residuo Ser2056. Para ello, se recogieron extractos de células tratadas con mitoxantrona 0,1 ó 0,5 μM durante 48 horas y se realizó un análisis Western de DNA-PK fosfolilada (pDNA-PK). Como se muestra en la Figura 5.19 A, tras el tratamiento con mitoxantrona se observó una clara señal de pDNA-PK, indicativo de la activación de este enzima en respuesta al daño en el DNA inducido por el fármaco.

Por otra parte, se determinó la activación de ATM midiendo la presencia de la proteína fosforilada en el residuo Ser1981 (pATM) en extractos de células tratadas con mitoxantrona 0,3 ó 1 μM durante 6 horas. Como se observa en la Figura 5.19 B, tras el tratamiento con el fármaco se detectó la señal, aunque más tenue, de pATM, sugiriendo también la activación de este enzima tras el tratamiento.

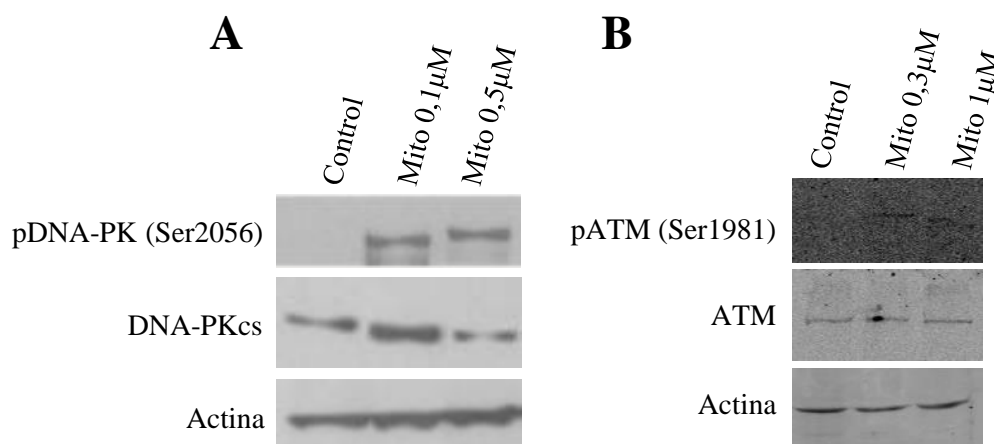


Figura 5.19. Estudio de la fosforilación de DNA-PK y de ATM en respuesta al tratamiento con mitoxantrona. Análisis Western de A) pDNA-PK y DNA-PK total, en extractos celulares obtenidos tras un tratamiento de 48 horas con mitoxantrona 0,1 ó 0,5 μM ; B) pATM y ATM total, en extractos celulares obtenidos tras un tratamiento de 6 horas con mitoxantrona 0,3 ó 1 μM . Mito: mitoxantrona.

A continuación, se evaluó el efecto del tratamiento combinado de mitoxantrona con los inhibidores de DNA-PK en la viabilidad celular. Para ello, se incubaron células PC-3 durante 72 horas con concentraciones crecientes de mitoxantrona (0,003-5 μM) en presencia o ausencia de NU7026 10 μM ó NU7441 1 μM . Las curvas dosis-respuesta obtenidas se muestran en la Figura 5.20. Como se puede observar en la Figura A, la mitoxantrona produjo una disminución en el número de células metabólicamente activas dependiente de la concentración. Al combinar este fármaco con NU7026, se observó una reducción significativa del número de células con respecto al fármaco en solitario, con valores de $p < 0,001$. Asimismo, y en presencia de

NU7441 (Figura B), los efectos fueron muy similares, reduciéndose significativamente la viabilidad celular con respecto a las células tratadas con mitoxantrona ($p < 0,05$).

Los valores de EC50 para la mitoxantrona en solitario o en combinación con los inhibidores se recogen en la Tabla 5.5. Según estos valores, el NU7026 aumenta la citotoxicidad de la mitoxantrona 12 veces (EC_{50} en presencia de NU7026 = $0,03 \pm 0,02$; $P=0,0047$) y NU7441, 18 veces (EC_{50} en presencia de NU7441 = $0,02 \pm 0,01$; $P=0,0031$). Estos datos muestran que NU7026 y NU7441 incrementan el efecto citotóxico de la mitoxantrona en células PC-3.

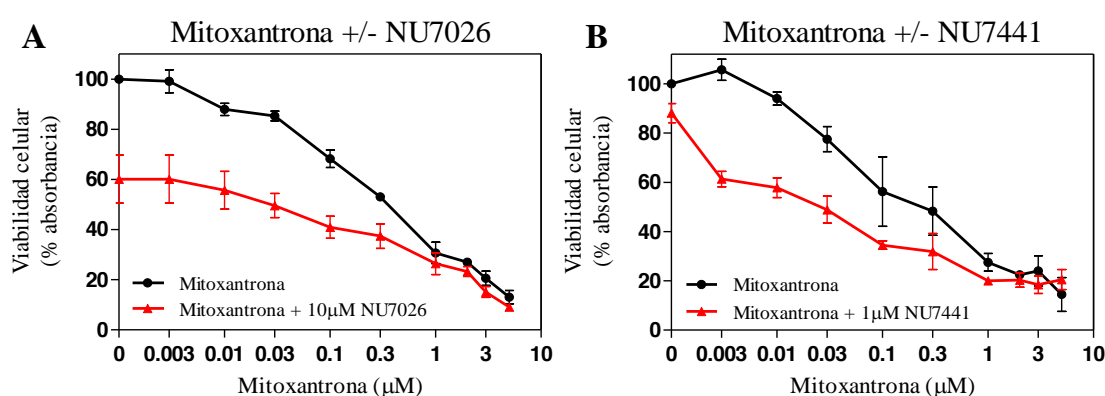


Figura 5.20. Efecto de la combinación de mitoxantrona con NU7026 ó NU7441. Curvas dosis-respuesta de células PC-3 tratadas con distintas concentraciones de mitoxantrona (0,003-5 µM) en presencia o ausencia de: A) NU7026 10 µM ó B) NU7441 1µM durante 72 horas, obtenidas mediante el ensayo de reducción del MTT. En las gráficas se representa el porcentaje de células viables o metabólicamente activas, medido como tanto por cierto de absorbancia con respecto a las células control. Las barras representan el error estándar de la media.

| Mitoxantrona EC50 (µM) | Mitoxantrona + NU7026 EC50 (µM) | Mitoxantrona + NU7441 EC50 (µM) |
|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 0,36 +/- 0,04 | 0,03 +/- 0,02 ^{P=0,0047} | 0,02 +/- 0,01 ^{P=0,0031} |

Tabla 5.5. Valores de EC50 calculados para mitoxantrona en solitario o en combinación con NU7026 y NU7441. Valores de EC50 para mitoxantrona en presencia o ausencia de NU7026 y NU7441, determinados a partir de los porcentajes de células viables obtenidos en los ensayos de reducción del MTT mediante el programa *CompuSyn*. En la tabla se representan los valores de EC50 obtenidos +/- el error estándar de la media.

Por último, se evaluó el efecto del tratamiento combinado de doxorubicina con los inhibidores de DNA-PK. Para ello, se incubaron células PC-3 con concentraciones crecientes del fármaco (0,003-5 µM) en presencia o ausencia de NU7026 10 µM o NU7441 1 µM. Tras determinarse el porcentaje de células viables a las distintas concentraciones ensayadas, los valores de EC50 calculados se recogieron en la Tabla 5.6. Aunque en las curvas dosis-

respuesta se observó una disminución en el número de células metabólicamente activas en el tratamiento combinado con NU7026 (Figura 5.21, A), con diferencias significativas desde 0,003 μM hasta 0,1 μM ($p < 0,05$), los valores de EC50 para la doxorrubicina y para el tratamiento combinado no mostraron diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, la reducción en el número de células viables observada en el tratamiento combinado con NU7441 (Figura 5.21, B) solamente resultó significativa a la concentración de 0,03 μM ($p < 0,05$). Los valores de EC50 para la doxorrubicina y para doxorrubicina + NU7441, en este caso, tampoco mostraron diferencias significativas.

De igual manera, se evaluó el efecto del tratamiento combinado con el inhibidor de ATM, en células tratadas con concentraciones crecientes de doxorrubicina (0,003-5 μM) en presencia o ausencia de KU55933 10 μM (Figura 5.21, C). De nuevo, se observó una reducción de la viabilidad celular a concentraciones bajas de doxorrubicina, pero, los valores de EC50 calculados no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 5.6).

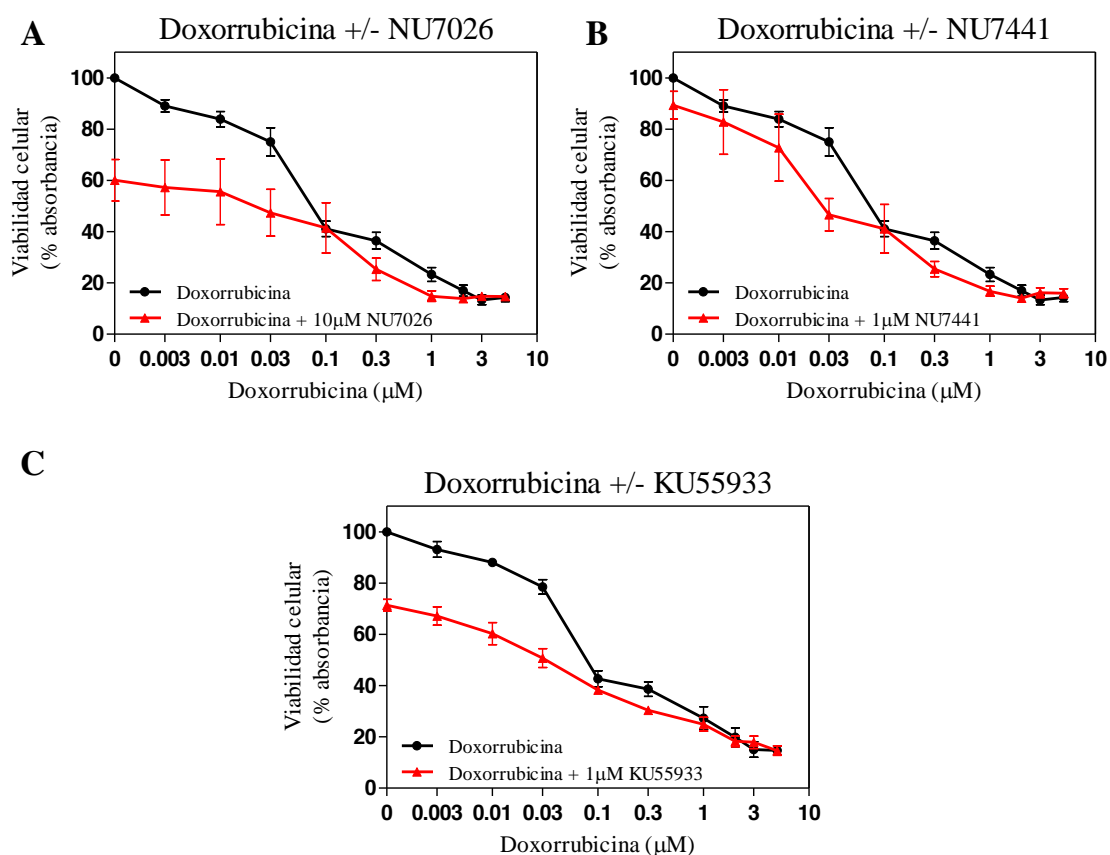


Figura 5.21. Efecto de la combinación de doxorrubicina con NU7026, NU7441 ó KU55933. Curvas dosis-respuesta de células PC-3 tratadas con distintas concentraciones de doxorrubicina (0,003-5 μM) en presencia o ausencia de: A) NU7026 10 μM , B) NU7441 1 μM , C) KU55933 10 μM durante 72 horas,

obtenidas mediante el ensayo de reducción del MTT. En las gráficas se representa el porcentaje de células viables con respecto a las células control. Las barras representan el error estándar de la media.

| Doxorrubicina EC50 (μM) | Doxorrubicina + NU7026 EC50 (μM) | Doxorrubicina + NU7441 EC50 (μM) | Doxorrubicina + KU55933 EC50 (μM) |
|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 0,14 +/- 0,03 | 0,03 +/- 0,02 ^{ns} | 0,03 +/- 0,01 ^{ns} | 0,03 +/- 0,01 ^{ns} |

Tabla 5.6. Valores de EC50 calculados para la doxorrubicina en solitario o en combinación con NU7026, NU7441 ó KU55933. Valores de EC50 para la doxorrubicina en presencia o ausencia de NU7026, NU7441 ó KU55933, determinados a partir de los porcentajes de células viables obtenidos en los ensayos de reducción del MTT mediante el programa *CompuSyn*. En la tabla se representan los valores de EC50 obtenidos +/- el error estándar de la media. ns= no significativo.

5.4.2. Efecto de la combinación de vincristina y paclitaxel con inhibidores de DNA-PK en la viabilidad celular

También hemos estudiado el efecto de inhibidores de DNA-PK en células tratadas simultáneamente con fármacos antimitóticos.

Para ello, se incubaron células PC-3 durante 72 horas con concentraciones crecientes de vincristina (1-100 nM) en presencia o ausencia de NU7026 10 μM ó NU7441 1 μM. Tras determinarse el porcentaje de células viables a las distintas concentraciones ensayadas (Figura 5.22), los valores de EC50 calculados se recogieron en la Tabla 5.7. Según estos valores, el NU7026 aumenta la citotoxicidad de la vincristina 44 veces (EC50 en presencia de NU7026 = 0,03+/-0,01; P=0,0025) y el NU7441, 3,5 veces (EC50 en presencia de NU7441 = 0,38+/-0,03; P=0,0085). Estos datos muestran que NU7026 y NU7441 incrementan el efecto citotóxico de la vincristina en células PC-3.

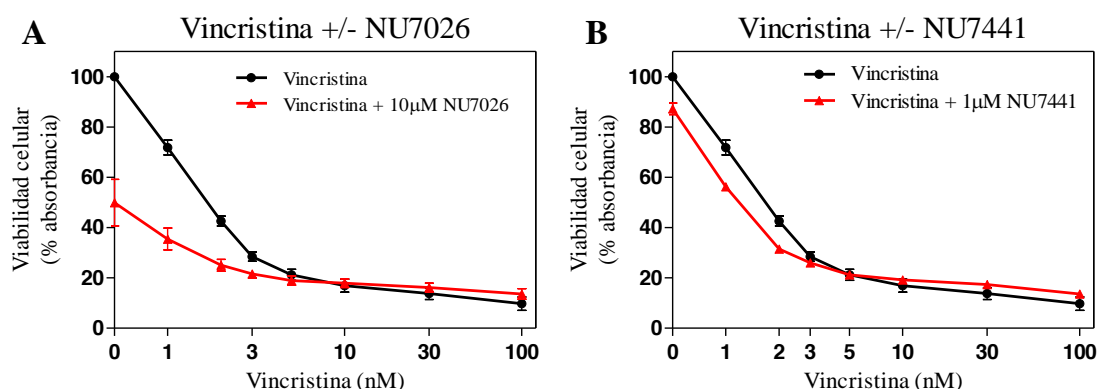


Figura 5.22. Efecto de la combinación de vincristina con NU7026 ó NU7441. Curvas dosis-respuesta de células PC-3 tratadas con distintas concentraciones de vincristina (1-100 nM) en presencia o ausencia de: A) NU7026 10 μM ó B) NU7441 1 μM, durante 72 horas, obtenidas mediante el ensayo de reducción del MTT. En las gráficas se representa el porcentaje de células viables con respecto a las células control. Las barras representan el error estándar de la media.

| Vincristina EC50 (μM) | Vincristina + NU7026 EC50 (μM) | Vincristina + NU7441 EC50 (μM) |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1,33 +/- 0,14 | 0,03 +/- 0,01 ^{P=0,0025} | 0,38 +/- 0,03 ^{P=0,0085} |

Tabla 5.7. Valores de EC50 calculados para la vincristina en solitario o en combinación con NU7026 y NU7441. Valores de EC50 para vincristina en presencia o ausencia de NU7026 y NU7441, determinados a partir de los porcentajes de células viables obtenidos en los ensayos de reducción del MTT mediante el programa *CompuSyn*. En la tabla se representan los valores de EC50 obtenidos +/- el error estándar de la media.

De igual manera, se evaluó el efecto del tratamiento combinado de paclitaxel con los inhibidores de DNA-PK. Para ello, se incubaron células PC-3 con concentraciones crecientes del fármaco (1-100 nM) en presencia o ausencia de NU7026 10 μM o NU7441 1 μM (Figura 5.23). Se puede observar que el NU7026 tiene un efecto citotóxico adicional a bajas concentraciones de paclitaxel mientras que no se observa efecto del NU7441. Al calcular los valores de EC50 (Tabla 5.8), los resultados mostraron que no hay diferencias estadísticamente significativas ni en un caso ni en otro.

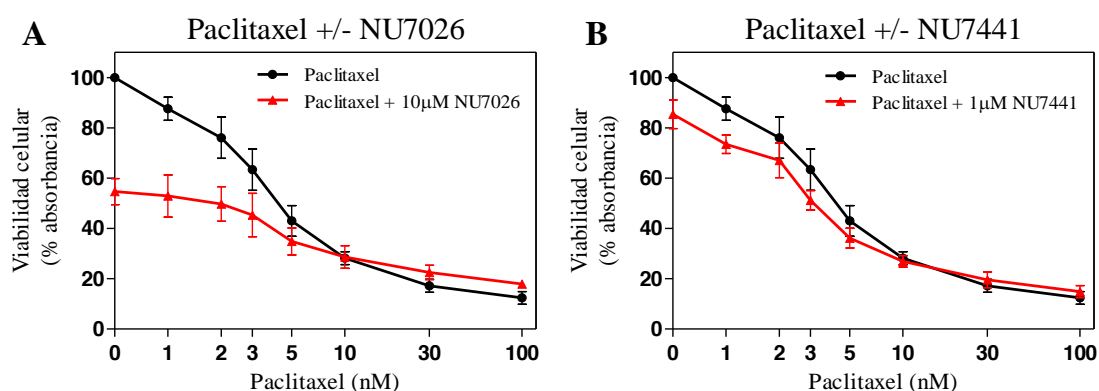


Figura 5.23. Efecto de la combinación de paclitaxel con NU7026 ó NU7441. Curvas dosis-respuesta de células PC-3 tratadas con distintas concentraciones de paclitaxel (1-100 nM) en presencia o ausencia de: A) NU7026 10 μM ó B) NU7441 1 μM, durante 72 horas, obtenidas mediante el ensayo de reducción del MTT. En las gráficas se representa el porcentaje de células viables o metabólicamente activas, medido como tanto por cierto de absorbancia con respecto a las células control. Las barras representan el error estándar de la media.

| Paclitaxel EC50 (μM) | Paclitaxel + NU7026 EC50 (μM) | Paclitaxel + NU7441 EC50 (μM) |
|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 5,87 +/- 0,77 | 1,98 +/- 1,09 ^{ns} | 3,65 +/- 0,67 ^{ns} |

Tabla 5.8. Valores de EC50 calculados para el paclitaxel en solitario o en combinación con NU7026 y NU7441. Valores de EC50 para el paclitaxel en presencia o ausencia de NU7026 y NU7441, determinados a partir de los porcentajes de células viables obtenidos en los ensayos de reducción del MTT mediante el programa *CompuSyn*. En la tabla se representan los valores de EC50 obtenidos +/- el error estándar de la media.

En conclusión, los datos expuestos en este apartado y en el anterior indican que la inhibición de DNA-PK potencia los efectos citotóxicos de la mitoxantrona y de la vincristina en células PC-3. Por eso, decidimos seleccionar la mitoxantrona como el agente para realizar ensayos posteriores sobre estudio del efecto de las combinaciones con los inhibidores de DNA-PK.

5.4.3. La combinación de mitoxantrona con NU7026 ó NU7441 produce un efecto sinérgico

El siguiente paso fue analizar si la combinación de mitoxantrona con NU7026 ó NU7441 tiene efecto antagonista, aditivo o sinérgico. Para ello, se incubaron células PC-3 tratadas durante 72 horas con diferentes combinaciones de mitoxantrona y NU7026 ó mitoxantrona y NU7441, a una relación constante de 1:10 en el primer caso y 1:2 en el segundo. Los rangos de las concentraciones utilizadas para cada compuesto se basaron en los ensayos de viabilidad celular anteriores. A partir de los resultados obtenidos, se aplicó el método de Chou-Talalay y la “ecuación del efecto medio” para obtener los Índices de Combinación (CI) correspondientes a cada una de las combinaciones realizadas.

Como se muestra en la Figura 5.24, en las células tratadas con la combinación de mitoxantrona y NU7026 (A) se aprecia un efecto sinérgico, con índices de combinación por debajo de 0,9. Los índices de combinación obtenidos para el tratamiento de mitoxantrona y NU7441 (B) también se encuentran en el rango del sinergismo, mostrando solamente una tendencia hacia el antagonismo en la combinación con la concentración más elevada de cada fármaco.

Estos ensayos también se realizaron con diferentes combinaciones de doxorrubicina y NU7026 ó NU7441 a una relación constante de 1:10 en el primer caso y 1:2 en el segundo, en los que se observó un efecto sinérgico a bajas concentraciones de doxorrubicina (datos no mostrados).

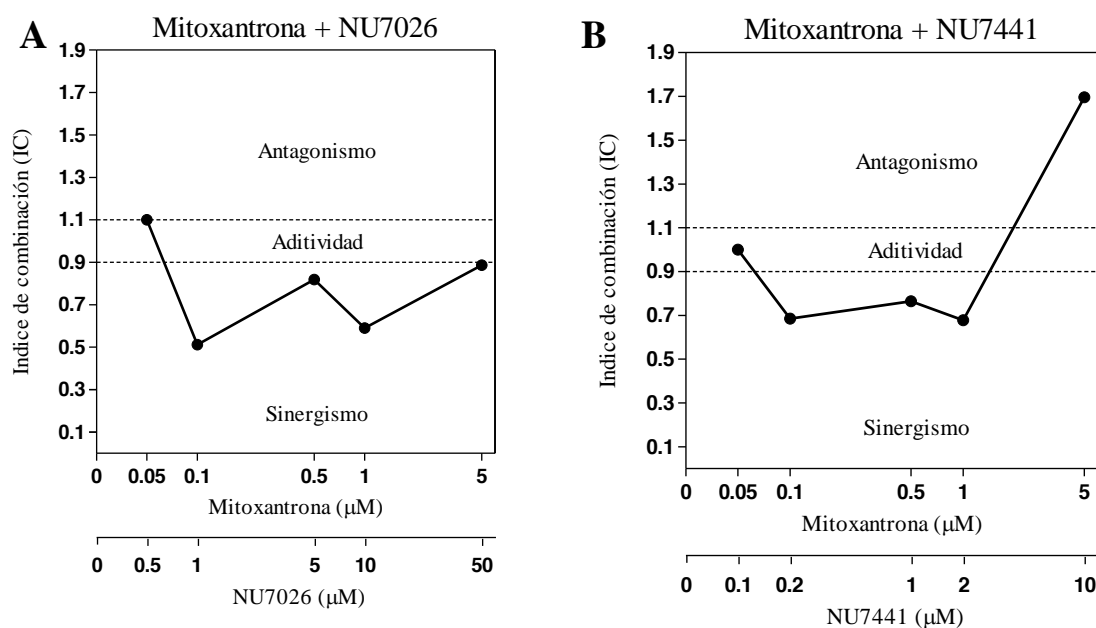


Figura 5.24. Índices de combinación para las combinaciones de mitoxantrona con NU7026 ó NU7441. Representación gráfica de los índices de combinación obtenidos a partir del método de Chou-Talalay y la “ecuación del efecto medio” para las combinaciones de mitoxantrona (0,05-5 μM) con NU7026 (0,5-50 μM) ó con NU7441 (0,1-10 μM). Se muestran los intervalos entre los cuales se considera antagonismo (CI > 1,1); aditividad (CI entre 0,9 y 1,1) ó sinergismo (CI < 0,9).

5.4.4. Efecto de la combinación de mitoxantrona con NU7026, NU7441 ó KU55933 en el ciclo celular

Como hemos demostrado en el apartado 5.1.2., la mitoxantrona produce un bloqueo del ciclo celular en la fase S. Para estudiar el efecto de la combinación de mitoxantrona con estos inhibidores, se trataron células PC-3 con mitoxantrona 0,1 ó 0,3 μM en presencia o ausencia de NU7026 10 μM, NU7441 1 μM ó KU55933 10 μM durante 24 horas. Asimismo se trataron células PC-3 con los inhibidores en solitario a las mismas concentraciones y tiempo. Los resultados, analizados por citometría de flujo, están recogidos en: Tabla 5.9, Tabla 5.10 y Tabla 5.11.

Tras 24 horas de exposición (el equivalente a un ciclo celular), la mitoxantrona 0,1 μM produjo una acumulación de células en fase G₂/M (datos no mostrados), y este efecto fue más pronunciado tras el tratamiento con mitoxantrona 0,3 μM, bloqueando el ciclo celular en fase S con un 41,8% de células en esta fase (Tabla 5.9). En combinación con NU7026, el porcentaje de células acumuladas en fase S aumentó de un 41,8% a un 46,2%. Además, el porcentaje de células en fase G₀/G₁ incrementó de un 6,2% a un 15,9%. En combinación con NU7441 (Tabla 5.10), el porcentaje de células en fase G₀/G₁ aumentó de manera muy similar, de un 6,2% a un 14,5%.

| Fase del ciclo celular | Control | NU7026 | Mitoxantrona 0,3 μ M | Mitoxantrona + NU7026 |
|----------------------------------|---------|--------|-----------------------------|--------------------------|
| % G ₀ /G ₁ | 38,5 | 55,7 | 6,2 | 15,9 |
| % S | 23,2 | 14,8 | 41,8 | 46,2 |
| % G ₂ /M | 31,7 | 15,9 | 34,6 | 22,7 |

Tabla 5.9. Efecto de la combinación de mitoxantrona y NU7026 en el ciclo celular. En la tabla se recogen los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular (G₀/G₁, S y G₂/M) de células tratadas durante 24 horas con NU7026 10 μ M y de células tratadas con mitoxantrona 0,3 μ M en ausencia o presencia de dicho inhibidor, recogidas y analizadas por citometría de flujo.

| Fase del ciclo celular | Control | NU7441 | Mitoxantrona 0,3 μ M | Mitoxantrona + NU7441 |
|----------------------------------|---------|--------|-----------------------------|--------------------------|
| % G ₀ /G ₁ | 38,5 | 38,5 | 6,2 | 14,5 |
| % S | 23,2 | 22,5 | 41,8 | 39,9 |
| % G ₂ /M | 31,7 | 22,7 | 34,6 | 29,5 |

Tabla 5.10. Efecto de la combinación de mitoxantrona y NU7441 en el ciclo celular. En la tabla se recogen los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular (G₀/G₁, S y G₂/M) de células tratadas durante 24 horas con NU7441 1 μ M y de células tratadas con mitoxantrona 0,3 μ M en ausencia o presencia de dicho inhibidor, recogidas posteriormente y analizadas por citometría de flujo.

Por otra parte, la combinación con KU55933 (Tabla 5.11) incrementó el porcentaje de células en fase G₀/G₁ de un 6,2% a un 15,6%, y el porcentaje de células en G₂/M de un 34,6% a un 41,8%. Estos resultados indican que los efectos de NU7026, NU7441 y KU55933 y la mitoxantrona sobre el ciclo celular se ejercen con cierta independencia.

| Fase del ciclo celular | Control | KU55933 | Mitoxantrona 0,3 μ M | Mitoxantrona + KU55933 |
|----------------------------------|---------|---------|-----------------------------|---------------------------|
| % G ₀ /G ₁ | 38,5 | 50,0 | 6,2 | 15,6 |
| % S | 23,2 | 17,9 | 41,8 | 29,3 |
| % G ₂ /M | 31,7 | 18,2 | 34,6 | 41,8 |

Tabla 5.11. Efecto de la combinación de mitoxantrona y KU55933 en el ciclo celular. En la tabla se recogen los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular (G₀/G₁, S y G₂/M) de células tratadas durante 24 horas con KU55933 10 μ M y de células tratadas con mitoxantrona 0,3 μ M en ausencia o presencia de dicho inhibidor, recogidas y analizadas por citometría de flujo.

5.4.5. Efecto de la combinación de fármacos en el DNA

Como hemos descrito anteriormente, la mitoxantrona genera roturas en el DNA mientras que los inhibidores de los sistemas de reparación no. Por ello, se realizaron

experimentos para evaluar si el incremento en el efecto citotóxico observado en los ensayos de viabilidad celular tras la inhibición de DNA-PK es resultado de un incremento en la cantidad de roturas en el DNA.

Para ello, se trataron células PC-3 durante 24 horas con concentraciones crecientes de mitoxantrona (0,1-2 μM) (elegidas a partir de los ensayos de viabilidad celular) en presencia ó ausencia de NU7026 10 μM ó NU7441 1 μM y se llevaron a cabo análisis de cometa en condiciones alcalinas. Como se observa en la Figura 5.25, las células tratadas con mitoxantrona presentan colas de cometas largas y visibles que son mayores a medida que aumenta la concentración del fármaco. Cuando el tratamiento se hizo simultáneamente con NU7026 (Figura 5.25) ó con NU7441, se observó un leve incremento en la longitud de las colas observadas pero solamente a concentraciones bajas de mitoxantrona y en general sin significación estadística (Figura 5.25, Figura 5.26).

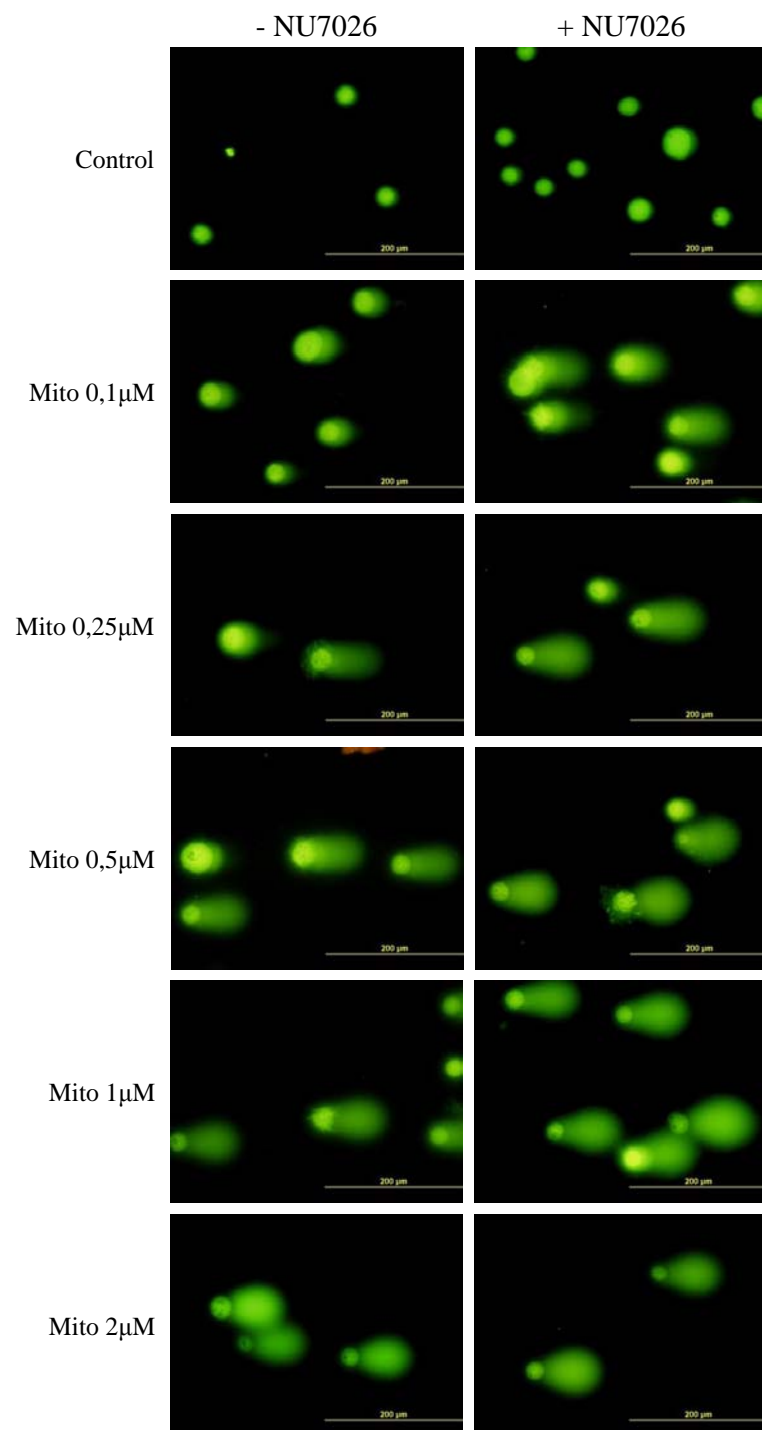


Figura 5.25. Efecto de la mitoxantrona en presencia o ausencia de NU7026 tras el ensayo cometa alcalino. Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de células PC-3 tratadas durante 24 horas con concentraciones crecientes de mitoxantrona (0,1-2 μ M) en presencia (+) o ausencia (-) de NU7026 10 μ M. Las células fueron sometidas a lisis, desnaturalización del DNA, electroforesis en condiciones alcalinas y teñidas posteriormente con *SYBR Green*. Mito: mitoxantrona.

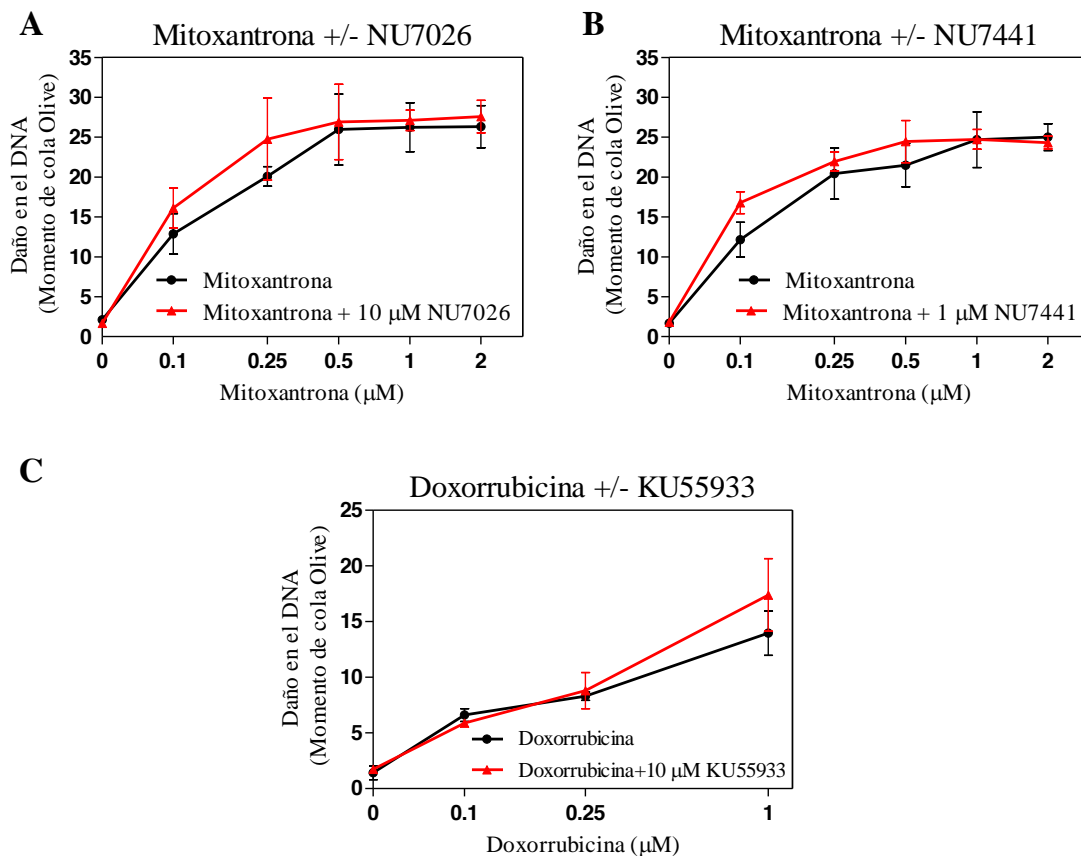


Figura 5.26. Valores del *momento de cola Olive* obtenidos tras el ensayo cometa alcalino de células tratadas con mitoxantrona en presencia o ausencia de NU7026 y NU7441; y con doxorubicina en presencia o ausencia de KU55933. A y B) Representación gráfica de los valores del *momento de cola Olive* obtenidos tras la cuantificación de la señal de fluorescencia de cada célula mediante el programa *Komet 5.0*, de células tratadas durante 24 horas con: A) mitoxantrona (0,1-2 μM) en presencia o ausencia de NU7026 10 μM ; B) mitoxantrona (0,1-2 μM) en presencia o ausencia de NU7441 1 μM ; C) doxorubicina (0,1, 0,25 ó 1 μM) en presencia o ausencia de KU55933 10 μM . Los datos representan la media +/- SEM de experimentos realizados al menos en duplicado.

En un ensayo similar en que se estudió el efecto de la doxorubicina con y sin el inhibidor de la ATM KU55933 se obtuvo un resultado parecido. Es decir, la doxorubicina puede inducir roturas en el DNA que son alteradas levemente por la presencia de KU55933 (Figura 5.26, C).

Otra forma de medir la generación de roturas en el DNA es la formación de γH2AX . Las dobles roturas del DNA generadas por radiaciones gamma o por otros agentes inducen la rápida fosforilación de la histona H2AX en Ser139, para formar acúmulos de γH2AX en torno a las regiones donde se localizan las roturas. Esta fosforilación está mediada por los tres miembros principales de la familia PIKK: ATM (Burma et al, 2001; Wang et al, 2005), ATR (Anderson et al, 2001; Chanoux et al, 2009) y DNA-PKcs (An et al, 2010; Park et al, 2003). Los acúmulos de γH2AX formados son esenciales para el reconocimiento y reparación del

daño en el DNA, ya que reclutan proteínas como BRCA1, 53BP1 ó MDC1 para iniciar la reparación. Tras marcar los sitios de daño, la desfosforilación de γ H2AX es necesaria para liberar las proteínas reclutadas y completar el proceso de reparación.

Está documentado que la doxorubicina y la radiación ionizante inducen la formación de γ H2AX en líneas tumorales de próstata (Shaheen et al, 2011). Para estudiar si en las células PC-3 el tratamiento combinado de doxorubicina y NU7441 incrementa los niveles de γ H2AX con respecto al tratamiento con doxorubicina, se trataron células con doxorubicina 1 μ M en ausencia o presencia de NU7441 1 μ M durante 1, 4, 8 y 24 horas. Los extractos fueron recogidos y se realizó un análisis Western de la proteína H2AX fosforilada en Ser139. Como se muestra en la Figura 5.27, los niveles de γ H2AX aumentan progresivamente hasta las 8 horas tras el tratamiento con doxorubicina. A partir de ese punto la señal se reduce aunque continúa siendo mayor que en el control. El tratamiento con doxorubicina y NU7441 no indujo cambios significativos en la acumulación de γ H2AX.

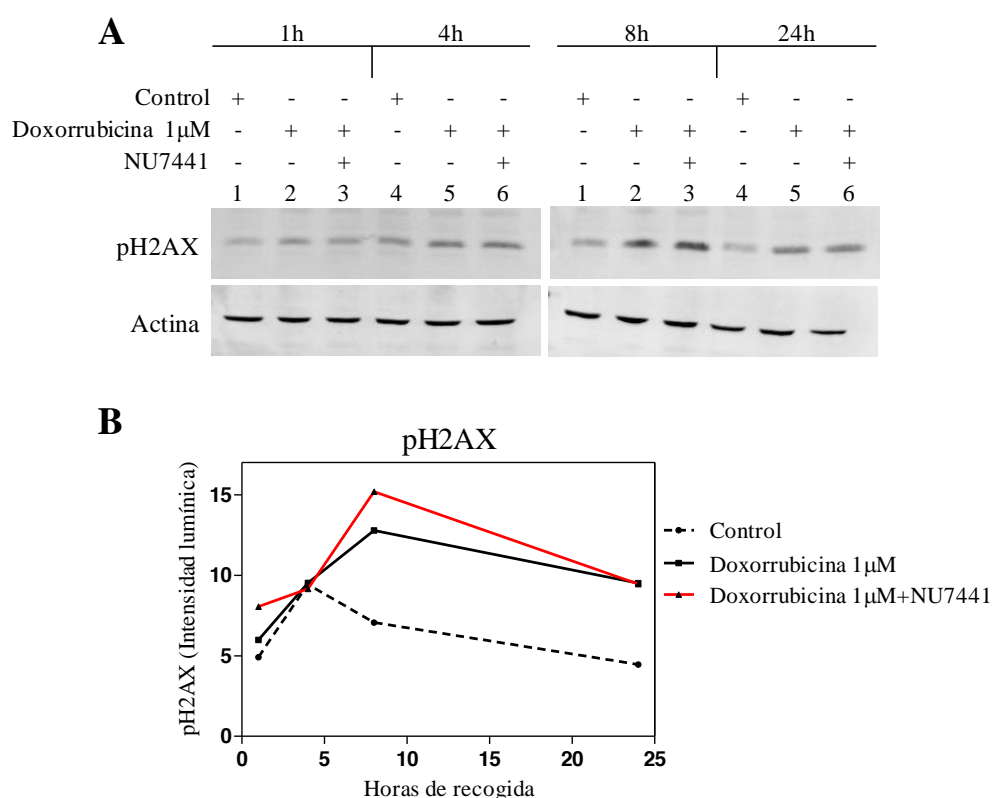


Figura 5.27. Estudio de H2AX fosforilada en células tratadas con doxorubicina en presencia o ausencia de NU7441. A) Análisis Western de H2AX fosforilada en Ser139, utilizando actina como control de carga, en células tratadas durante 1, 4, 8 ó 24 horas con doxorubicina 1 μ M en presencia o ausencia de NU7441 1 μ M. B) Cuantificación de las bandas de pH2AX.

Como hemos comentado anteriormente, ATM, ATR y DNA-PKcs tienen el potencial de fosforilar a H2AX, habiendo evidencia de que cada una de ellas lleva a cabo esta fosforilación cuando las otras están genéticamente comprometidos (Andegeko et al, 2001; Burma et al, 2001; Stiff et al, 2004; Wang et al, 2005). Entre estas quinasas, la ATM parece la más adecuada para la fosforilación de H2AX, por su capacidad de activarse por modificaciones inmediatas de la cromatina asociadas con roturas en el DNA (Bakkenist & Kastan, 2003).

Para evaluar si ATM está implicada en la fosforilación de H2AX, se trataron células con doxorubicina 1 μM en ausencia o presencia de NU7441 1 μM ó de KU55933 10 μM . En la Figura 5.28 se muestra el análisis Western de γH2AX y H2AX tras un tratamiento de 6 horas. De acuerdo con lo descrito anteriormente, el tratamiento con doxorubicina y NU7441 indujo un leve aumento de γH2AX respecto a las células tratadas con doxorubicina solamente. En cambio, en presencia de KU55933, los niveles de γH2AX disminuyeron considerablemente. Los resultados cuando se usó el otro inhibidor de DNA-PK (NU7026) fueron similares (datos no mostrados). Estos datos sugieren que ATM podría ser la principal quinasa responsable de la fosforilación de H2AX.

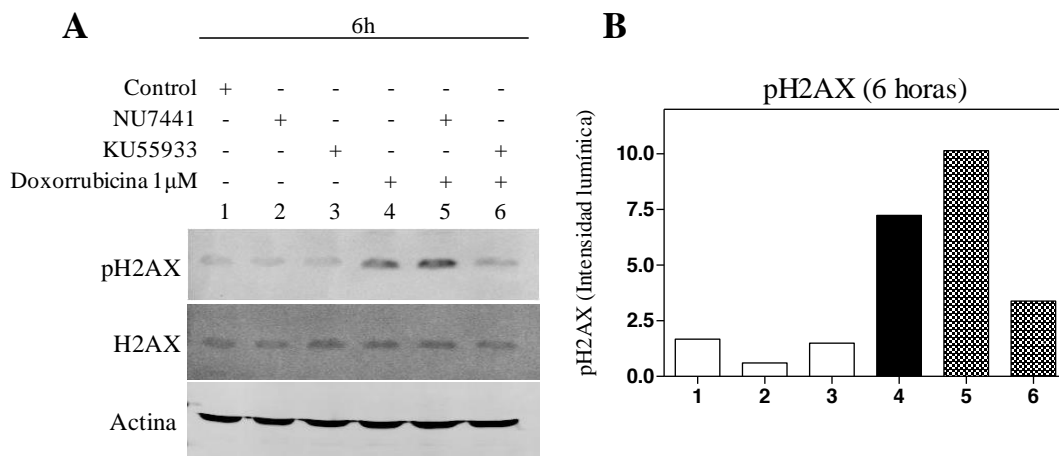


Figura 5.28. Estudio de H2AX y H2AX fosforilada en Ser139 en células tratadas con doxorubicina en presencia o ausencia de NU7441 ó KU55933. A) Análisis Western de H2AX y H2AX fosforilada en Ser139, utilizando actina como control de carga, en células tratadas durante 6 horas con doxorubicina 1 μM en presencia o ausencia de NU7441 1 μM ó KU55933 10 μM . B) Cuantificación de las bandas de H2AX y pH2AX.

5.4.6. NU7026 y NU7441 inhiben la reparación de los daños inducidos en el DNA por la mitoxantrona

El ensayo cometa se utilizó para evaluar la reparación del daño inducido por la mitoxantrona en el DNA.

La cinética de la reparación fue evaluada en células tratadas con mitoxantrona 0,25 μM durante 24 horas, lavadas posteriormente y observada su reparación durante 1, 4 y 24 horas. Durante este tiempo de reparación, las células estuvieron en presencia y en ausencia de NU7026 10 μM ó NU7441 1 μM . La concentración de mitoxantrona utilizada había sido establecida previamente como citotóxica e inductora de roturas.

Tras 24 horas de tratamiento con mitoxantrona (tiempo 0 h de reparación), las células presentaron en ambos casos un nivel inicial muy similar de daño en el DNA, con valores medios del *momento de la cola* de 18,0 en el primer caso (Figura 5.29, A) y 16,6 en el segundo (Figura 5.29, B). Tras la retirada de la mitoxantrona, en las células crecidas en ausencia de NU7026 (Figura A), se observó una reparación progresiva de las roturas, quedando tras 24 horas de la retirada del fármaco un 37% del daño generado inicialmente, y reparándose por tanto un 63%. En presencia de NU7026 (Figura A), sin embargo, se observaron niveles altos de roturas en todos los puntos de tiempo analizados, reparándose solamente un 36% del daño inicial tras 24 horas. En las células crecidas en ausencia de NU7441 (Figura B), se reparó el 64% del daño generado inicialmente por la mitoxantrona tras 24 horas de la retirada del fármaco. Sin embargo, en presencia del NU7441 persistieron las dobles roturas, reparándose tan sólo un 27% del daño inicial.

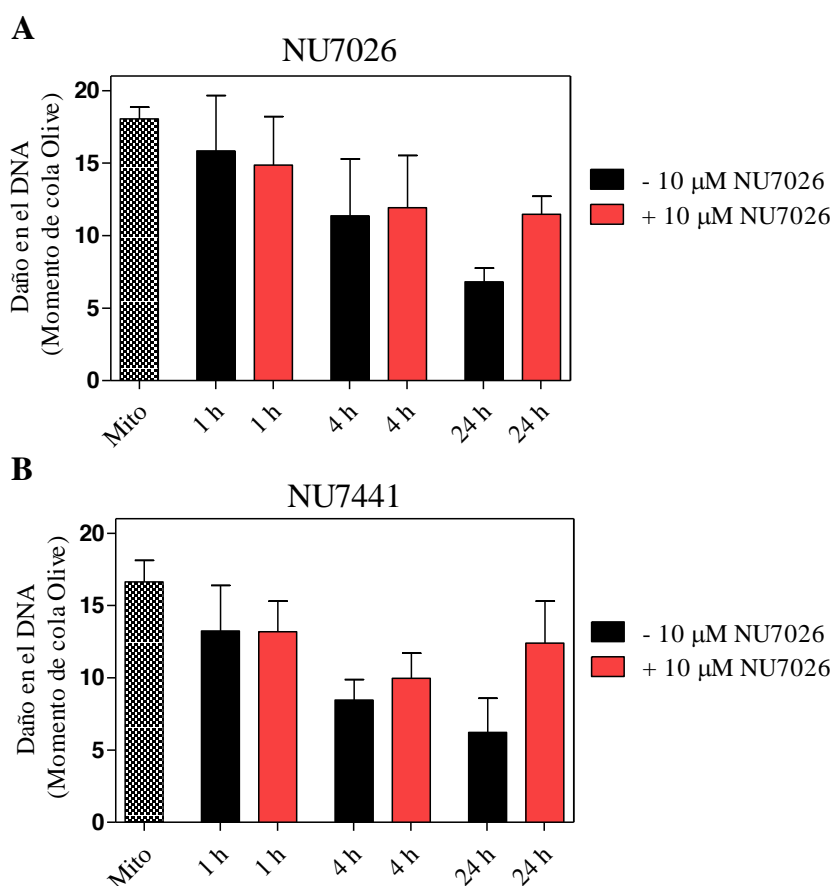


Figura 5.29. Valores del *momento de cola Olive* obtenidos tras el ensayo cometa alcalino de células tratadas con mitoxantrona y reparadas durante 1, 4 y 24 horas, en presencia o ausencia de NU7026 ó NU7441. Representación gráfica de los valores del *momento de cola Olive* obtenidos tras la cuantificación de la señal de fluorescencia de células tratadas durante 24 horas con mitoxantrona 0,25 μ M, lavadas posteriormente y observada su reparación durante 1, 4 y 24 horas. Durante este tiempo de reparación, las células estuvieron: A) en presencia o en ausencia de NU7026 10 μ M; B) en presencia o en ausencia de NU7441 1 μ M. Los datos representan la media \pm SEM de experimentos realizados al menos en duplicado.

5.4.7. NU7026 inhibe parcialmente el sistema de recombinación homóloga (HR)

Las dobles roturas del DNA conducen, como hemos comentado, a la rápida fosforilación de la histona H2AX en Ser139 en torno a las regiones dañadas. Estos acúmulos de γ H2AX son esenciales para el reconocimiento y reparación del daño en el DNA, reclutándose proteínas de respuesta al daño para iniciar la reparación. Otras proteínas, como NBS, CHK2, SMC1, Rad51 o Rad50 se colocan con γ H2AX. Durante la recombinación homóloga (HR), Rad51 forma una nucleoproteína para el reconocimiento de la hebra dañada. Por tanto, la detección de acúmulos de Rad51 puede utilizarse para evaluar la actividad de reparación por HR. Se ha sugerido que, cuando la DNA-PK está defectuosa o inhibida, las

células son más dependientes del sistema de HR para reparar las roturas de doble cadena en el DNA (Shrivastav et al, 2009).

Para evaluar el impacto de NU7026 sobre el sistema de reparación HR medido a través de la formación de acúmulos de Rad51, se trataron células PC-3 durante tiempo variable con mitoxantrona 0,3 μ M en presencia o ausencia de NU7026 10 μ M. Los extractos fueron recogidos y se realizó un análisis Western de la proteína Rad51. Como se muestra en la Figura 5.30, la señal de Rad51 aumentó a lo largo del tiempo en las células tratadas con mitoxantrona, mientras que el tratamiento combinado con NU7026 inhibió en gran medida la señal de Rad51.

Estas observaciones sugieren que, en presencia de NU7026, DNA-PK permanece unida a las roturas, obstruyendo el acceso de otras proteínas reparadoras, como Rad51, e interfiriendo en la reparación del sistema HR puesto en marcha.

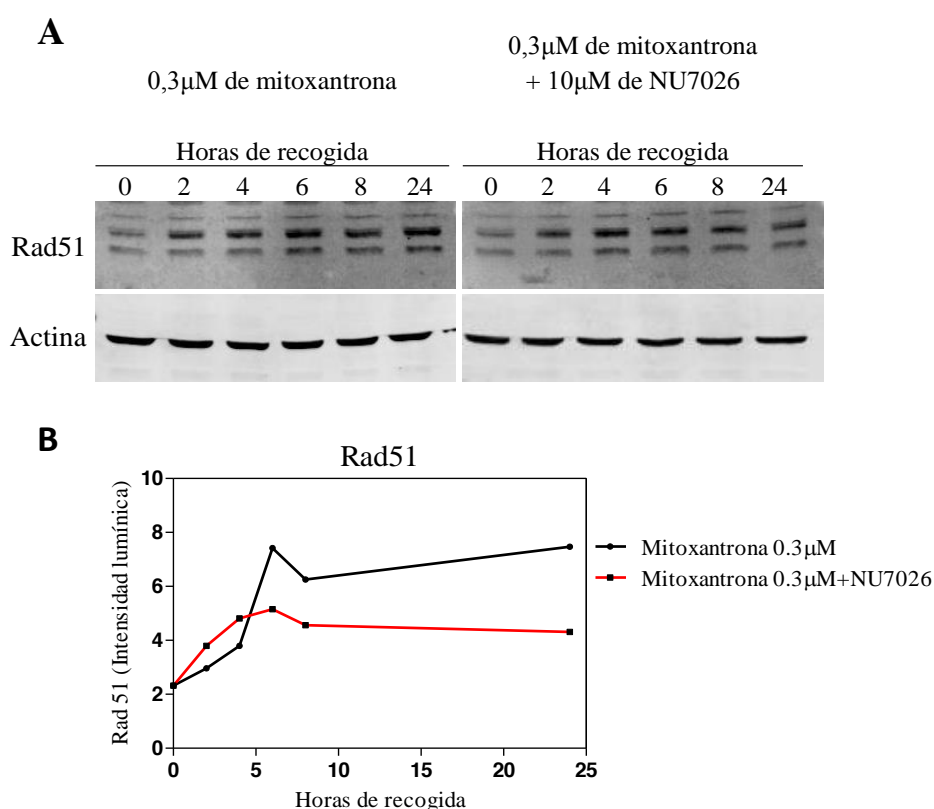


Figura 5.30. Estudio de Rad51 en células tratadas con mitoxantrona en presencia o ausencia de NU7026. A) Análisis Western de la proteína Rad51, utilizando actina como control de carga, en células tratadas durante 2, 4, 6, 8 y 24 horas con mitoxantrona 0,3 μ M en presencia o ausencia de NU7026 10 μ M. B) Cuantificación de las bandas de Rad51.

5.4.8. La inhibición de DNA-PK inhibe parcialmente la fosforilación de Chk2

DNA-PK, ATM y ATR son los tres miembros principales de la familia de las PIKK, que desempeñan un papel principal en las respuestas celulares al daño en el DNA. En respuesta a las dobles roturas, ATM y ATR bloquean la progresión del ciclo celular a través de la activación de puntos de señalización, y ambos inician diferentes vías dependiendo del daño inducido. Cuando se inducen dobles roturas por radiación ionizante en las células, la activación de ATM inicia una señal de control del ciclo celular a través de la fosforilación de Chk2 en T68, convirtiendo así a Chk2 en una proteína de respuesta al daño en el DNA. Se ha demostrado que la inactivación de algunas proteínas asociadas a los puntos de control del ciclo celular, como Chk2, BRCA1, BRCA2 o Plk1, puede facilitar la inducción de catástrofe mitótica en las células (Shang et al, 2010).

La DNA-PK ha sido identificada como una enzima importante de la reparación de las roturas de doble cadena mediada por NHEJ. Sin embargo, parece estar también involucrada en el mantenimiento de la estabilidad del huso mitótico y la regulación negativa de la catástrofe mitótica en respuesta a la radiación ionizante. Varios estudios han puesto de manifiesto que la inactivación de DNA-PK en condiciones de daño en el DNA resulta en un fenotipo de husos mitóticos multipolares y catástrofe mitótica. En este contexto, existe la hipótesis de que DNA-PK está funcionalmente asociada a Chk2, en el mantenimiento de la estabilidad de la formación del huso. En nuestro trabajo, hemos querido evaluar si la inhibición de DNA-PK afecta a la activación de Chk2.

Para ello, hemos analizado en primer lugar los niveles de pChk2 en células PC-3 tratadas con mitoxantrona 0,3 μ M. Los tratamientos se llevaron a cabo durante 2, 4, 6, 8 y 24 horas. Los extractos fueron recogidos y se realizó un análisis Western de Chk2 fosforilada en T68. Como se muestra en la Figura 5.31, tras el tratamiento con mitoxantrona la señal de pChk2 fue detectada tan pronto como a las 2h, tiempo en el cual se observaron los niveles máximos. De 2 h en adelante se observó una disminución en la señal de la fosfoproteína, indicando una disminución de su activación y sugiriendo una reparación del daño en el DNA.

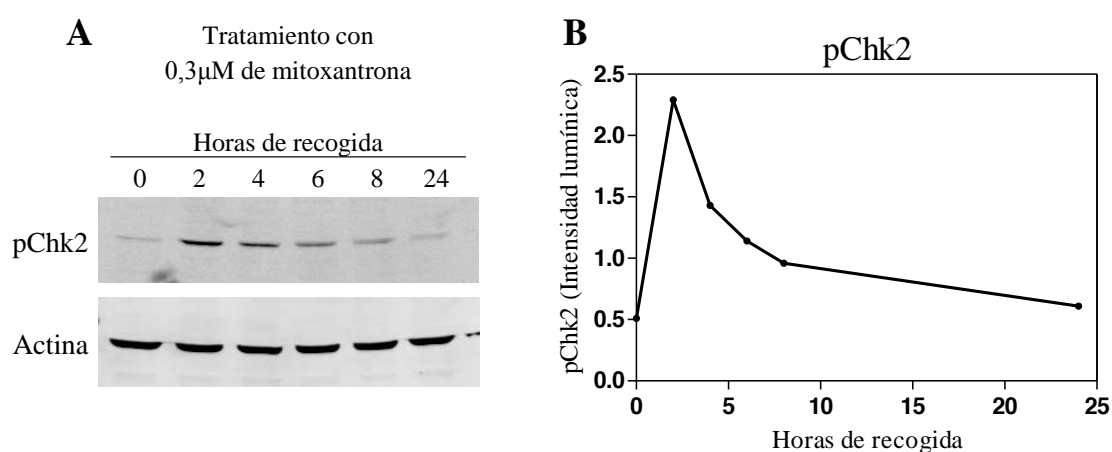


Figura 5.31. Estudio de la fosforilación de Chk2 en respuesta al tratamiento con mitoxantrona. A) Análisis Western de pChk2 en T68, utilizando actina como control de carga, en células PC-3 tratadas durante 2, 4, 6, 8 y 24 horas con mitoxantrona 0,3 μM. B) Cuantificación de las bandas de pChk2.

A continuación, se trataron células con mitoxantrona 0,1 ó 0,3 μM en presencia o ausencia de KU55933 10 μM ó NU7441 1 μM. Los tratamientos se realizaron durante 6 horas, tiempo en el que se había observado inducción de pH2AX tras el tratamiento con mitoxantrona.

En la Figura 5.32 se muestra el análisis Western de pChk2. Los resultados mostraron, en primer lugar, niveles elevados de la señal de pChk2 tras el tratamiento con ambas concentraciones de mitoxantrona, especialmente a la concentración de 0,1 μM. Tras un tratamiento combinado con KU55933 ó con ambos inhibidores (Ku55933+NU7441), se observó una fuerte disminución de los niveles de la fosfoproteína, indicativo de que ATM sería la principal quinasa responsable de la fosforilación de Chk2. Sin embargo, y tras el tratamiento combinado con NU7441 y por tanto con ATM activa, se observó también una disminución de la señal de pChk2, sugiriendo que la inhibición de DNA-PK inhibe parcialmente la fosforilación de Chk2.

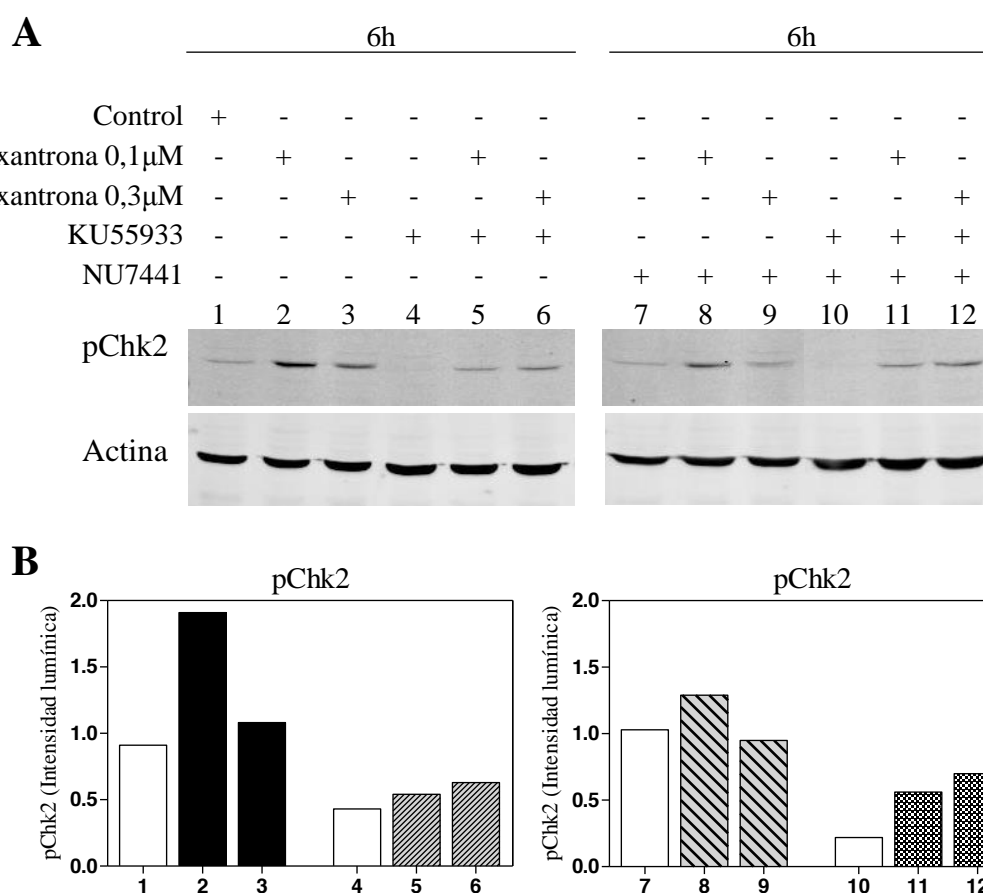


Figura 5.32. Estudio de pChk2 en células tratadas con mitoxantrona en presencia o ausencia de KU55933, NU7441 o ambos. A) Análisis Western de pChk2 en T68, utilizando actina como control de carga, en células PC-3 tratadas durante 6 horas con mitoxantrona 0,1 ó 0,3 µM en presencia o ausencia de KU55933 10 µM, NU7441 1 µM ó ambos. B) Cuantificación de la intensidad lumínica de pChk2. En negro, tratamiento con mitoxantrona en solitario. En rayado hacia la izquierda, combinación con KU55933. En rayado hacia la derecha, combinación con NU7441. En cuadros, combinación con ambos inhibidores.

5.5. Estudio de los mecanismos de muerte celular inducida por fármacos

El efecto citotóxico de los inhibidores de TOP2 en la línea celular tumoral de próstata puede implicar distintos mecanismos de muerte celular. De entre los diferentes mecanismos de muerte descritos actualmente (Galluzzi et al, 2012), la apoptosis ha sido uno de los mejor estudiados y caracterizados. Este proceso se refiere a un proceso de muerte celular programada, regulado por la síntesis proteica y donde se mantiene la funcionalidad de los orgánulos celulares hasta el final (Wyllie, 1997).

Para conocer la implicación de mecanismos apoptóticos en el efecto citotóxico de la mitoxantrona realizamos cuatro técnicas diferentes: marcaje con Anexina-V, activación de

caspasas efectoras, determinación de apoptosis por marcaje mitocondrial y análisis morfológico mediante Microscopía y *Time-Lapse*.

5.5.1. Marcaje con Anexina V

Uno de los procesos que se producen durante la apoptosis es la translocación de la fosfatidilserina de la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática (Kerr et al, 1972). Este proceso está mediado por unas proteínas transmembrana denominadas flipasas. La Anexina V es una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina, pudiendo ser detectada gracias a esta proteína durante el proceso apoptótico. La Anexina V constituye un indicador de procesos de apoptosis temprana. Por otra parte, el IP (ioduro de propidio) es un compuesto fluorescente con alta afinidad por el DNA que no puede atravesar la membrana plasmática. El marcaje de células con este compuesto es un indicador de procesos tardíos de apoptosis (de manera combinada con la Anexina V) o de necrosis (marcaje único con IP), puesto que solo tiñe el DNA de células cuya membrana se encuentra dañada.

La determinación del porcentaje de células positivas para IP y para Anexina V se llevó a cabo mediante citometría de flujo tras el tratamiento de las células con estaurosporina 5 μM (usado como control positivo de apoptosis) y distintas concentraciones de mitoxantrona durante 24, 36 y 48 horas. Los datos obtenidos se muestran en: Figura 5.33, Figura 5.34 y Figura 5.35.

Los resultados mostraron, en primer lugar, que el tratamiento con estaurosporina durante 24 horas incrementa el porcentaje de células positivas para Anexina V con respecto al control del 3,7% al 62,9% (Figura 5.33). Sin embargo, el tratamiento con mitoxantrona durante ese periodo de tiempo (Figura 5.33) no incrementa el porcentaje de células apoptóticas (células positivas para Anexina V y células positivas para ambos marcadores).

Los resultados fueron similares a las 36 horas de tratamiento, donde la mitoxantrona, a diferencia de la estaurosporina, no incrementó el porcentaje de células apoptóticas (Figura 5.34). Únicamente a las 48 horas (Figura 5.35) se observó un leve incremento en el porcentaje de células positivas para Anexina V (de un 9,7 en el control % a un 16,9 %) y para ambos marcadores (de un 8,2 % en el control a un 15,6 %), aunque este incremento resultó ser mucho menor que el provocado por la estaurosporina. Los resultados sugieren que la mitoxantrona no produce señales claras de activación de apoptosis temprana.

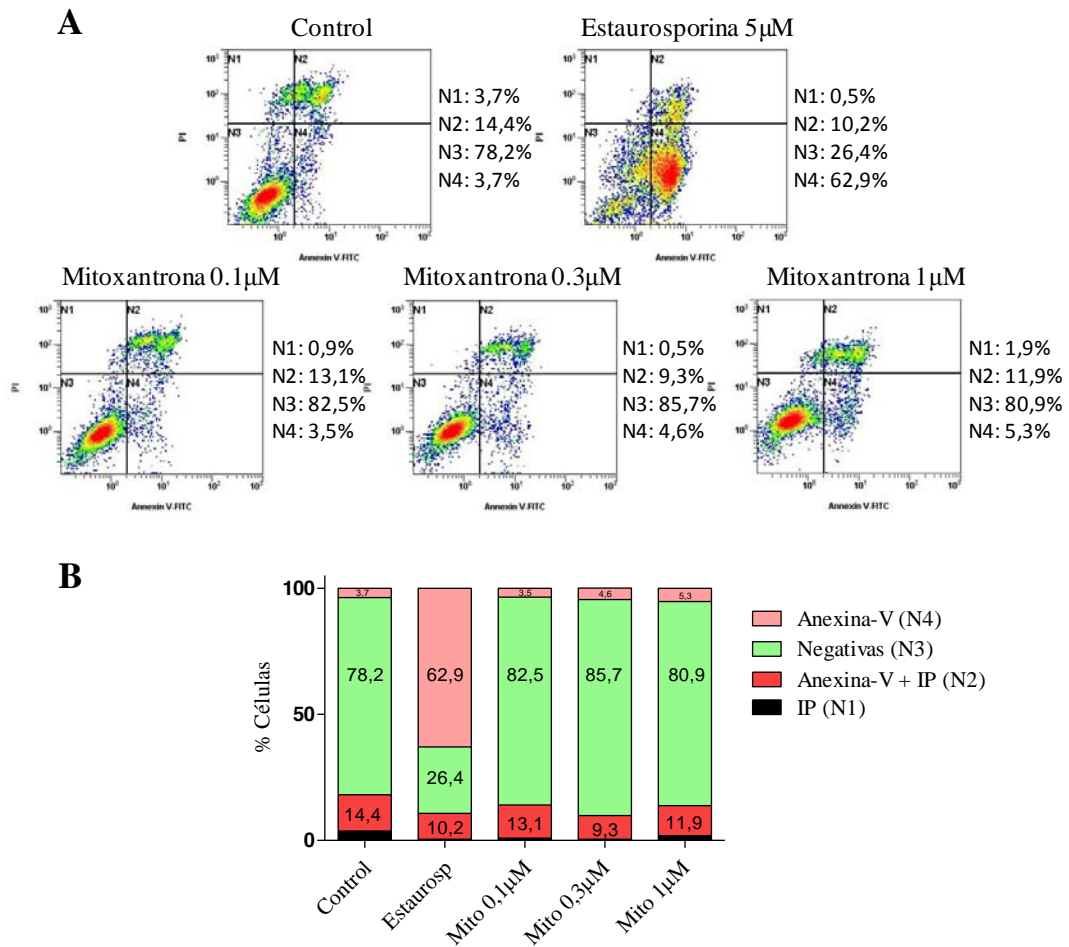


Figura 5.33. Estudio del marcaje con Anexina V de células tratadas con mitoxantrona durante 24 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 24 horas con estaurosporina 5 µM ó mitoxantrona 0,1, 0,3 ó 1 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para Anexina-V e ioduro de propidio (IP). B) Cuantificación de los datos obtenidos, en la que se representa: N1: células positivas para IP; N2: células positivas para Anexina V e IP; N3: células negativas para Anexina V e IP; N4: células positivas para Anexina V.

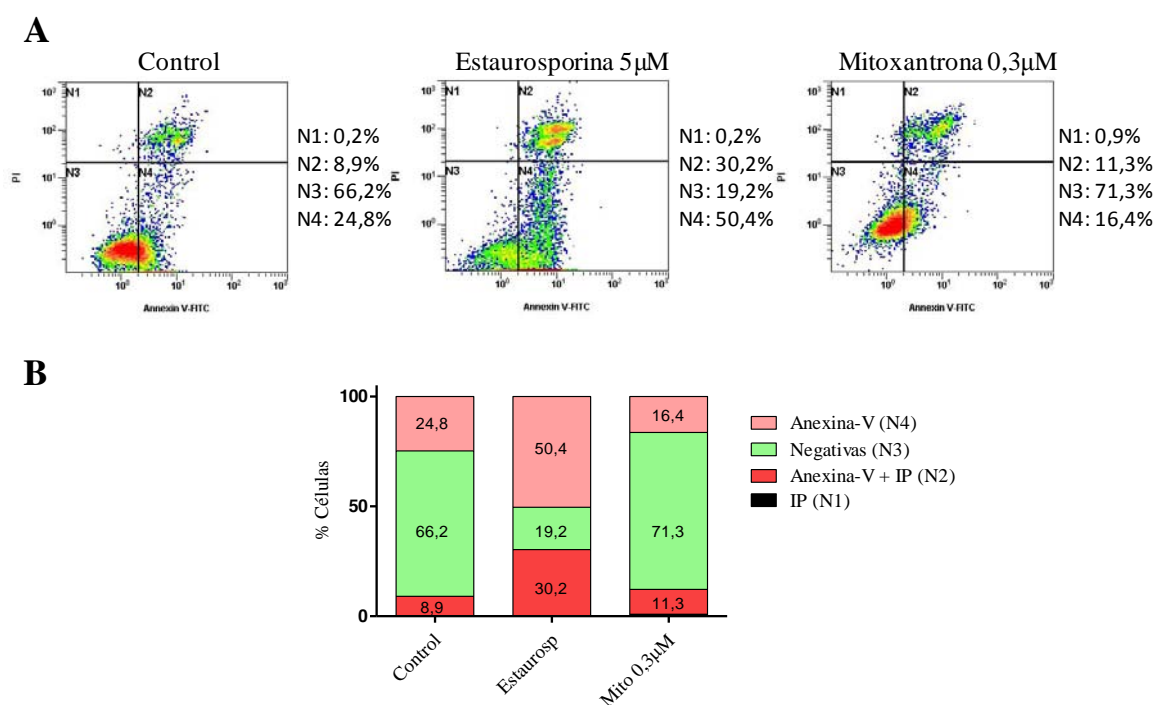


Figura 5.34. Estudio del marcaje con Anexina V de células tratadas con mitoxantrona durante 36 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 36 horas con estaurosporina 5 µM ó mitoxantrona 0,1, 0,3 ó 1 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para Anexina-V e ioduro de propidio (IP). B) Cuantificación de los datos obtenidos.

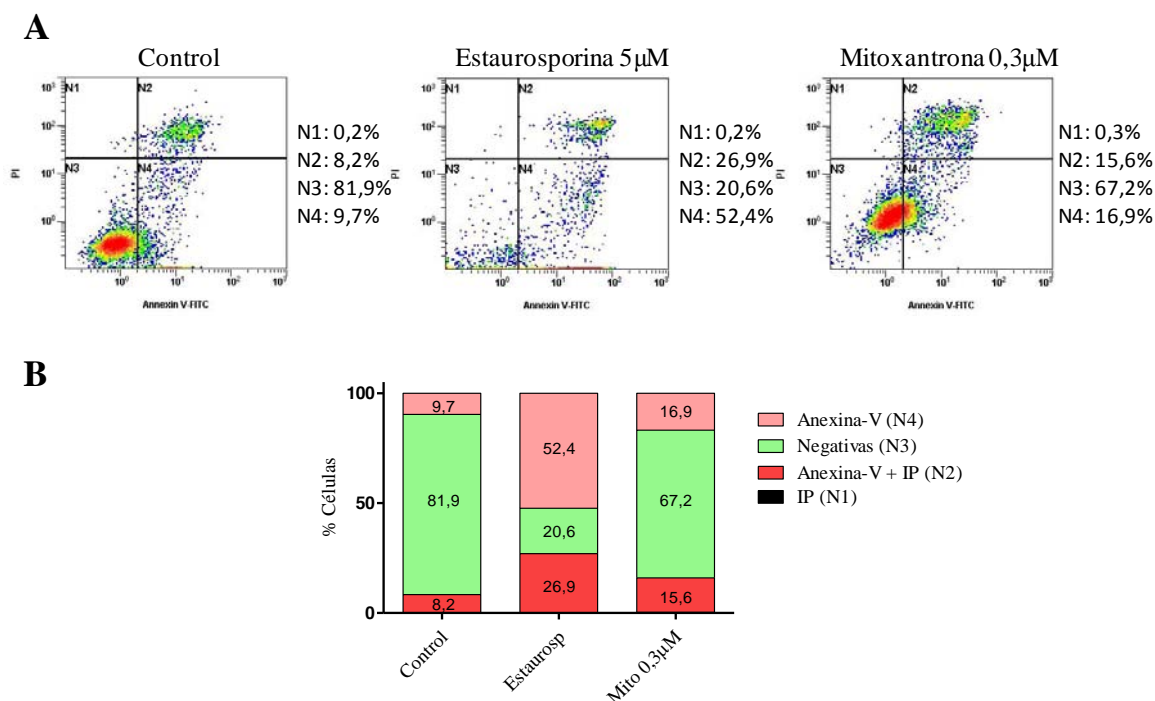


Figura 5.35. Estudio del marcaje con Anexina V de células tratadas con mitoxantrona durante 48 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 48 horas con estaurosporina 5 µM ó mitoxantrona 0,1, 0,3 ó 1 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para Anexina-V e ioduro de propidio (IP). B) Cuantificación de los datos obtenidos.

A continuación se llevó a cabo la determinación del porcentaje de células positivas para IP y para Anexina V en el tratamiento con los inhibidores NU7026 y NU7441 en solitario. Para ello, se trataron células PC-3 con estaurosporina 5 μ M, NU7026 10 μ M ó NU7441 1 μ M durante 24, 36 y 48 horas. Los datos obtenidos se muestran en: Figura 5.36, Figura 5.37 y Figura 5.38.

Los resultados mostraron que el tratamiento con ambos inhibidores de DNA-PK a los diferentes tiempos ensayados no incrementa el porcentaje de células apoptóticas (células positivas para Anexina V y células positivas para ambos marcadores), en comparación con los datos obtenidos en la condición de tratamiento con estaurosporina. Estos resultados sugieren que NU7026 y NU7441 no producen una activación temprana de los procesos de apoptosis.

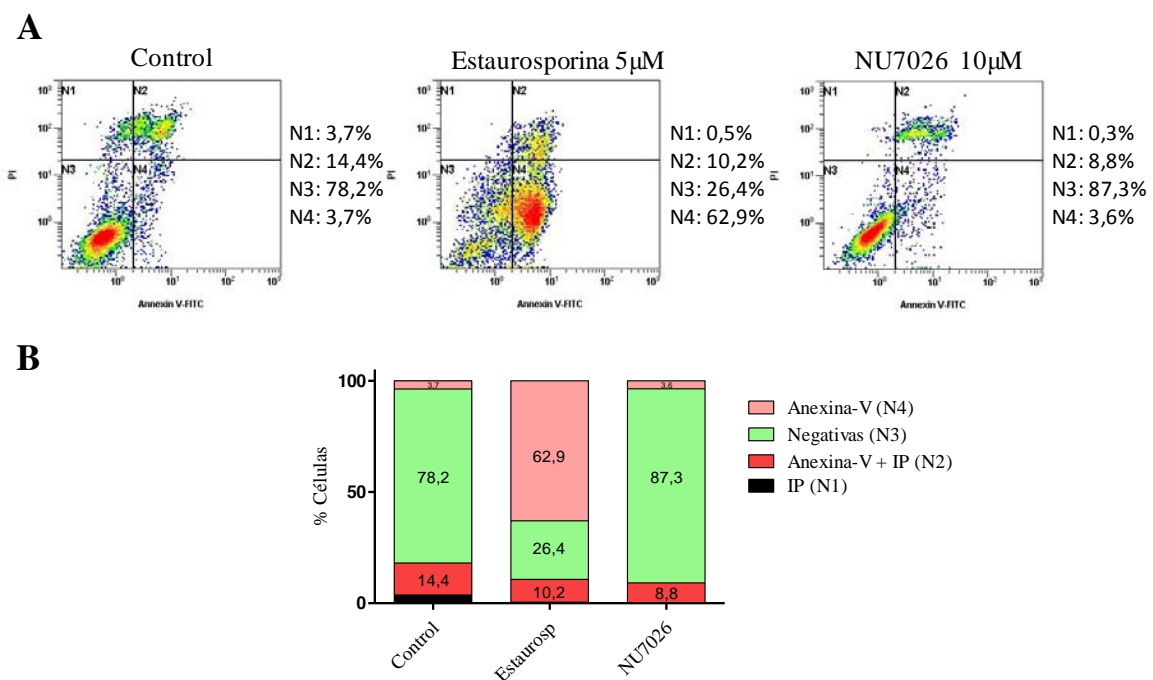


Figura 5.36. Estudio del marcaje con Anexina V de células tratadas con NU7026 durante 24 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 24 horas con estaurosporina 5 μ M ó NU7026 10 μ M, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para Anexina-V e ioduro de propidio (IP). B) Cuantificación de los datos, en la que se representa: N1: células positivas para IP; N2: células positivas para Anexina V e IP; N3: células negativas para Anexina V e IP; N4: células positivas para Anexina V.

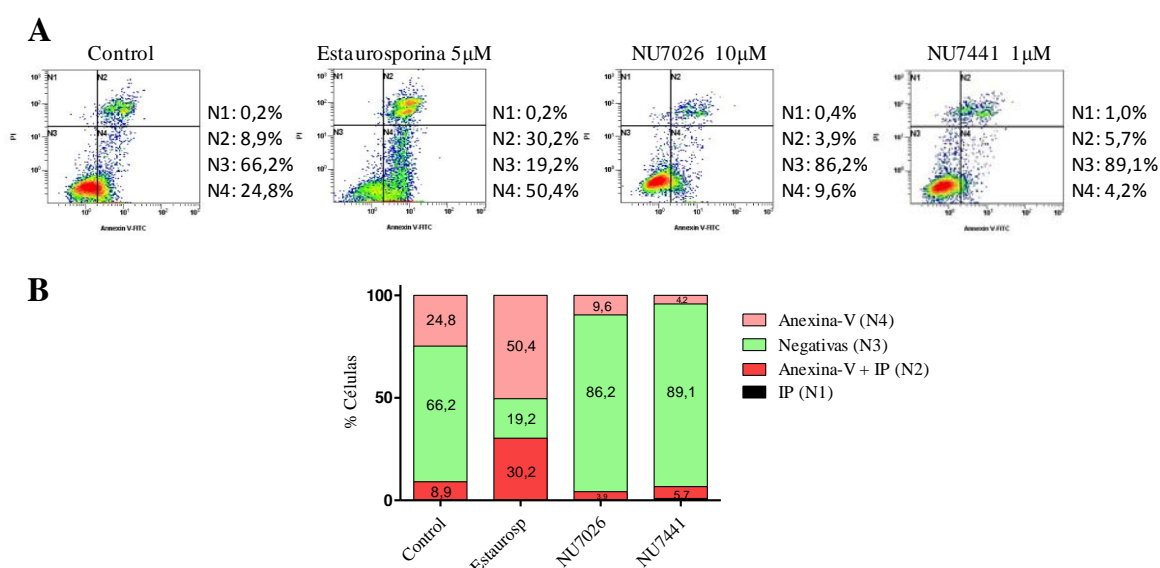


Figura 5.37. Estudio del marcaje con Anexina V de células tratadas con NU7026 ó NU7441 durante 36 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 36 horas con estaurosporina 5 µM, NU7026 10 µM ó NU7441 1 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para Anexina-V e ioduro de propidio (IP). B) Cuantificación de los datos.

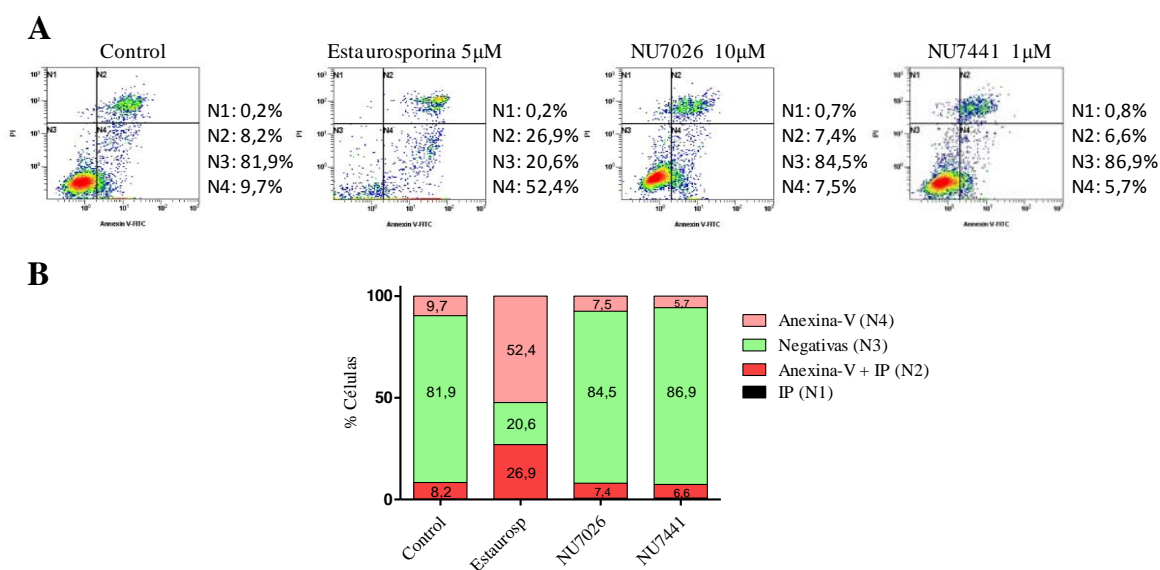


Figura 5.38. Estudio del marcaje con Anexina V de células tratadas con NU7026 ó NU7441 durante 48 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 48 horas con estaurosporina 5 µM, NU7026 10 µM ó NU7441 1 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para Anexina-V e ioduro de propidio (IP). B) Cuantificación de los datos.

Por último, en este apartado, se determinó el porcentaje de células positivas para IP y para Anexina V en el tratamiento combinado de mitoxantrona con NU7026 ó NU7441, para evaluar si la inhibición de DNA-PK activa procesos de apoptosis temprana en células con daño inducido por la mitoxantrona.

Para ello, se trataron células PC-3 durante 24 horas con mitoxantrona 0,1, 0,3 ó 1 μM en presencia de NU7026 10 μM . En la Figura 5.39 se muestran los resultados, donde observamos que en ninguna de las tres condiciones de tratamiento la combinación con NU7026 incrementa el porcentaje de células apoptóticas.

Del mismo modo, estudiamos el efecto del tratamiento combinado de mitoxantrona 0,3 μM con NU7026 10 μM ó con NU7441 1 μM durante 36 y 48 horas (Figura 5.40; Figura 5.41). En ambos casos el porcentaje de células predominante es el de células negativas para Anexina V e IP. A las 48 horas, no obstante, se observó un leve incremento de células positivas para Anexina V en presencia de ambos inhibidores, pasando de un 9,7% en el control a un 21,1% en la combinación con NU7026 y un 13,0% en la combinación con NU7441. El valor observado en la combinación con NU7026 sólo fue un 4,2% mayor que con respecto a la mitoxantrona en solitario (Figura 5.35).

Estos datos sugieren que la inhibición de DNA-PK tampoco induce señales claras de activación de procesos de apoptosis temprana en células tratadas con mitoxantrona.

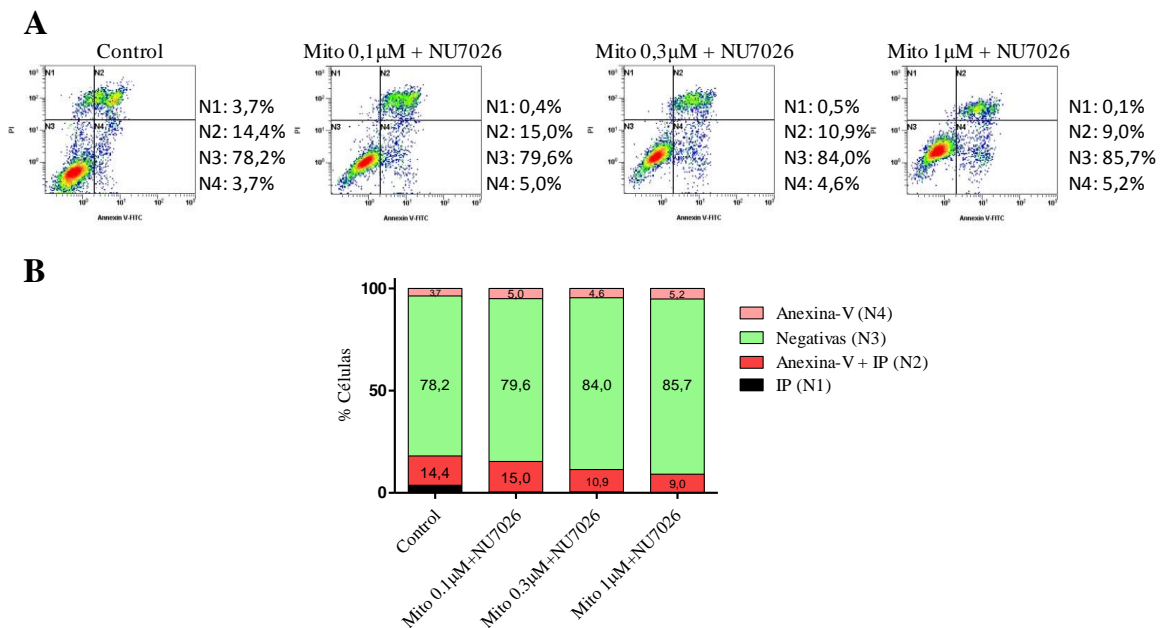


Figura 5.39. Estudio del marcaje con Anexina V de células tratadas con mitoxantrona y NU7026 durante 24 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 24 horas con mitoxantrona 0,1, 0,3 ó 1 μM +NU7026 10 μM , obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para Anexina-V e ioduro de propidio (IP). B) Cuantificación de los datos obtenidos, en la que se representa: N1: células positivas para IP; N2: células positivas para Anexina V e IP; N3: células negativas para Anexina V e IP; N4: células positivas para Anexina V.

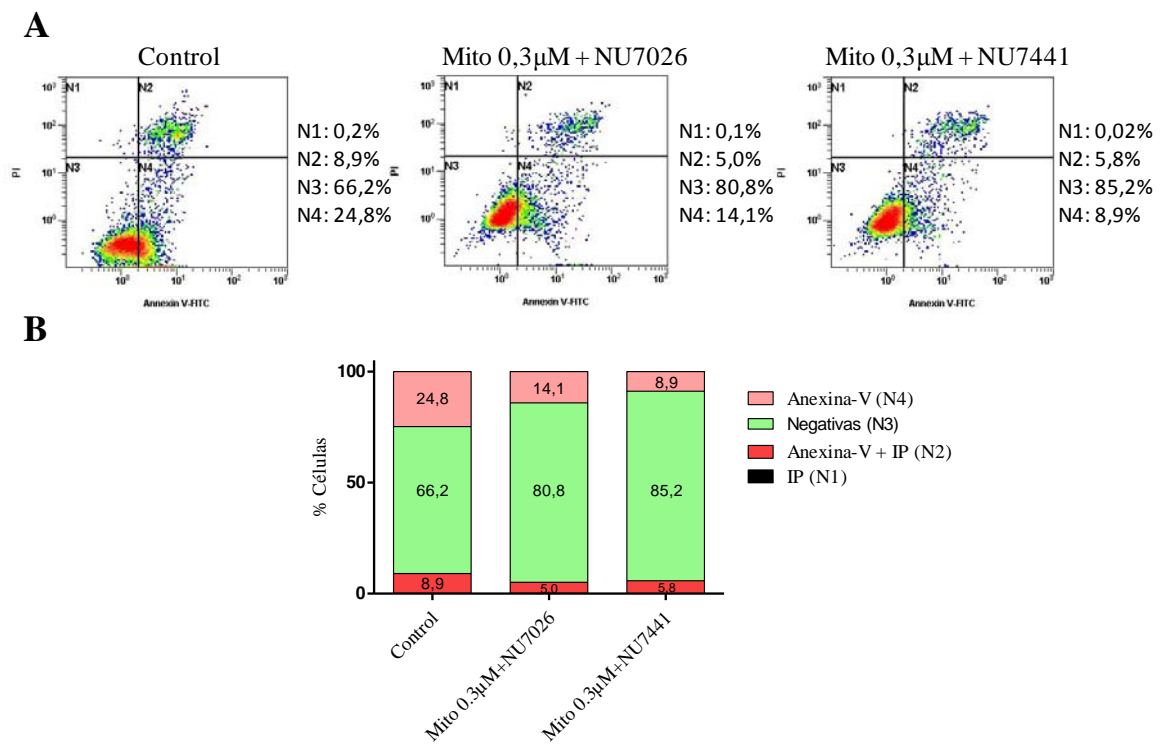


Figura 5.40. Estudio del marcaje con Anexina V de células tratadas con mitoxantrona en presencia de NU7026 ó NU7441 durante 36 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 36 horas con mitoxantrona 0,3 µM en presencia de NU7026 10 µM ó NU7441 1 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para Anexina-V e yoduro de propidio (IP). B) Cuantificación de los datos.

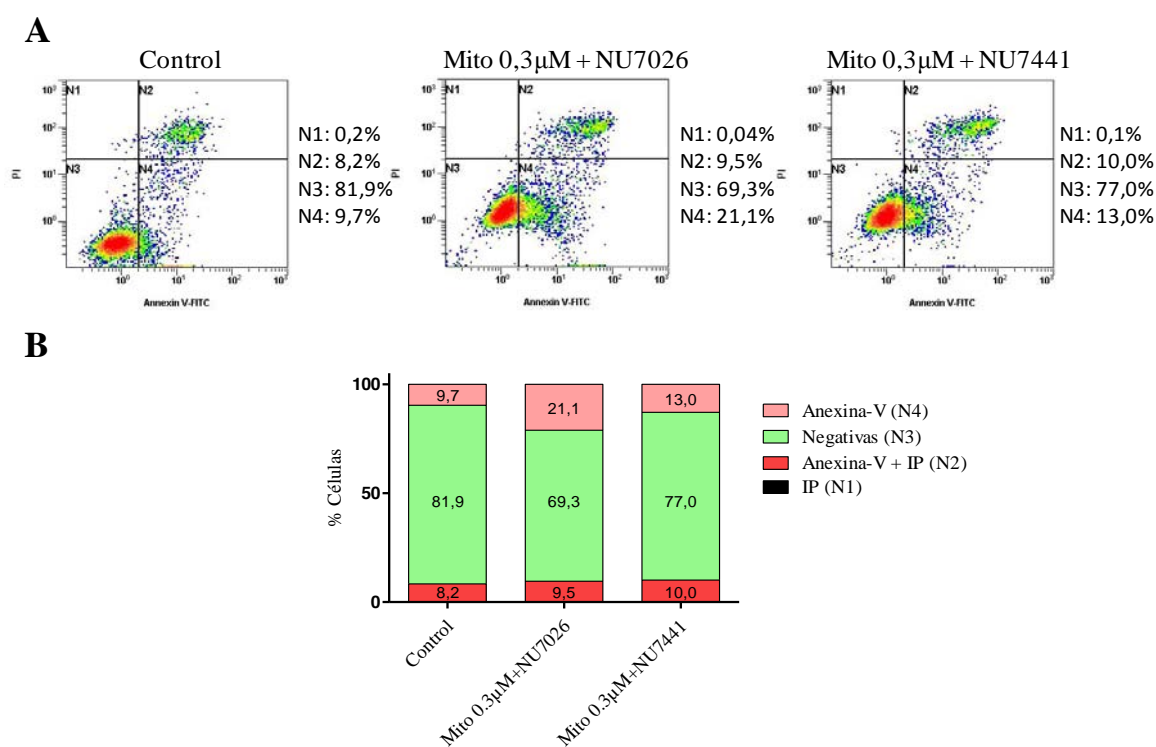


Figura 5.41. Estudio del marcaje con Anexina V de células tratadas con mitoxantrona en presencia de NU7026 ó NU7441 durante 48 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 48 horas con mitoxantrona 0,3 µM en presencia de NU7026 10 µM ó NU7441 1 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para Anexina-V e ioduro de propidio (IP). B) Cuantificación de los datos.

5.5.2. Activación de caspasas efectoras

La apoptosis se asocia clásicamente a la activación de la cascada de cisteín proteasas, denominadas caspasas, entre las que se encuentran las caspasas 3 y 7, caspasas efectoras, puesto que cuando se activan el proceso apoptótico éste es irreversible.

Una vez comprobado que la mitoxantrona no parece inducir señales claras de procesos de apoptosis temprana, se analizó la actividad de las caspasas 3 y 7 mediante un kit luminométrico, basado en el corte por caspasas de un sustrato que genera una señal luminiscente. Esta señal puede ser cuantificada y será proporcional a la cantidad de actividad de caspasas presente. Para realizar estos estudios, se trataron células PC-3 durante 24 y 48 horas con mitoxantrona 0,03, 0,3 ó 3 µM. Paralelamente, se trataron células PC-3 con esas concentraciones del fármaco en combinación con NU7026 10 µM ó NU7441 1 µM. Se utilizó estaurosporina 5 µM como control positivo de apoptosis.

Los resultados del ensayo mostraron, en primer lugar, que el tratamiento con estaurosporina durante 24 horas incrementa la actividad de caspasas 2,07 veces con respecto al

control (Tabla 5.12). Sin embargo, los tratamientos con mitoxantrona 0,03, 0,3 ó 3 μM inducen baja actividad de caspasas, con valores de 0,79, 0,82 y 0,60, respectivamente (Tabla 5.12). De manera similar, el tratamiento con estaurosporina durante 48 horas (Tabla 5.13) incrementó la actividad de caspasas 2,17 veces con respecto al control. Los tratamientos con mitoxantrona, a las mismas concentraciones, mostraron nuevamente valores de actividad mucho menores que el tratamiento con estaurosporina (Tabla 5.13).

En segundo lugar, se analizó la actividad de caspasas 3 y 7 tras el tratamiento durante 24 horas con mitoxantrona en combinación los inhibidores de DNA-PK (Tabla 5.12). Los resultados, en presencia de NU7026 10 μM ó NU7441 1 μM , no incrementaron la actividad de caspasas, puesto que los valores obtenidos permanecieron muy similares a los de la mitoxantrona en solitario (Tabla 5.12). A las 48 horas de tratamiento en las mismas condiciones (Tabla 5.13), la combinación con NU7026 ó NU7441 tampoco incrementó los valores de actividad de caspasas con respecto a la mitoxantrona en solitario (Tabla 5.13). Estos resultados sugieren ni el tratamiento con mitoxantrona ni su combinación con los inhibidores de DNA-PK producen activación de las caspasas efectoras 3 y 7.

| Fármacos | Fármaco | Fármaco+NU7026 | Fármaco+NU7441 |
|---------------------------------|---------|----------------|----------------|
| Estaurosporina 5 μM | 2,07 | | |
| Mitoxantrona 0,03 μM | 0,79 | 0,82 | 0,78 |
| Mitoxantrona 0,3 μM | 0,82 | 0,82 | 0,71 |
| Mitoxantrona 3 μM | 0,60 | 0,65 | 0,66 |

Tabla 5.12. Estudio de la actividad de caspasas 3/7 a las 24 horas. La tabla recoge las unidades arbitrarias de luminiscencia, expresadas con respecto al control, de células PC-3 tratadas con estaurosporina 5 μM ó con mitoxantrona 0,03, 0,3 ó 3 μM durante 24 horas. Asimismo, recoge las unidades arbitrarias de luminiscencia de células tratadas con esas concentraciones de mitoxantrona en combinación con NU7026 10 μM ó NU7441 1 μM durante el mismo periodo de tiempo.

| Fármacos | Fármaco | Fármaco+NU7026 | Fármaco+NU7441 |
|---------------------------------|---------|----------------|----------------|
| Estaurosporina 5 μM | 2,17 | | |
| Mitoxantrona 0,03 μM | 0,86 | 0,82 | 0,86 |
| Mitoxantrona 0,3 μM | 0,49 | 0,44 | 0,44 |
| Mitoxantrona 3 μM | 0,27 | 0,20 | 0,19 |

Tabla 5.13. Estudio de la actividad de caspasas 3/7 a las 48 horas. La tabla recoge las unidades arbitrarias de luminiscencia, expresadas con respecto al control, de células PC-3 tratadas con estaurosporina 5 μM ó con mitoxantrona 0,03, 0,3 ó 3 μM durante 48 horas. Asimismo, recoge las unidades arbitrarias de luminiscencia de células tratadas con esas concentraciones de mitoxantrona en combinación con NU7026 10 μM ó NU7441 1 μM , durante el mismo periodo de tiempo.

5.5.3. Determinación de apoptosis por marcaje mitocondrial

El sustrato de caspasa 3 NucView 488 y el colorante mitocondrial MitoView 633 son dos compuestos que se han utilizado para detectar el perfil de células apoptóticas. En este ensayo, NucView 488 es capaz de detectar actividad de caspasas 3 y 7 en células individuales. Este compuesto consta de un colorante fluorogénico de DNA y de un sustrato de caspasa 3. El sustrato NucView 488 (no fluorescente) cruza rápidamente las membranas celulares para entrar en el citoplasma de la célula, donde es cortado por caspasas 3/7 para formar un colorante de alta afinidad por el DNA. El colorante de DNA liberado migra al núcleo de la célula para teñirlo de verde brillante. Por tanto, NucView 488 es bifuncional, siendo capaz de detectar tanto actividad intracelular de caspasas 3/7 como de teñir el núcleo de las células, que sufre cambios morfológicos en situaciones de muerte celular. El marcaje de células con este compuesto es un indicador de procesos de apoptosis.

MitoView 633 es un colorante fluorescente mitocondrial fotorreceptor de luz roja lejana (700-800 nm). Este reactivo difunde a través de la membrana plasmática y se acumula en la mitocondria. Las mitocondrias teñidas con MitoView 633 se vuelven fluorescentes brillantes tras la acumulación del colorante y su tinción depende del potencial de membrana mitocondrial. Por tanto, las células apoptóticas presentarán una tinción de MitoView 633 mucho menor que las células sanas.

La determinación del porcentaje de células apoptóticas (positivas para NucView 488 y negativas para MitoView 633) se llevó a cabo mediante citometría de flujo tras el tratamiento de células PC-3 con mitoxantrona 0,3 ó 3 μ M durante 3, 6, 24, 48 y 72 horas. Se utilizó un tratamiento con estaurosporina 5 μ M durante los mismos tiempos como control positivo de apoptosis. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 5.42 a la Figura 5.46. Las células apoptóticas positivas para NucView 488 se nombraron como Mit (-) Nuc (+). Las células apoptóticas negativas para MitoView 633 se nombraron como Mit (-) Nuc (-). Las células vivas no presentaron tinción de núcleos pero sí de mitocondrias, y se nombraron como Mit (+) Nuc (-).

Los resultados del ensayo mostraron, en primer lugar, que las células tratadas con estaurosporina durante 3 y 6 horas (Figura 5.42 y Figura 5.43, respectivamente) incrementan el porcentaje de células apoptóticas Mit (-) Nuc (-) con respecto al control, pasando de un 0,6% a un 26,6% a las 3 horas y de un 0,5% a un 40,3% a las 6 horas de tratamiento. Sin embargo, las células tratadas con mitoxantrona durante ese periodo de tiempo (Figura 5.42 y Figura 5.43, respectivamente) no mostraron señales apoptóticas de este tipo. Los resultados de tinción

negativa mitocondrial observados con estaurosporina indican el efecto apoptótico inmediato que produce este fármaco a las pocas horas de tratamiento, probablemente debido a procesos de desacoplamiento mitocondrial. Sin embargo, este efecto no se observó en presencia de mitoxantrona.

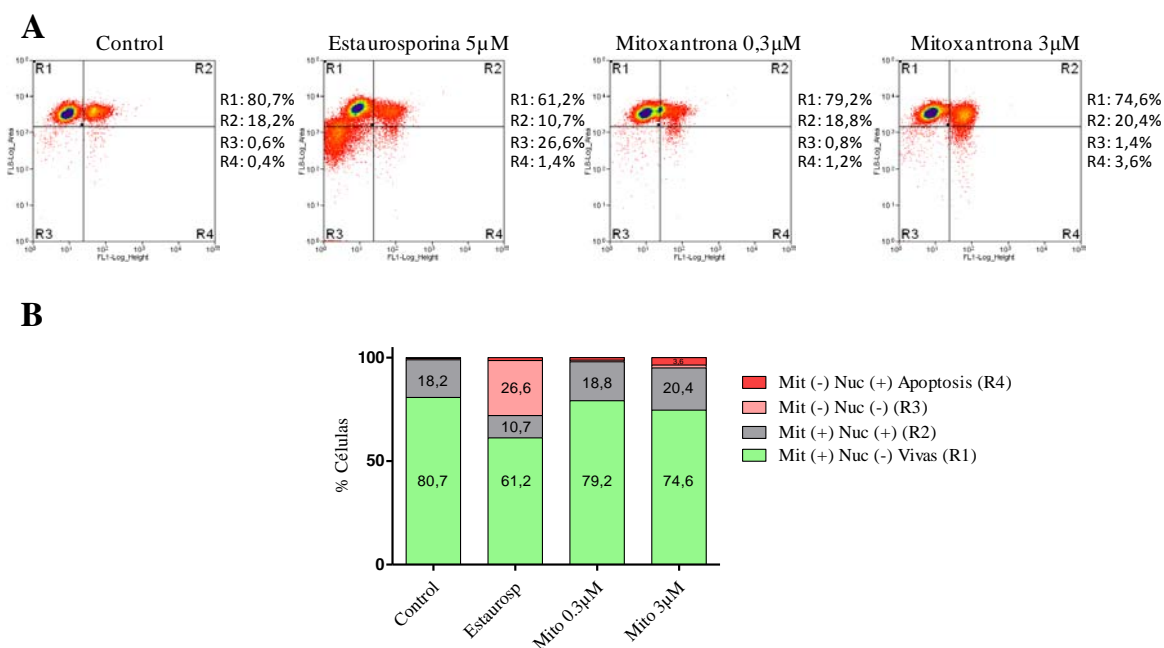


Figura 5.42 Estudio del marcaje con NucView 488 y MitoView 633 de células tratadas con mitoxantrona durante 3 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 3 horas con estaurosporina 5 µM ó mitoxantrona 0,3 ó 3 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para NucView 488 y MitoView 633. B) Cuantificación de los datos obtenidos, en la que se representa: R1: células vivas o positivas para MitoView 633; R2: células positivas para MitoView 633 y NucView 488; R3: células apoptóticas negativas para MitoView 633; R4: células apoptóticas positivas para NucView 488.

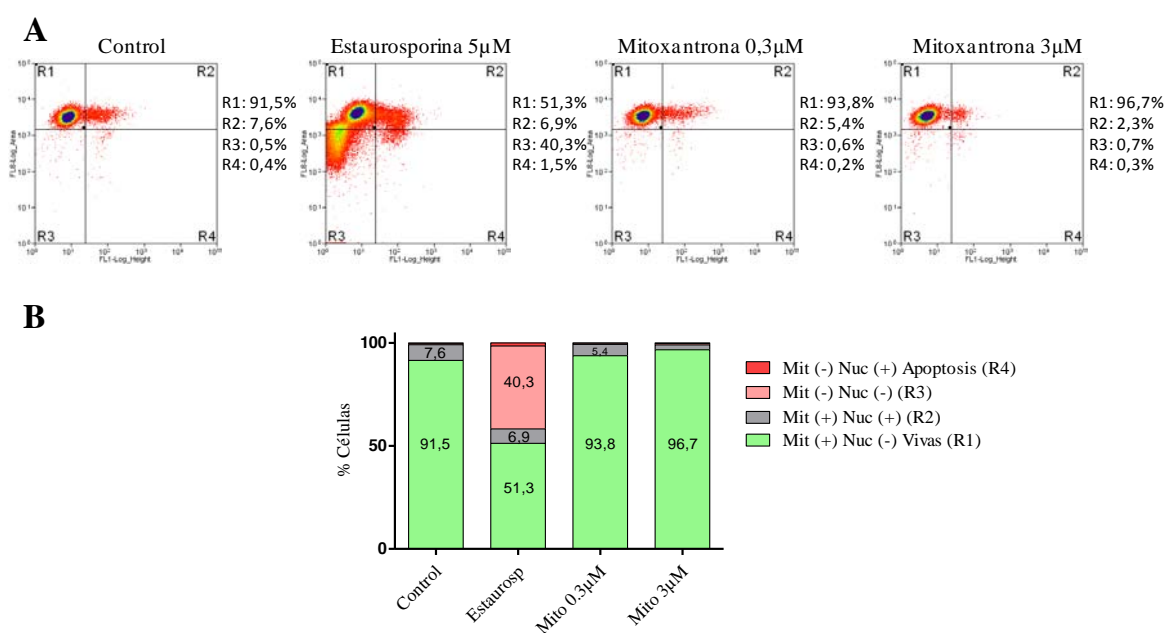


Figura 5.43. Estudio del marcaje con NucView 488 y MitoView 633 de células tratadas con mitoxantrona durante 6 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 6 horas con estaurosporina 5 μ M ó mitoxantrona 0,3 ó 3 μ M, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para NucView 488 y MitoView 633. B) Cuantificación de los datos obtenidos.

Tras el tratamiento con estaurosporina durante 24 y 48 horas (Figura 5.44 y Figura 5.45, respectivamente) se observó un mayor incremento en el porcentaje de células apoptóticas Mit (-) Nuc (-) con respecto al control, alcanzando hasta un 47% a las 24 horas y un 41,7% a las 48 horas. Además, las células mostraron un incremento en el porcentaje de células apoptóticas Mit (-) Nuc (+), pasando de un 0,8% a un 37,7% a las 24 horas y de un 13,3% a un 43,4% a las 48 horas. Por el contrario, las células tratadas con mitoxantrona a estos tiempos de tratamiento (Figura 5.44 y Figura 5.45) mostraron señales de apoptosis leves con respecto al control y muy bajas con respecto al tratamiento con estaurosporina. Así, a las 24 horas, el tratamiento con mitoxantrona 0,3 y 3 μ M aumentó el porcentaje de células apoptóticas Mit (-) Nuc (+) hasta un 13 y 7,2%, respectivamente, y el porcentaje de células apoptóticas Mit (-) Nuc (-) hasta un 6,5% y un 6,4%, respectivamente. A las 48 horas, aunque destacó el incremento del porcentaje de células apoptóticas Mit (-) Nuc (-) con mitoxantrona 3 μ M (29,9%), las señales apoptóticas continuaron siendo muy inferiores a las obtenidas con estaurosporina.

Finalmente, a las 72 horas de tratamiento con estaurosporina (Figura 5.46), la suma del porcentaje de células apoptóticas Mit (-) Nuc (-) y Mit (-) Nuc (+) fue de un 94,8%, mientras que con mitoxantrona 0,3 y 3 μ M los valores alcanzados fueron menores de la mitad (40,1 y 42,9%, respectivamente).

El alto porcentaje de células con tinción positiva de núcleos en el tratamiento con estaurosporina a las 72 horas nos indica la fuerte actividad de caspasas 3 y 7 en las células que, junto con la elevada tinción negativa mitocondrial (indicativo probable de desacoplamiento mitocondrial), sugiere un notable efecto de muerte celular apoptótica producida por el fármaco. En comparación con la estaurosporina, la mitoxantrona induce unas señales apoptóticas mucho menores, que probablemente no se ajustan a las vías clásicas de apoptosis descritas en la literatura.

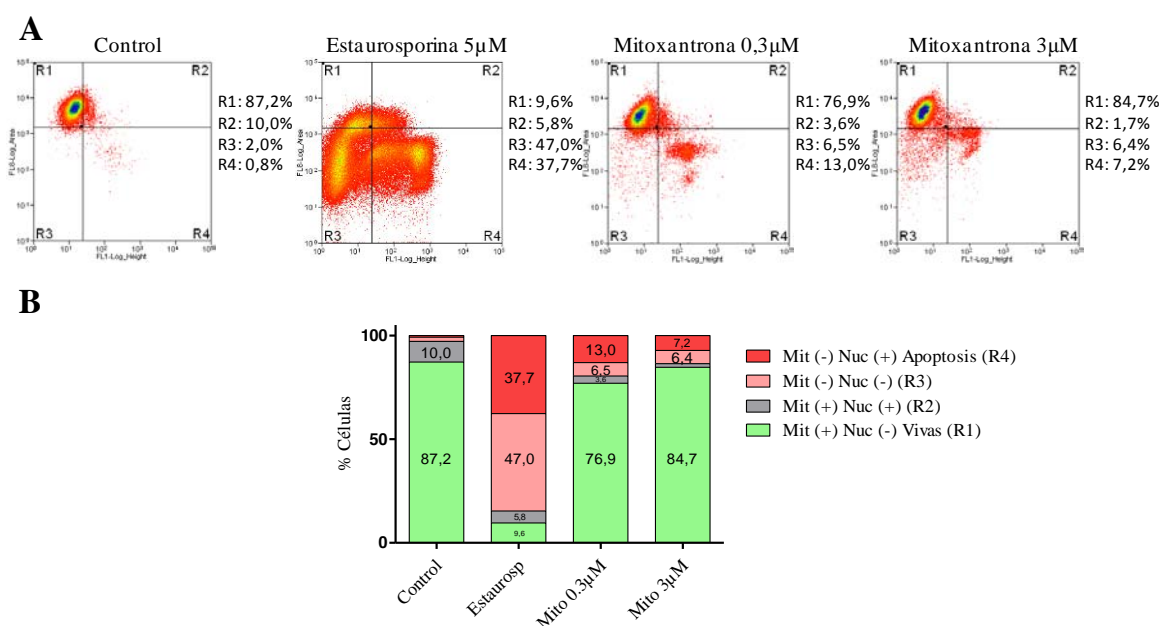


Figura 5.44. Estudio del marcaje con NucView 488 y MitoView 633 de células tratadas con mitoxantrona durante 24 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 24 horas con estaurosporina 5 µM ó mitoxantrona 0,3 ó 3 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para NucView 488 y MitoView 633. B) Cuantificación de los datos obtenidos.

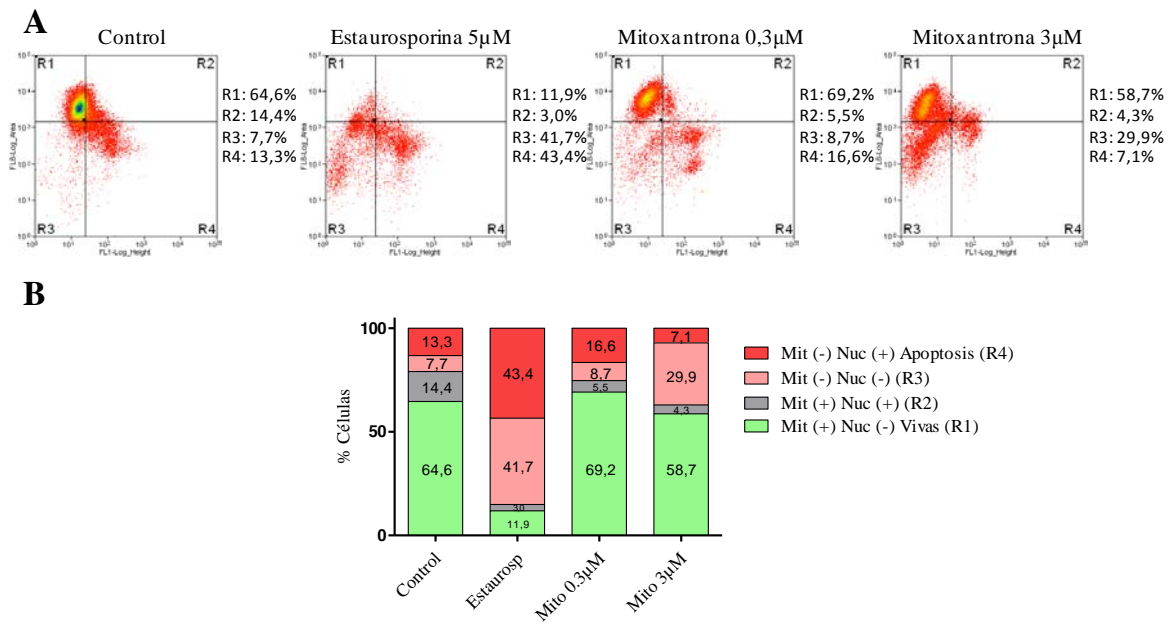


Figura 5.45. Estudio del marcaje con NucView 488 y MitoView 633 de células tratadas con mitoxantrona durante 48 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 48 horas con estaurosporina 5 µM ó mitoxantrona 0,3 ó 3 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para NucView 488 y MitoView 633. B) Cuantificación de los datos obtenidos.

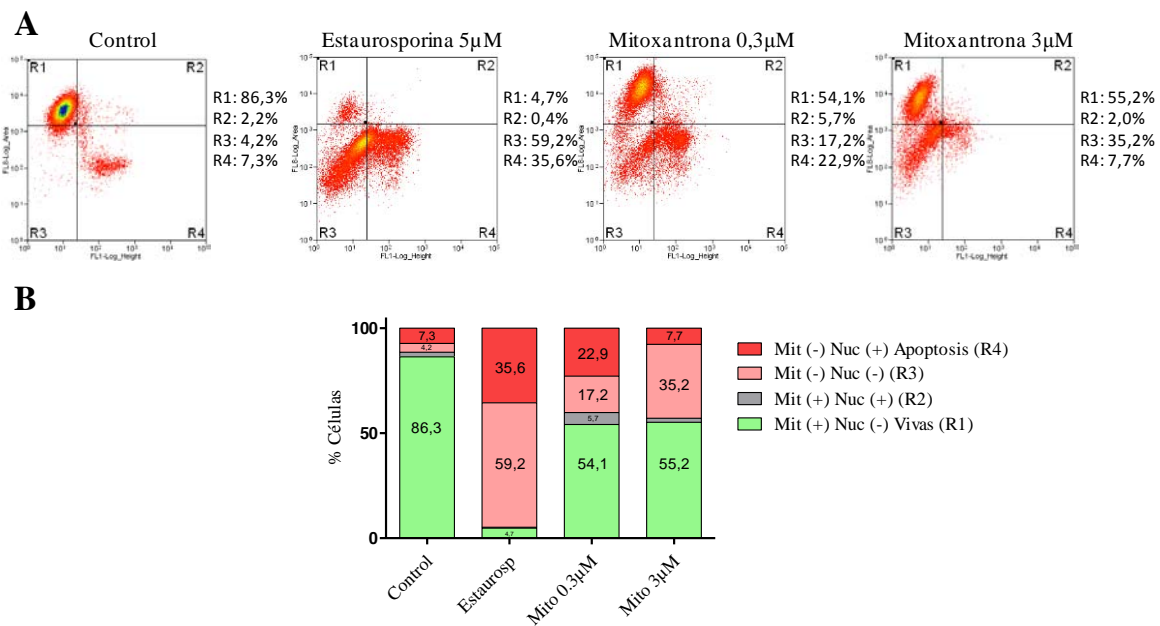


Figura 5.46. Estudio del marcaje con NucView 488 y MitoView 633 de células tratadas con mitoxantrona durante 72 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 72 horas con estaurosporina 5 µM ó mitoxantrona 0,3 ó 3 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para NucView 488 y MitoView 633. B) Cuantificación de los datos obtenidos.

El siguiente paso fue evaluar si la inhibición de DNA-PK incrementa las señales apoptóticas leves inducidas por la mitoxantrona. Para ello, se trataron células PC-3 con

mitoxantrona 0,3 ó 3 μM en presencia de NU7026 10 μM durante 3, 6, 24, 48 y 72 horas. Asimismo, se trataron células con mitoxantrona 0,3 ó 3 μM en presencia de NU7441 1 μM durante 24 y 48 horas. La determinación del porcentaje de células apoptóticas (positivas para NucView 488 y negativas para MitoView 633) se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 5.47 a la Figura 5.51.

Tal y como hemos observado en el apartado anterior, el tratamiento con mitoxantrona (0,3 y 3 μM) en presencia de NU7026 durante 3 y 6 horas no mostró cambios relevantes con respecto al control.

El tratamiento durante 24 horas con mitoxantrona 0,3 y 3 μM había inducido un porcentaje total de células apoptóticas Mit (-) Nuc (-) y Mit (-) Nuc (+) del 19,5% y 13,6%, respectivamente (Figura 5.44). En presencia de NU7026 (Figura 5.49), el porcentaje total de células apoptóticas para esas concentraciones fue del 15,4% y 19,4%, respectivamente, y en presencia de NU7441, del 8,6% y un 31,9%. Por tanto, no se observaron cambios relevantes.

A las 48 horas de tratamiento, la mitoxantrona (0,3 y 3 μM) había inducido un porcentaje total de células apoptóticas del 25,3 y 37%, respectivamente (Figura 5.45). En presencia de los inhibidores de DNA-PK (Figura 5.50), solamente se observó un leve aumento del porcentaje de células apoptóticas con mitoxantrona 3 μM +NU7441, alcanzando un 48,1%.

Finalmente, a las 72 horas, la mitoxantrona (0,3 y 3 μM) había inducido un porcentaje total de células apoptóticas del 40,1% y 42,9%, respectivamente (Figura 5.46). El tratamiento combinado con NU7026 solamente incrementó el porcentaje de células apoptóticas a un 52,6% con mitoxantrona 0,3 μM (Figura 5.51).

Los resultados sugieren que la mitoxantrona, en presencia de DNA-PK inhibida, también induce señales leves de apoptosis.

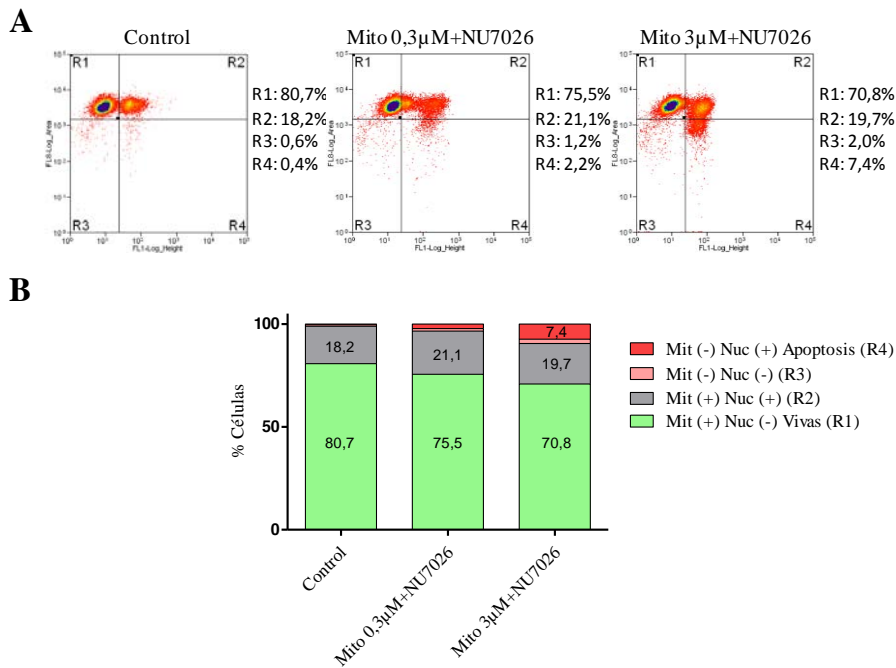


Figura 5.47. Estudio del marcaje con NucView 488 y MitoView 633 de células tratadas con mitoxantrona y NU7026 durante 3 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 3 horas con mitoxantrona 0,3 ó 3 µM y NU7026 10 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para NucView 488 y MitoView 633. B) Cuantificación de los datos obtenidos, en la que se representa: R1: células vivas o positivas para MitoView 633; R2: células positivas para MitoView 633 y NucView 488; R3: células apoptóticas negativas para MitoView 633; R4: células apoptóticas positivas para NucView 488.

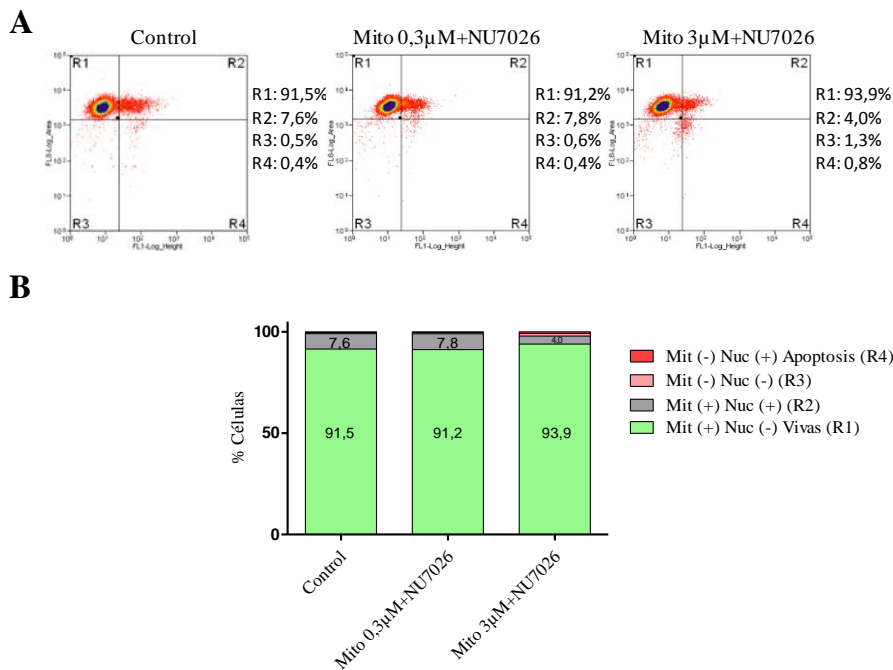


Figura 5.48. Estudio del marcaje con NucView 488 y MitoView 633 de células tratadas con mitoxantrona y NU7026 durante 6 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 6 horas con mitoxantrona 0,3 ó 3 µM y NU7026 10 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó

el porcentaje de células positivas para NucView 488 y MitoView 633. B) Cuantificación de los datos obtenidos.

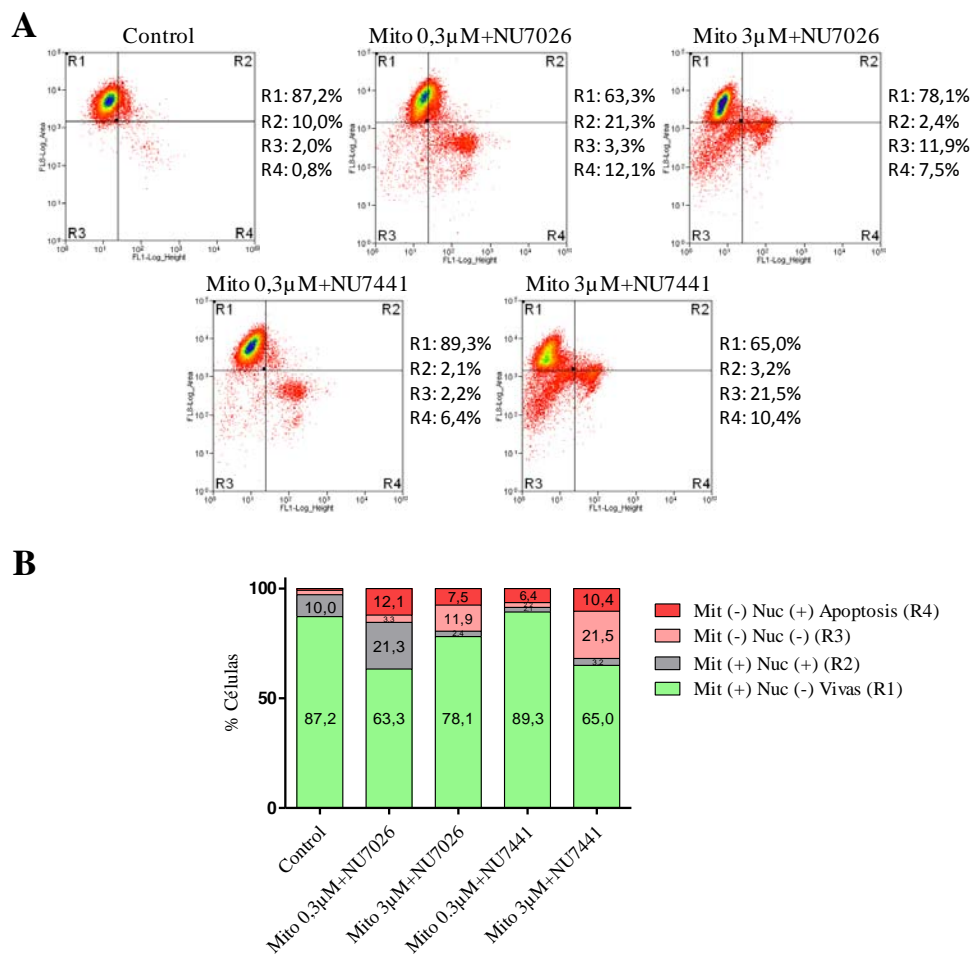


Figura 5.49. Estudio del marcaje con NucView 488 y MitoView 633 de células tratadas con mitoxantrona en combinación con NU7026 ó NU7441 durante 24 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 24 horas con mitoxantrona 0,3 ó 3 µM en presencia de NU7026 10 µM ó de NU7441 1 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para NucView 488 y MitoView 633. B) Cuantificación de los datos obtenidos.

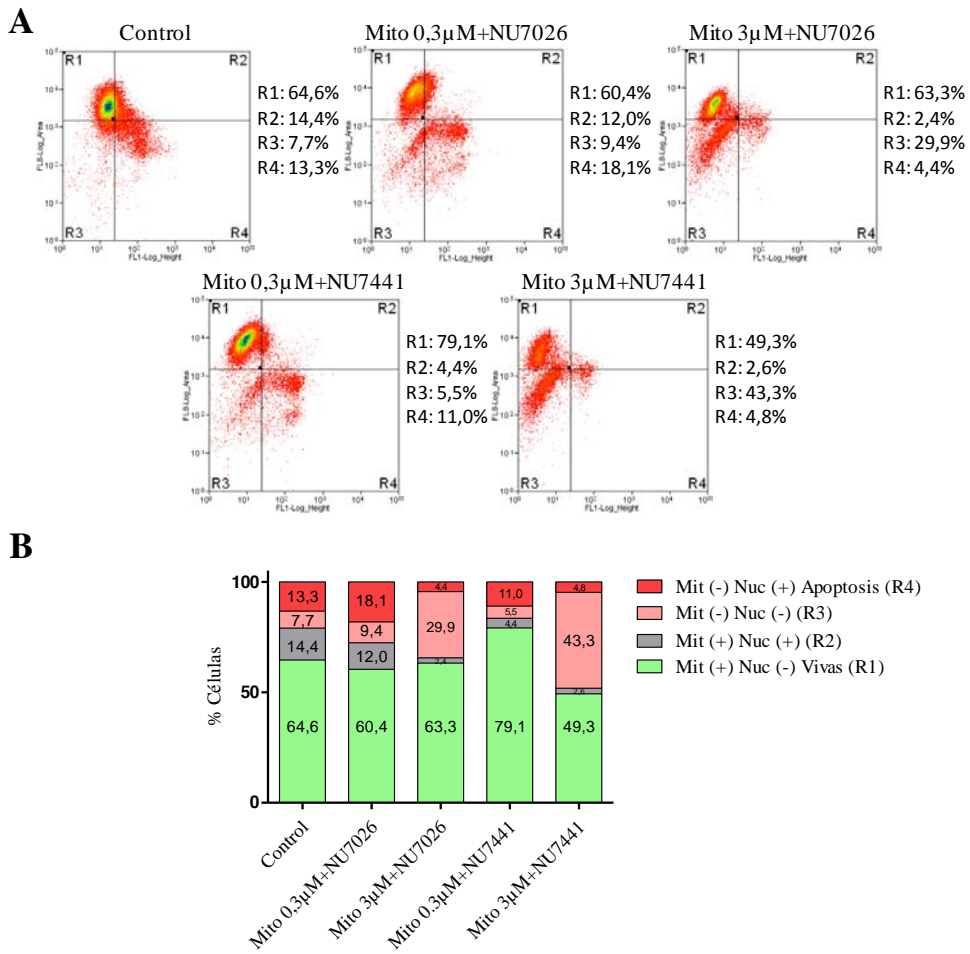


Figura 5.50. Estudio del marcaje con NucView 488 y MitoView 633 de células tratadas con mitoxantrona en combinación con NU7026 ó NU7441 durante 48 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 48 horas con mitoxantrona 0,3 ó 3 µM en presencia de NU7026 10 µM ó de NU7441 1 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para NucView 488 y MitoView 633. B) Cuantificación de los datos obtenidos.

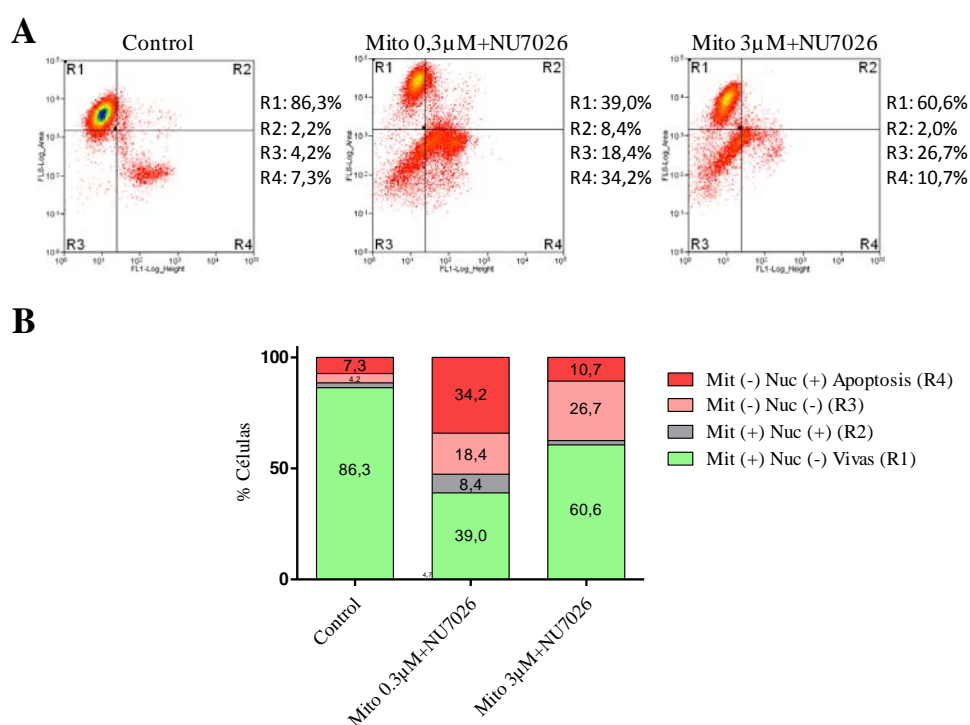


Figura 5.51. Estudio del marcaje con NucView 488 y MitoView 633 de células tratadas con mitoxantrona y NU7026 durante 72 horas. A) Histogramas de células tratadas durante 72 horas con mitoxantrona 0,3 ó 3 µM y NU7026 10 µM, obtenidos mediante citometría de flujo y en los que se determinó el porcentaje de células positivas para NucView 488 y MitoView 633. B) Cuantificación de los datos obtenidos.

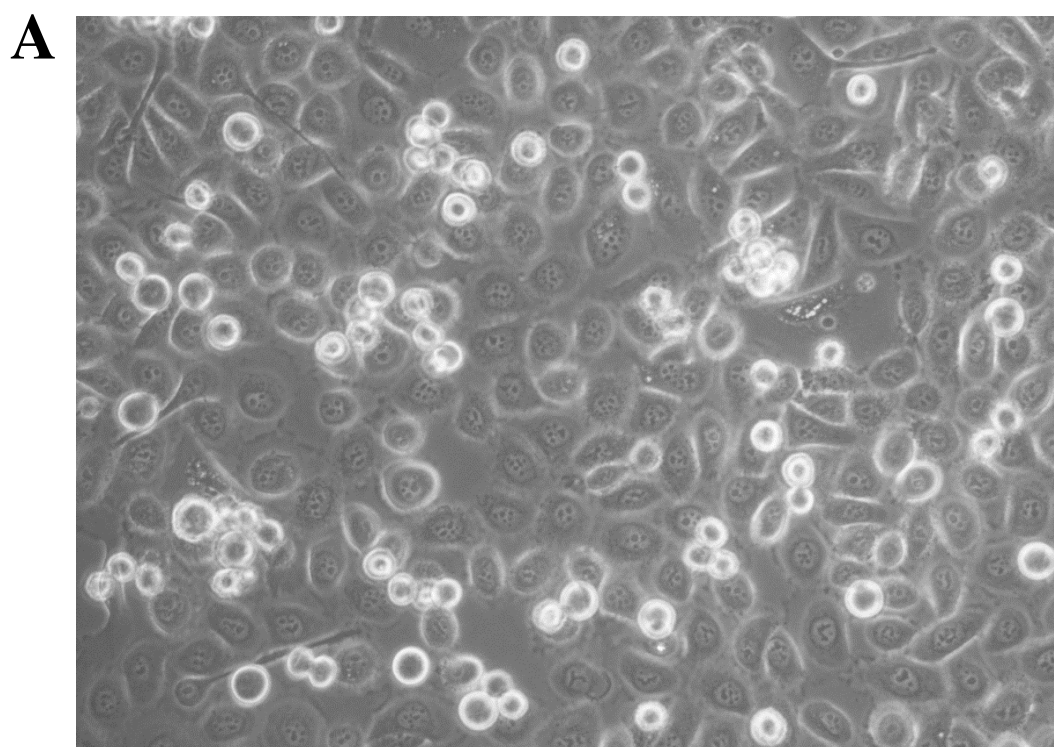
5.5.4. Análisis morfológico mediante microscopía y *time-lapse*

Para confirmar que las señales observadas en el apartado anterior no son señales claras de apoptosis se visualizaron por microscopía los cambios morfológicos producidos durante el proceso citotóxico mediado por la mitoxantrona.

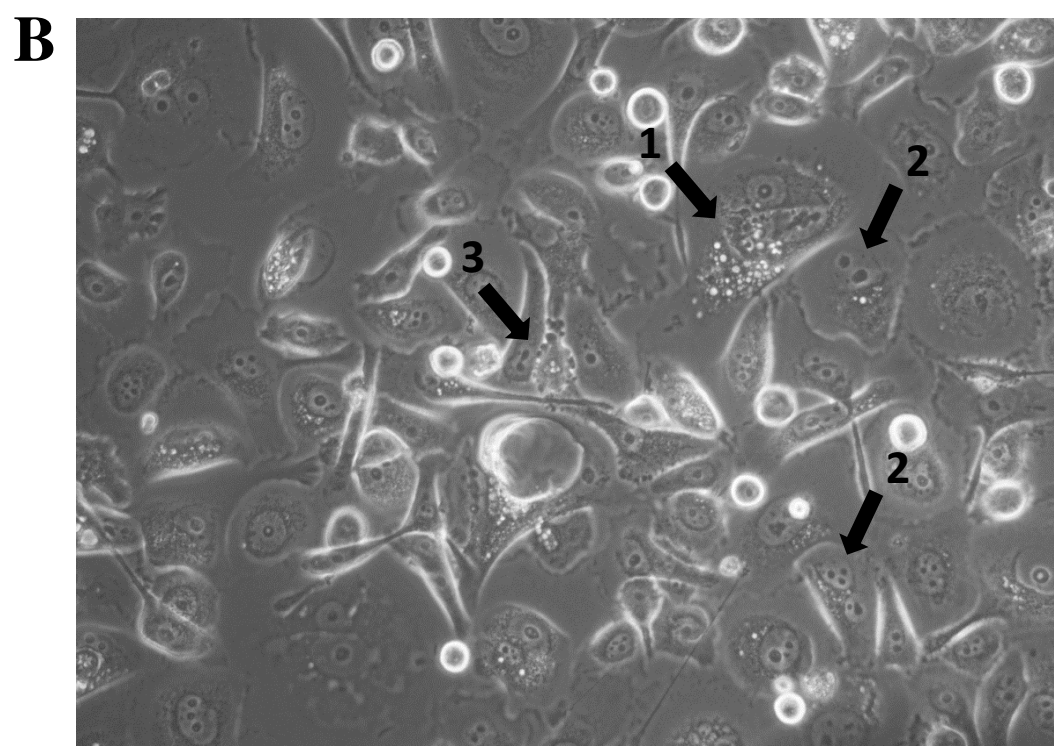
Así, células PC-3 se trataron con mitoxantrona 0,3 µM durante 10, 24, 36, 48 y 60 horas. Paralelamente, se trataron células con esas concentraciones del fármaco en presencia de NU7441 1 µM. Las imágenes en las que se observaron los mayores cambios corresponden a las 60 horas de tratamiento y se muestran en la Figura 5.52.

En estas imágenes observamos que, tras el tratamiento con mitoxantrona durante 60 horas, tan sólo alguna célula del total del cultivo mostrado presentó características típicas de muerte celular por apoptosis, como reducción del volumen celular, fragmentación del núcleo, formación de rugosidades en la membrana plasmática y desprendimiento de cuerpos apoptóticos (Figura B, 3). En cambio, el resto de células del cultivo no presentó dichas características.

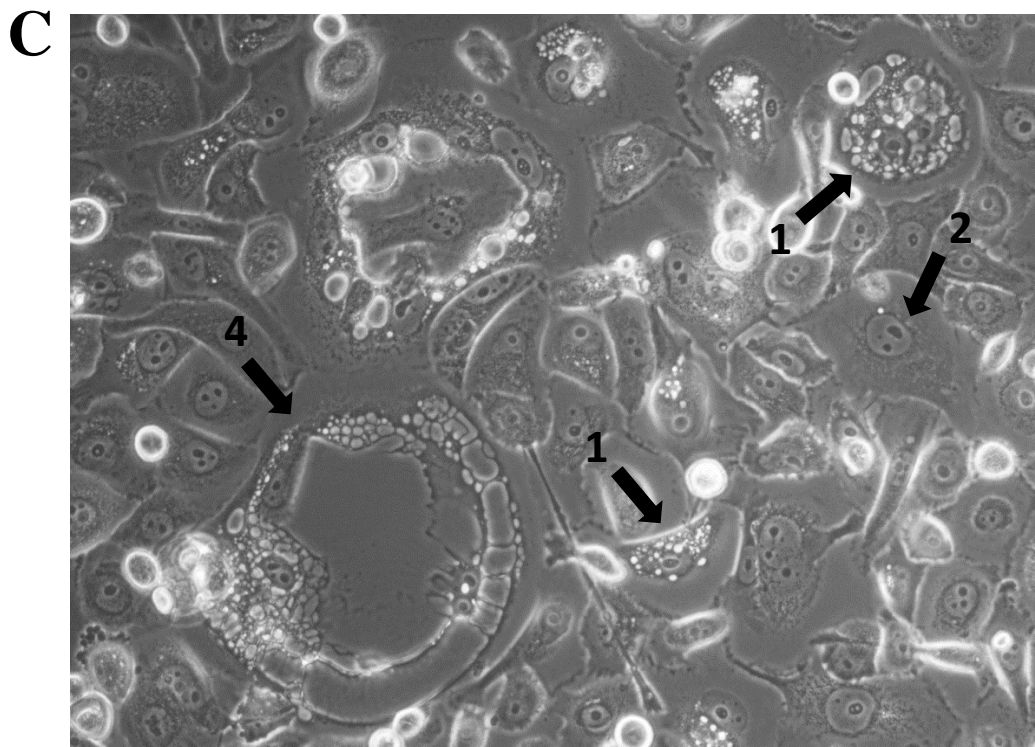
Conforme incrementó el tiempo de tratamiento, y en especial a las 60 horas, las células se caracterizaron por presentar, a diferencia de en el control (Figura A), gran tamaño, vesiculación masiva en el citoplasma (Figuras B y C, 1) y multinucleación (Figuras B y C, 2). Asimismo, encontramos puntualmente complejos celulares de gran tamaño con desestructuración celular (Figura C, 4). En presencia de NU7441 y al mismo tiempo de tratamiento (Figura D), las células presentaron, al igual que con mitoxantrona en solitario, gran tamaño celular, vesiculación (1) y multinucleación (2), aunque parecían estar en un estado de mayor parada del ciclo que con respecto a la mitoxantrona en solitario. En presencia de NU7441 tampoco se observaron apenas células apoptóticas.



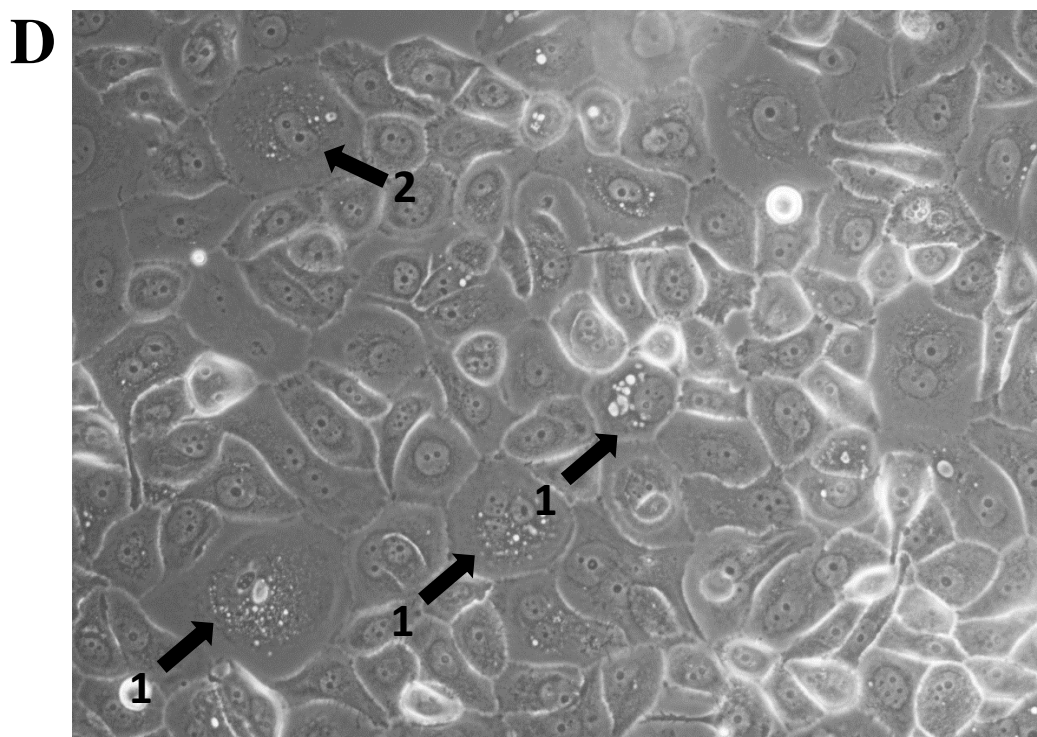
Control 60h



Mitoxantrona 60h



Mitoxantrona 60h

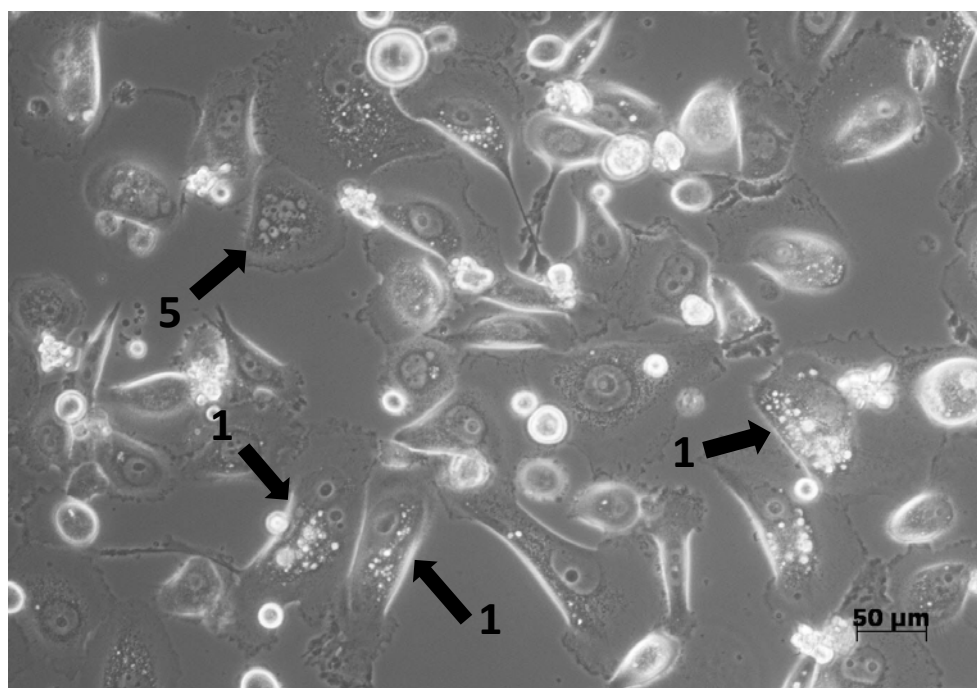


Mitoxantrona + NU7441 60h

Figura 5.52. Cambios morfológicos celulares observados en células tratadas con mitoxantrona en presencia o ausencia de NU7441. Imágenes obtenidas por Microscopía de células PC-3: A) control; B y C)

tratadas con mitoxantrona 0,3 μM durante 60 horas; D) tratadas con mitoxantrona 0,3 μM +NU7441 1 μM durante 60 horas. Las flechas indican: 1: vesiculación; 2: multinucleación; 3: célula en apoptosis; 4: complejo celular de gran tamaño con desestructuración celular.

Para confirmar las observaciones anteriores se trataron células PC-3 con mitoxantrona 0,3 μM durante 72 horas, y se observaron mediante microscopía “in vivo” o técnica de *time-lapse* entre las 24 y 72 horas de tratamiento. La imagen de la Figura 5.53 corresponde a una de las fotografías realizadas al cultivo celular en torno a las 70 horas. En ella se observa un gran número de células con vesiculación masiva, incluso mayor que el observado a las 60 horas de tratamiento (Figura 5.52, B). Asimismo, se observan células con desestructuración nuclear, probablemente correspondiente a un estadio posterior de muerte (5). Desde las 24 hasta las 72 horas de tratamiento la mayor parte de las células observadas no presentaron características de muerte por apoptosis.



Mitoxantrona 70h

Figura 5.53. Cambios morfológicos celulares observados por Microscopía “in vivo” o *time-lapse* en células tratadas con mitoxantrona. Imagen correspondiente a células PC-3 tratadas con mitoxantrona 0,3 μM y observada en torno a las 70 horas de tratamiento. La imagen se obtuvo mediante Microscopía “in vivo” o técnica *time-lapse*, siendo una de las fotografías realizadas al cultivo celular en un tiempo entre las 24 y 72 horas totales del tratamiento. Las flechas indican: 1: vesiculación; 5: complejo celular con desestructuración nuclear.

5.5.5. Análisis de expresión génica

Por último, y además de los ensayos llevados a cabo anteriormente sobre muerte celular que sugieren que la mitoxantrona y la combinación con inhibidores de DNA-PK no inducen señales características de apoptosis, se realizaron estudios de expresión génica mediante RT-qPCR Arrays, con el objetivo de esclarecer el tipo de muerte celular inducida por los tratamientos.

Para ello, se utilizó el RT-qPCR Array de muerte celular denominado *Human Cell Death PathwayFinder RT² Profiler PCR Array*. Así, se amplificaron las secuencias de 84 genes implicados en los principales mecanismos de muerte celular (apoptosis, autofagia y necrosis), así como 5 genes cuya expresión no se ve modificada y utilizados para la normalización de los datos (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 y RPLP0). Los arrays se llevaron a cabo con cDNAs obtenidos a partir de la retrotranscripción del mRNA de células PC-3: 1) control; o tratadas durante 14 horas con: 2) mitoxantrona; 3) mitoxantrona+NU7026; 4) mitoxantrona+NU7441. Los arrays de las muestras control y de las muestras con mitoxantrona se realizaron por duplicado, mientras que los arrays de los tratamientos combinados se realizaron una sola vez. Los resultados del análisis de los 84 genes observados en los diferentes tratamientos se muestran en la Tabla 10.1 (Anexos: Material suplementario).

Para estudiar la expresión diferencial de los genes en cada condición de tratamiento elegimos los valores cuyo cambio de expresión con respecto al control era de al menos 2 veces, considerando los valores mayores de 1,95 como regulación positiva del gen (marcados en rojo) y los menores de -1,95 como regulación negativa (marcados en azul). Según estas pautas, un total de 37 de los 84 genes presentaron diferencias de expresión con respecto al control en al menos uno de los tres tratamientos estudiados. Los resultados se muestran en la Tabla 5.14.

| Gen | Símbolo | Regulación (+/-) Mito | Regulación (+/-) Mito + NU7026 | Regulación (+/-) Mito + NU7441 |
|--|---------|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| ATG12 autophagy related 12 homolog (S. cerevisiae) | ATG12 | 1,50 | 2,29 | 1,45 |
| BCL2-associated X protein | BAX | -2,42 | -6,58 | -7,24 |
| B-cell CLL/lymphoma 2 | BCL2 | -1,40 | -1,95 | -2,69 |
| BCL2-related protein A1 | BCL2A1 | 1,29 | 2,61 | 1,62 |
| BCL2-like 1 | BCL2L1 | -1,53 | -1,97 | -2,43 |
| BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) | BCL2L11 | 1,12 | 2,07 | 1,19 |
| Baculoviral IAP repeat containing 2 | BIRC2 | 1,30 | 2,01 | 1,38 |
| Baculoviral IAP repeat containing 3 | BIRC3 | 3,61 | 6,60 | 4,30 |

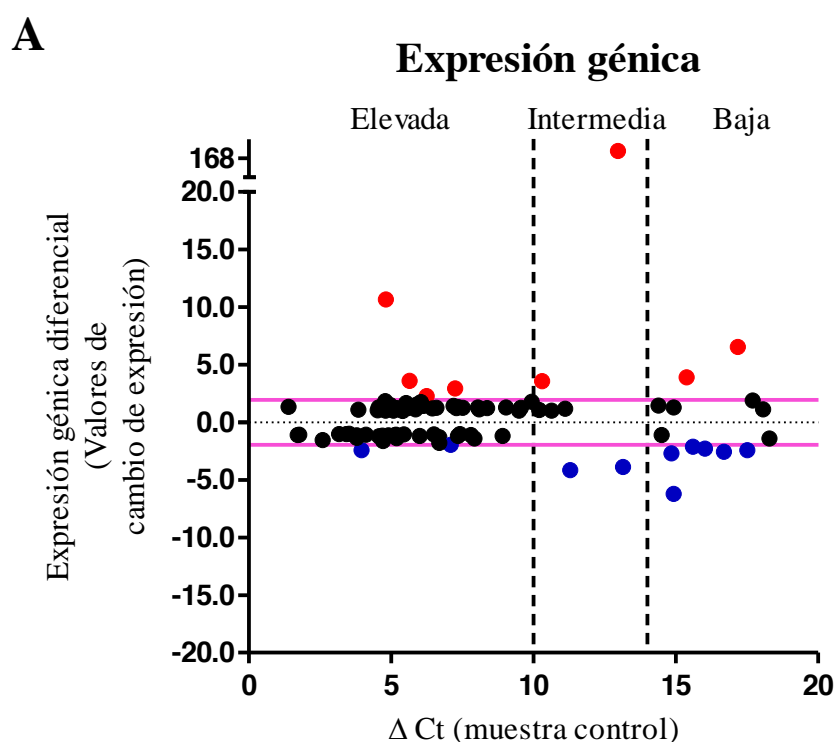
| | | | | |
|--|-----------|---------------|-----------------|----------------|
| Bcl2 modifying factor | BMF | 1,06 | 5,46 | 2,61 |
| Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase) | CASP1 | -4,15 | -1,18 | -1,47 |
| Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP9 | -1,94 | 1,23 | 1,05 |
| Coiled-coil domain containing 103 | CCDC103 | 1,28 | 2,59 | 2,90 |
| CD40 ligand | CD40LG | -2,69 | -2,07 | -5,62 |
| CASP8 and FADD-like apoptosis regulator | CFLAR | 1,42 | 2,08 | 1,79 |
| Cylindromatosis (turban tumor syndrome) | CYLD | 2,27 | 3,88 | 3,37 |
| Defensin, beta 1 | DEFB1 | 1,14 | 1,14 | -2,07 |
| Dihydropyrimidinase-like 4 | DPYSL4 | 1,24 | 2,65 | 2,25 |
| Estrogen receptor 1 | ESR1 | -1,19 | -2,24 | -3,02 |
| Fas ligand (TNF superfamily, member 6) | FASLG | -1,09 | -4,07 | -60,71 |
| Forkhead box I1 | FOXI1 | 1,45 | 1,95 | 1,27 |
| Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha | GADD45A | 10,67 | 13,37 | 7,59 |
| UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 (GalNAc-T5) | GALNT5 | -2,55 | -1,35 | 1,07 |
| Interferon, gamma | IFNG | -2,12 | -13,80 | -9,12 |
| Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) | IGF1 | -2,29 | -15,50 | -18,50 |
| Insulin-like growth factor 1 receptor | IGF1R | 168,39 | 10800,42 | 3680,84 |
| Insulin | INS | -3,88 | -12,84 | -21,93 |
| Immunity-related GTPase family, M | IRGM | 1,29 | 3,82 | -1,74 |
| Junctophilin 3 | JPH3 | -2,43 | -3,91 | -4,67 |
| Kv channel interacting protein 1 | KCNIP1 | -6,22 | -63,26 | -33,00 |
| Myelin associated glycoprotein | MAG | 6,54 | 2,16 | 2,97 |
| Olfactory receptor, family 10, subfamily J, member 3 | OR10J3 | 1,89 | -2,98 | -3,56 |
| Synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor) | SNCA | -1,79 | -1,83 | -2,02 |
| Tumor necrosis factor | TNF | 3,90 | 9,45 | 1,80 |
| Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b | TNFRSF11B | 3,57 | 2,67 | 2,53 |
| Tumor protein p53 | TP53 | 1,78 | 4,00 | 1,93 |
| Thioredoxin-like 4B | TXNL4B | 2,95 | 2,06 | 1,82 |
| Unc-51-like kinase 1 (C. elegans) | ULK1 | 1,75 | 3,71 | 2,30 |

Tabla 5.14. Expresión diferencial de genes en células tratadas con mitoxantrona en presencia o ausencia de NU7026 ó NU7441. Valores de cambio de expresión de los 37 genes (de un total de 84) que mostraron una regulación positiva o negativa con respecto al control en células PC-3 tratadas durante 14 horas con mitoxantrona 0,3 μ M en presencia o ausencia de NU7026 10 μ M ó NU7441 1 μ M, medidos mediante RT-qPCR array. En rojo se muestran los valores cuyo cambio de expresión es $> 1,95$ (regulación positiva); en azul se muestran los valores cuyo cambio de expresión es $< 1,95$ (regulación negativa). El array correspondiente al control y al tratamiento con mitoxantrona se realizó por duplicado, mientras que los arrays de los tratamientos combinados se realizaron una sola vez. Mito: mitoxantrona; Mito+NU7026: mitoxantrona+NU7026; Mito+NU7441: mitoxantrona+NU7441.

Puesto que las condiciones del experimento no nos permitieron realizar un triplicado y puesto que en ocasiones la variabilidad en las diferencias de expresión encontradas se debe a variaciones causadas por los bajos niveles de expresión de los genes, representamos gráficamente los valores de cambio de expresión de cada gen (expresados con respecto al control) frente al número de ciclos ó ΔC_T de cada gen en la muestra control, con el fin de localizar en qué zona de expresión se encuentran los genes que más cambian. En este análisis se consideró una expresión elevada cuando $\Delta C_T \leq 10$, intermedia cuando ΔC_T está entre 10-14 y baja cuando ΔC_T está entre 14-20. Cuando el número de ciclos es superior a 20, consideramos que no hay expresión. En la Figura 5.54 a Figura 5.56 se representan las correspondientes gráficas, así como unas tablas indicativas de los genes que se encuentran en cada zona de expresión, ordenados de mayor a menor en función de sus cambios de expresión.

La Figura 5.54 corresponde al estudio de la expresión diferencial de genes en células PC-3 tratadas con mitoxantrona durante 14 horas. En primer lugar observamos que este tratamiento indujo una regulación positiva con respecto al control de 8 genes. De entre ellos, y con niveles de expresión elevados, GADD45A, BIRC3, TXNL4B y CYLD mostraron cambios de expresión de 10,67, 3,61, 2,95 y 2,27 veces con respecto al control, respectivamente. Asimismo, y con niveles de expresión intermedios, IGF1R y TNFRSF11B presentaron diferencias de 168,69 y 3,57 veces, respectivamente. Las diferencias tan elevadas observadas para IGF1R se debieron, probablemente, a niveles bajos de muestra en el control, por lo que su expresión se comprobó posteriormente en experimentos de PCR en tiempo real. Por último, MAG y TNF mostraron cambios de expresión de 6,54 y 3,90 veces, respectivamente, aunque estas diferencias podrían deberse a sus bajos niveles de expresión.

En segundo lugar, el tratamiento con mitoxantrona indujo una regulación negativa con respecto al control de 10 genes. De entre ellos, destacaron CASP9, BAX, INS y CASP1 con cambios de expresión de -1,94, -2,42, -3,88 y -4,15 veces, respectivamente. Los genes IFNG, IGF1, JPH3, GALNT5, CD40LG y KCNIP1 fueron también regulados negativamente, aunque todos ellos presentaron una baja expresión génica.



B

MITOXANTRONA

| Expresión génica | | |
|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Elevada | Intermedia | Baja |
| 1. GADD45A (10,67) | 7. IGF1R (168,69) | 11. MAG (6,54) |
| 2. BIRC3 (3,61) | 8. TNFRSF11B (3,57) | 12. TNF (3,90) |
| 3. TXNL4B (2,95) | 9. INS (-3,88) | 13. IFNG (-2,12) |
| 4. CYLD (2,27) | 10. CASP1 (-4,15) | 14. IGF1 (-2,29) |
| 5. CASP9 (-1,94) | | 15. JPH3 (-2,43) |
| 6. BAX (-2,42) | | 16. GALNT5 (-2,55) |
| | | 17. CD40LG (-2,69) |
| | | 18. KCNIP1 (-6,22) |

Figura 5.54. Estudio de la expresión diferencial de genes en células tratadas con mitoxantrona. A) Representación gráfica de los 84 genes analizados mediante RT-qPCR array en células tratadas con mitoxantrona 0,3 μ M durante 14 horas. Cada punto corresponde a un gen individual. En la gráfica se representa la expresión diferencial de cada gen, medida como valores de cambio de expresión con respecto al control, frente al número de ciclos ó ΔC_T de cada gen en la muestra control. Los niveles de expresión se clasificaron como elevados ($\Delta C_T \leq 10$), intermedios (ΔC_T entre 10-14) o bajos (ΔC_T entre 14-20). En rojo se muestran los valores cuyo cambio de expresión es $> 1,95$ (regulación positiva); en azul se muestran los valores cuyo cambio de expresión es $< 1,95$ (regulación negativa). B) En la tabla se recogen los valores de cambio de expresión de los 37 genes que mostraron regulación positiva o negativa, ordenados de mayor a menor y clasificados en función de los niveles de expresión de cada gen (elevados, intermedios o bajos). En rojo se muestran los valores cuyo cambio de expresión es $> 1,95$ (regulación positiva); en azul se muestran los valores cuyo cambio de expresión es $< 1,95$ (regulación negativa). El array se realizó por duplicado, representando la media de los valores obtenidos.

La Figura 5.55 y la Figura 5.56 corresponden al estudio de la expresión diferencial de genes en células PC-3 tratadas durante 14 horas con mitoxantrona en combinación con NU7026 ó NU7441.

En primer lugar, observamos que los 8 genes regulados positivamente tras el tratamiento con mitoxantrona (GADD45A, BIRC3, TXNL4B, CYLD, IGF1R, TNFRSF11B, MAG y TNF; Figura 5.54), presentaron también una regulación positiva en presencia de NU7026 (Figura 5.55). El gen IGF1R mostró nuevamente un cambio de expresión muy elevado, causado probablemente por niveles bajos de muestra en el control. En segundo lugar, el tratamiento combinado con NU7026 indujo una regulación positiva de 12 genes más, entre los que destacaron ULK1, DPYSL4, BCL2A1, CCDC103, ATG12, CFLAR, BCL2L11 y BIRC2 con niveles elevados de expresión (Figura 5.55).

Por otra parte, 7 de los 10 genes regulados negativamente tras el tratamiento con mitoxantrona (Figura 5.54) fueron también regulados negativamente en presencia de NU7026 (BAX, INS, IFNG, IGF1, JPH3, CD40LG y KCNIP1; Figura 5.55). Por el contrario, en presencia de NU7026, CASP9, CASP1 y GALNT5 no mostraron diferencias relevantes con respecto al control. El tratamiento combinado con NU7026 indujo, además, una regulación negativa de 5 genes más, de entre los que destacaron BCL2, BCL2L1, ESR1 y FASLG (Figura 5.55).

Finalmente, en presencia de NU7441 (Figura 5.56), se observaron también diferencias de expresión con respecto al control. De nuevo se observó una regulación positiva de GADD45A, BIRC3, CYLD, IGF1R, TNFRSF11B y MAG. En cambio, los genes TXNL4B y TNF regulados positivamente con mitoxantrona no presentaron diferencias con respecto al control en presencia de NU7441. Además, el tratamiento indujo la regulación positiva de 4 genes más (CCDC103, ULK1, DPYSL4 y BMF).

En presencia de NU7441, BAX, INS, IFNG, IGF1, JPH3, CD40LG y KCNIP1 fueron también regulados negativamente con respecto al control, al igual que con mitoxantrona (Figura 5.56). Además, 7 genes más fueron regulados negativamente, de entre los que destacaron SNCA, BCL2L1, BCL2, ESR1 y FASLG con niveles elevados e intermedios de expresión. Nuevamente CASP9, CASP1 y GALNT5 no mostraron diferencias con respecto al control.

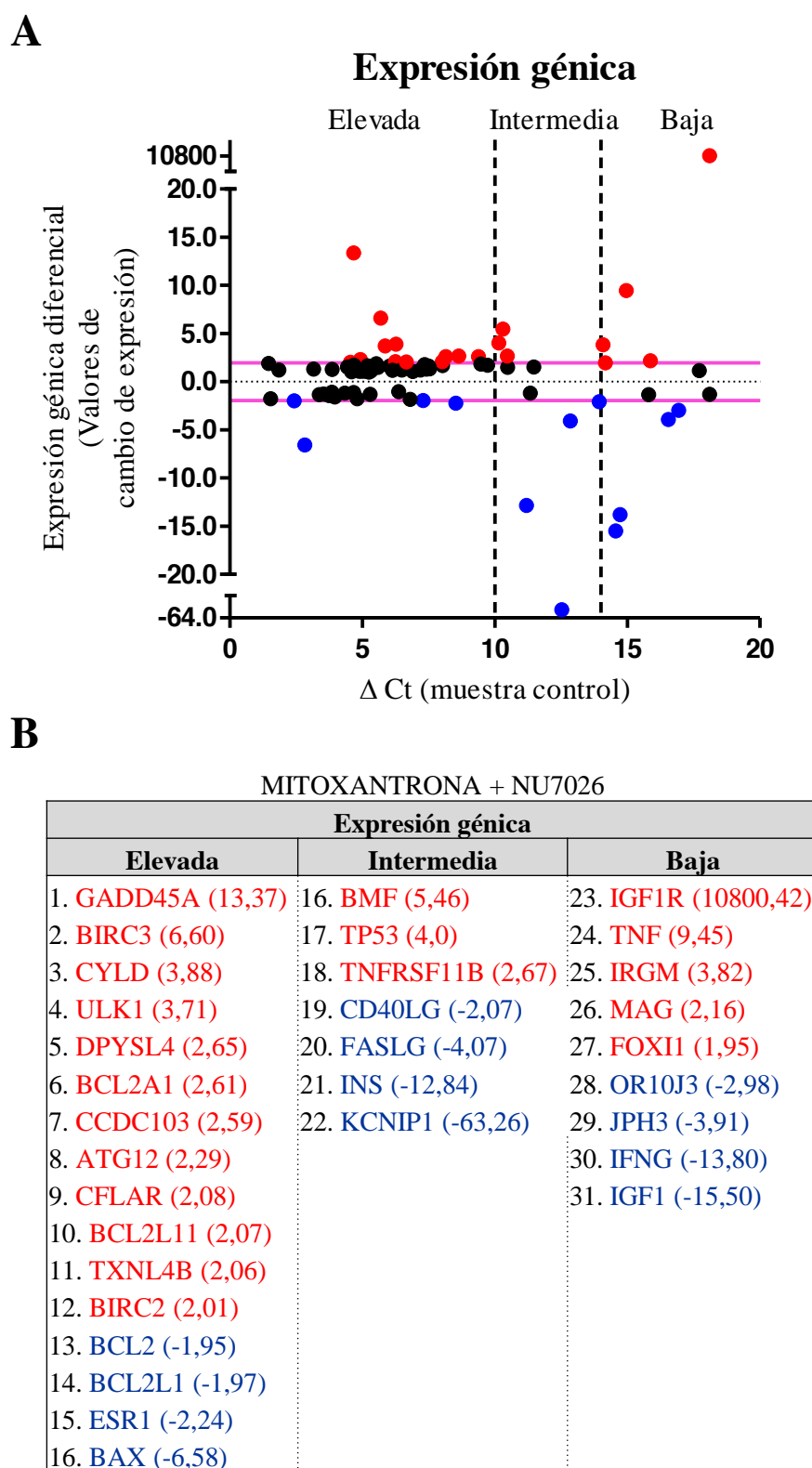
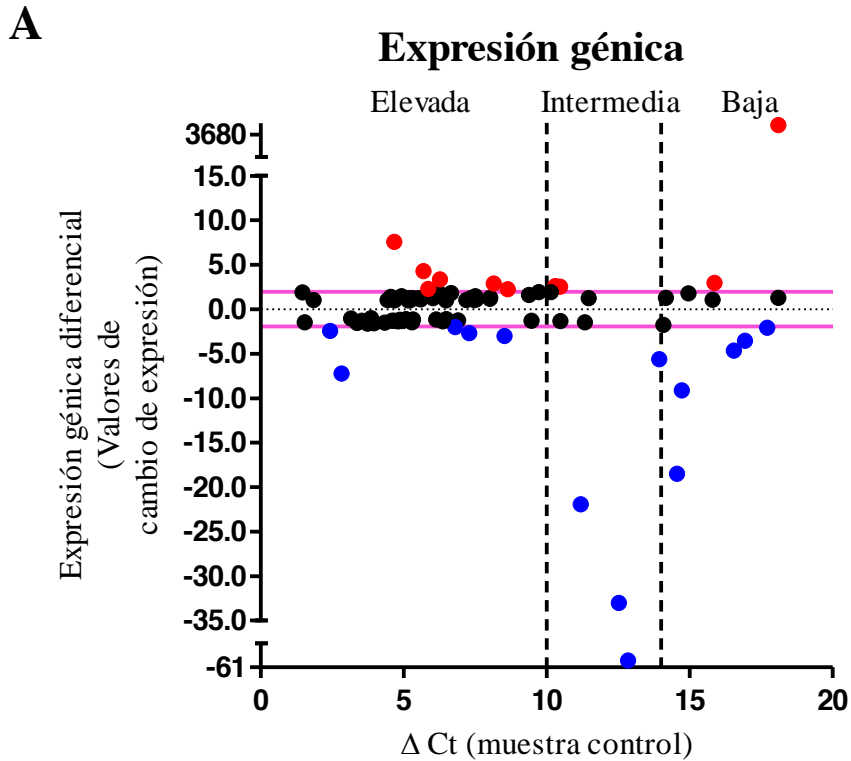


Figura 5.55. Expresión diferencial de genes en células tratadas con mitoxantrona + NU7026. A) Representación gráfica de los 84 genes analizados mediante RT-qPCR array en células tratadas con mitoxantrona 0,3 μ M+NU7026 10 μ M durante 14 horas. Cada punto corresponde a un gen individual. En la gráfica se representa la expresión diferencial de cada gen, medida como valores de cambio de expresión con respecto al control, frente al número de ciclos ó ΔC_T de cada gen en la muestra control. Los niveles de

expresión y la regulación positiva o negativa se clasificaron como en la gráfica anterior. B) En la tabla se recogen los valores de cambio de expresión de los 37 genes que mostraron regulación positiva o negativa, ordenados de mayor a menor y clasificados en función de los niveles de expresión de cada gen (elevados, intermedios o bajos). Array realizado una sola vez.



B

MITOXANTRONA + NU7441

| Expresión génica | | |
|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Elevada | Intermedia | Baja |
| 1. GADD45A (7,59) | 11. BMF (2,61) | 17. IGF1R (3680,84) |
| 2. BIRC3 (4,30) | 12. TNFRSF11B (2,53) | 18. MAG (2,97) |
| 3. CYLD (3,37) | 13. CD40LG (-5,62) | 19. DEFB1 (-2,07) |
| 4. CCDC103 (2,90) | 14. INS (-21,93) | 20. OR10J3 (-3,56) |
| 5. ULK1 (2,30) | 15. KCNIP1 (-33,0) | 21. JPH3 (-4,67) |
| 6. DPYSL4 (2,25) | 16. FASLG (-60,71) | 22. IFNG (-9,12) |
| 7. SNCA (-2,02) | | 23. IGF1 (-18,50) |
| 8. BCL2L1 (-2,43) | | |
| 9. BCL2 (-2,69) | | |
| 10. ESR1 (-3,02) | | |
| 11. BAX (-7,24) | | |

Figura 5.56. Expresión diferencial de genes en células tratadas con mitoxantrona + NU7441. A) Representación gráfica de los 84 genes analizados mediante RT-qPCR array en células tratadas con mitoxantrona 0,3 μ M+NU7441 1 μ M durante 14 horas. Cada punto corresponde a un gen individual. En la gráfica se representa la expresión diferencial de cada gen, medida como valores de cambio de expresión con respecto al control, frente al número de ciclos ó ΔC_T de cada gen en la muestra control. Los niveles de

expresión y la regulación positiva o negativa se clasificaron como en la gráfica anterior. B) En la tabla se recogen los valores de cambio de expresión de los 37 genes que mostraron regulación positiva o negativa, ordenados de mayor a menor y clasificados en función de los niveles de expresión de cada gen (elevados, intermedios o bajos). Array realizado una sola vez.

Para comprobar las diferencias de expresión de genes que habían presentado alguna discrepancia en los arrays realizados se realizaron experimentos de PCR en tiempo real. Así, se utilizaron oligonucleótidos prediseñados comercialmente para analizar la expresión de: BCL2L1, CASP9, FASLG, IGF1, IGF1R y TP53. En estos ensayos se utilizó ACTB para la normalización de los datos. La expresión de estos genes se llevó a cabo con cDNAs obtenidos por retrotranscripción del mRNA de células tratadas en las tres condiciones analizadas anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 5.15.

| Gen | Símbolo | Regulación (+/-) Mito | Regulación (+/-) Mito + NU7026 | Regulación (+/-) Mito + NU7441 |
|---|---------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| BCL2-like 1 | BCL2L1 | -1,25 ^{ns} | -1,32 ^{ns} | -1,16 ^{ns} |
| Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP9 | 1,33 ^{ns} | 2,60 ^{p=0,041} | 2,47 ^{p=0,018} |
| Fas ligand (TNF superfamily, member 6) | FASLG | 22,94 ^{ns} | 22,67 ^{ns} | 19,36 ^{ns} |
| Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) | IGF1 | 19,03 ^{p=0,026} | 20,25 ^{p=0,025} | 23,26 ^{p=0,026} |
| Insulin-like growth factor 1 receptor | IGF1R | 6,36 ^{p=0,009} | 8,69 ^{p=0,002} | 4,96 ^{p=0,007} |
| Tumor protein p53 | TP53 | 1,94 ^{ns} | 3,8 ^{p=0,004} | 2,31 ^{p=0,039} |

Tabla 5.15. Expresión diferencial de BCL2L1, CASP9, FASLG, IGF1, IGF1R y TP53. Valores de cambios de expresión con respecto al control de los genes BCL2L1, CASP9, FASLG, IGF1, IGF1R y TP53, medidos mediante RT-qPCR en células tratadas con mitoxantrona 0,3 μ M en presencia o ausencia de NU7026 10 μ M ó NU7441 1 μ M. En rojo se muestran los valores cuyo cambio de expresión es > 1,95 (regulación positiva). Cada una de las muestras se analizó por triplicado en cada reacción de RT-qPCR, realizando dos repeticiones independientes para BCL2L1 y tres repeticiones independientes para el resto de los casos. Mito: mitoxantrona; Mito+NU7026: mitoxantrona+NU7026; Mito+NU7441: mitoxantrona+NU7441.

Los resultados mostraron que el tratamiento con mitoxantrona indujo la regulación positiva con respecto al control de IGF1 y de IGF1R, con aumentos de expresión de 19,03 ($p=0,026$) y 6,36 ($p=0,009$) veces, respectivamente. En presencia de NU7026 y NU7441 ambos genes también fueron regulados positivamente. En el caso de CASP9 y TP53, solamente presentaron regulación positiva en presencia de los inhibidores de DNA-PK. Por otra parte, tanto FASLG como BCL2L1 no presentaron diferencias de expresión con respecto al control.

El análisis en conjunto de los datos obtenidos mediante RT-qPCR arrays y mediante RT-qPCR mostró que el tratamiento con mitoxantrona induce un aumento de expresión destacado de GADD45A, indicativo del daño sustancial en el DNA. Asimismo, el tratamiento

induce una regulación negativa de genes como BAX o CASP1, así como una ausencia de cambios de expresión de genes como CASP3, CASP6, CASP7, CASP9, FAS y FASLG. Esto, junto con el aumento de expresión provocado de BIRC3, TXNL4B, IGF1R o TNFRSF11B, corroboraría los resultados obtenidos hasta ahora, que sugieren que la mitoxantrona no induce señales características de apoptosis en células PC-3.

El tratamiento combinado con los inhibidores de DNA-PK mostró resultados muy similares, con un aumento de expresión de GADD45A, BIRC3, TXNL4B (en el caso de NU7026), IGF1R o TNFRSF11B, así como una regulación negativa de BAX. Esto, junto con la ausencia de cambios de expresión de genes que codifican para caspasas, de FAS y FASLG, sugiere que la combinación con NU7026 o NU7441 tampoco induce señales características de muerte celular por apoptosis.

6. DISCUSIÓN

Aunque un elevado número de remisiones pueden alcanzarse en pacientes con cáncer de próstata (CaP) con terapias de primera línea, como la cirugía, radioterapia, antiandrógenos o sus combinaciones (Shaheen et al, 2011), el progreso natural de la enfermedad es hacia un estado refractario a la terapia hormonal (Denis & Griffiths, 2000), donde la quimioterapia es el tratamiento más eficaz pero todavía no curativo (Melia, 2005). Esta resistencia destaca la importancia de identificar nuevas dianas terapéuticas que puedan incrementar la sensibilidad de las células CaP y, por tanto, las tasas de respuesta y supervivencia global de los pacientes.

El DNA es la principal diana de muchos agentes antitumorales convencionales, y la inhibición de la reparación del DNA una de las estrategias más prometedoras en la terapia del cáncer actual. Muchos inhibidores de la reparación del DNA están siendo ensayados clínicamente, tanto en combinación con agentes genotóxicos como en solitario (Tavecchio et al, 2012). De particular interés son los inhibidores de los sistemas de reparación de roturas de doble cadena (DSB), ya que las DSB se consideran lesiones extremadamente letales del DNA, y porque una sola DSB sin reparar puede ser potencialmente capaz de matar a la célula (Lisby & Rothstein, 2009). Para reparar las DSB, dos grandes mecanismos han evolucionado: la recombinación de extremos no homólogos (NHEJ) y la recombinación homóloga (HR), y sus componentes principales se convierten por tanto en dianas para la síntesis de inhibidores en terapias de tratamiento del cáncer. Entre los factores involucrados en NHEJ y HR, DNA-PK y ATM son de especial interés por su papel clave en estos procesos, por lo que constituyen una diana atractiva para la sensibilización de las células cancerosas a agentes inductores de daño.

El objetivo principal de este trabajo fue investigar el efecto de la combinación de inhibidores de la reparación del DNA con fármacos inhibidores de TOP2 y fármacos antimitóticos en la línea tumoral de próstata PC-3.

6.1. Efecto de los fármacos en solitario

En primer lugar, se estudió el efecto de los fármacos por separado. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que los inhibidores de TOP2 mitoxantrona y doxorubicina presentan un efecto citotóxico y una consecuente muerte celular dependiente de la concentración en la línea celular PC-3. Asimismo, inducen una parada del ciclo celular en las fases S y G₂/M, respectivamente. En varias publicaciones se ha demostrado la eficacia terapéutica de la mitoxantrona, utilizada principalmente para el tratamiento de cáncer de mama, próstata, leucemias y linfomas (Alberts et al, 1985; Faulds et al, 1991; Hande, 1998; Nitiss, 2009). La mitoxantrona es también efectiva para el tratamiento de carcinoma hepático,

de ovario y para la esclerosis múltiple (Faulds et al, 1991). Asimismo, se ha documentado la capacidad de la mitoxantrona de producir retrasos en la progresión del ciclo celular proporcionales a la concentración y tiempo, y aunque carece de especificidad de fase del ciclo celular, es más citotóxica para las células en la fase S tardía (Faulds et al, 1991). Nuestros resultados de citometría de flujo en células PC-3 y células PC-3 sincronizadas corroboraron estos datos. En cuanto a la doxorubicina, en varias publicaciones se ha demostrado la eficacia terapéutica de este compuesto, utilizado como fármaco de primer uso en el tratamiento de pacientes con linfomas, cáncer de mama y sarcomas, así como en de cáncer de pulmón, estómago, ovario, tiroides y mielomas (Arcamone et al, 1969; Cortes-Funes & Coronado, 2007; Hande, 1998; Weiss, 1992). Asimismo, se ha documentado la capacidad de este fármaco de generar daño en el DNA seguido por una detención del ciclo celular en las fases G₁ y G₂ (Heger et al, 2013), y en el caso de células PC-3 induciendo un bloqueo del ciclo en la fase G₂/M (Shaheen et al, 2011). Nuestros resultados concuerdan con este último caso.

A nivel de daño en el DNA, los ensayos de cometa en condiciones alcalinas confirmaron la presencia de DSB tras el tratamiento con mitoxantrona. Estos datos concuerdan con las propiedades farmacodinámicas del fármaco, que lo describen como un agente intercalante del DNA que genera DSB mediante la estabilización del complejo TOP2-DNA y mediante la generación de radicales libres (Faulds et al, 1991; Nitiss, 2009). Estos resultados se confirmaron con los ensayos de formación de acúmulos de γ H2AX tras el tratamiento con mitoxantrona (datos no mostrados). En la literatura se ha demostrado que, tras el tratamiento con inhibidores de TOP2, solamente las DSB del DNA y las horquillas de replicación bloqueadas, pero no los complejos TOP2-DNA, forman acúmulos de γ H2AX (Kantidze et al, 2006). Por tanto, nuestros resultados demuestran que los complejos TOP2-DNA inducidos por la mitoxantrona se han convertido en DSB permanentes y/u horquillas de replicación bloqueadas.

En el caso de la doxorubicina, se observó un incremento en la longitud de las colas de los cometas dependiente de la concentración. Además, el tratamiento con este fármaco indujo la formación de acúmulos de γ H2AX, con un aumento progresivo en las primeras horas, indicando por tanto que la doxorubicina induce DSB y coincidiendo con lo descrito en la literatura para este fármaco (Nitiss, 2009; Ross et al, 1978). La persistencia de los niveles de γ H2AX a tiempos mayores indica que solamente está teniendo lugar una reparación parcial del daño inducido. Estos datos entran en consonancia en parte con lo observado por Shaheen y colaboradores, que demuestran que la doxorubicina e IR inducen un incremento de γ H2AX en

el tiempo en células LNCaP y PC-3, pero tras 24 horas de tratamiento se observa una reparación casi completa de las DSB en ensayos de cometa en condiciones neutras (Shaheen et al, 2011). Esto podría deberse a que, en nuestro caso, los ensayos de cometa se realizaron en condiciones alcalinas, que según Olive y colaboradores permiten la detección de SSB y DSB, a diferencia del ensayo en condiciones neutras, que tan sólo detecta DSB (Olive & Banath, 2006). No obstante y según otros investigadores, el ensayo en condiciones neutras no es exclusivo de DSB (www.cometassay.com), por lo que podría deberse a otros factores.

En este trabajo se evaluó también el efecto de los fármacos antimetabólicos vincristina y paclitaxel en la línea tumoral PC-3, sobre la que presentaron un efecto citotóxico dependiente de la concentración. En la actualidad la vincristina ha mostrado su efecto citotóxico en el tratamiento de diferentes leucemias, linfomas y tumores sólidos (Dumontet & Jordan, 2010). El paclitaxel se utiliza para el tratamiento de tumores de ovario, mama y próstata, entre otros (Dumontet & Jordan, 2010). Ambos fármacos indujeron una parada del ciclo celular en fase de mitosis, como está documentado (Janssen & Medema, 2011). Asimismo, ambos tratamientos no indujeron DSB en los ensayos de cometa. Éste fue un experimento importante ya que los efectos de la inhibición de la DNA-PK habían sido fundamentalmente demostrados en combinación con agentes que dañan el DNA, por lo que para estudiar la combinación con vincristina y paclitaxel fue necesario confirmar que éstos no inducen roturas en el DNA. Esto es posible debido a que los fármacos antimetabólicos actúan estimulando el ensamblaje y estabilización de los microtúbulos, agregándolos en tal grado que la salida del DNA de la célula en la electroforesis es impedida.

Finalmente se evaluó el efecto por separado de los inhibidores de DNA-PK y de ATM. Los resultados mostraron que NU7026, NU7441 y KU55933 inducen un efecto citotóxico dependiente de la concentración en la línea PC-3, tal y como se ha descrito en la literatura en otras líneas celulares (Shaheen et al, 2011; Willmore et al, 2004; Zhao et al, 2006). Las concentraciones elegidas para combinar estos compuestos con otros fármacos fueron 10, 1 y 10 μM respectivamente ya que, según la literatura, resultaron ser mínimamente tóxicas y óptimas para la inhibición de DNA-PK y ATM (Hickson et al, 2004; Veuger et al, 2003; Willmore et al, 2004; Zhao et al, 2006). La concentración de 1 μM para NU7441 no presentó toxicidad, al igual que lo observado por Shaheen y colaboradores en PC-3 (Shaheen et al, 2011). Por otra parte, la concentración de 10 μM para NU7026 y KU55933 redujeron un 30% y un 22% la viabilidad celular, respectivamente, algo más que lo descrito en la literatura para NU7026 en leucemia (Willmore et al, 2004) y para KU55933 en PC-3 (Shaheen et al, 2011).

La distribución de fases del ciclo celular en presencia de NU7441 no presentó cambios con respecto al control, mientras que NU7026 y KU55933 bloquearon levemente el ciclo en la fase G₀/G₁. En esta línea, en células PC-3 no se han descrito cambios tras el tratamiento con NU7441 y KU55933 en solitario (Shaheen et al, 2011), aunque otros estudios en líneas tumorales de colon SW620 y LoVo mostraron un incremento en G₁ en presencia de NU7441 (Zhao et al, 2006). Por otra parte, los ensayos de cometa no mostraron inducción de DSB en presencia de los inhibidores en solitario, como se describe en la literatura (Shaheen et al, 2011; Willmore et al, 2004; Willmore et al, 2008).

6.2. Efecto de la combinación de fármacos

El tratamiento de las células PC-3 con mitoxantrona y doxorubicina resultó en una disminución de la proliferación dependiente de la dosis, y este efecto fue potenciado tras una co-incubación con NU7026 y NU7441, indicando que la ausencia de DNA-PK incrementa la sensibilidad de estas células a los agentes inhibidores de TOP2. Esto coincide con lo observado previamente en la literatura en ensayos “in vitro” tras la combinación de fármacos como mitoxantrona, etopósido, doxorubicina o mAMSA con NU7026 en células K562 de leucemia (Willmore et al, 2004). Asimismo, se ha descrito que NU7441 potencia el efecto de IR y doxorubicina en células tumorales de próstata LNCaP (p53 nativa) y PC-3 (p53 nulas) (Shaheen et al, 2011) y en células tumorales de mama (Ciszewski et al, 2014), así como el efecto de la mitoxantrona en células de pacientes con leucemia linfocítica crónica (Elliott et al, 2011). También se ha demostrado que NU7441 aumenta la sensibilidad a etopósido e IR en células competentes para DNA-PK pero no en células deficientes para esta proteína (Zhao et al, 2006).

La combinación de NU7026 ó NU7441 con mitoxantrona en la línea celular ensayada potenció 12 y 18 veces su citotoxicidad, respectivamente, mientras que la combinación con doxorubicina no indujo un incremento significativo en su valor de EC₅₀. Estas variaciones en la dosis media efectiva podrían explicarse por los diferentes mecanismos de acción de estos fármacos y por cómo ejercen su efecto citotóxico. Así, la mitoxantrona es capaz de intercalarse directamente en el complejo DNA-TOP2 α ó β a través de citosinas o timidinas del DNA del sitio de escisión (Capranico et al, 1993), mientras que la doxorubicina solo se intercala en el complejo DNA-TOP2 α a través de adeninas (Capranico et al, 1990). Además, la combinación de mitoxantrona con NU7026 ó NU7441 mostró un efecto sinérgico en la reducción del número de células, siendo este trabajo el único en la literatura que refiere el efecto sinérgico entre estos fármacos aportando datos de índices de combinación.

Recientemente se ha demostrado que, además de su papel en la reparación del DNA, DNA-PK desempeña un papel importante en la estabilización de la formación del huso mitótico y en la prevención de la catástrofe mitótica (Shang et al, 2010). En este contexto, establecimos la hipótesis de que la inhibición de DNA-PK sensibilizaría a las células a los agentes que interfieren con los microtúbulos (MIAs). Nuestros resultados mostraron que el tratamiento de las células con vincristina y paclitaxel reduce la proliferación celular de manera dependiente de la dosis, y este efecto es potenciado por NU7026 y NU7441, indicando que la ausencia de la DNA-PK aumenta la sensibilidad de las células PC-3 a los fármacos antimitóticos. La combinación de NU7026 ó NU7441 con vincristina potenció 44 y 3,5 veces su citotoxicidad, respectivamente, mientras que la combinación con paclitaxel no indujo un incremento significativo en su valor de EC50. Estos resultados muestran concordancia con resultados recientes, que describen una sensibilización de células CCRF-CEM y CCRF-CEM VCR/R de leucemia a la vincristina en presencia de NU7441 (Mould et al, 2014). Además, este estudio también es el único en la literatura en evaluar el efecto de la combinación de fármacos antimitóticos con NU7026 ó NU7441 en células tumorales de próstata. A pesar de la potenciación observada con vincristina en presencia de NU7026, el efecto de la combinación con inhibidores de TOP2 fue más acusado en presencia de NU7026 y NU7441, por lo que se eligieron los inhibidores de TOP2 para continuar con los ensayos de combinación.

El papel clave de la DNA-PK y de la ATM en la reparación de las DSB del DNA en células de mamíferos sugiere que inhibiendo la función de una o ambas proteínas debería aumentar el número de DSB tras un tratamiento inductor de daño (Tavecchio et al, 2012). Los resultados de los ensayos cometa en condiciones alcalinas mostraron que la inhibición de DNA-PK o ATM incrementa levemente la longitud de las colas observadas pero solamente a concentraciones bajas de mitoxantrona y en general sin significación estadística. Estos resultados concuerdan en parte con lo observado en ensayos de cometa en condiciones neutras por Shaheen y colaboradores en estas células, en las que el tratamiento combinado de IR con NU7441 ó KU55933 durante 24 horas no indujo un incremento significativo del número de DSB con respecto al tratamiento con IR en solitario. No obstante, ellos sí observaron un incremento significativo en el número de DSB a ese tiempo tras el tratamiento combinado de doxorubicina y KU55933 (Shaheen et al, 2011). Por otra parte, el tratamiento con doxorubicina y NU7441 ó con mitoxantrona y NU7026 no indujo cambios significativos en la acumulación de γ H2AX; tan sólo incrementos leves. En células LNCaP y PC-3 tratadas con IR

o doxorubicina en presencia de DNA-PK inhibida sí se habían observado diferencias significativas en los niveles de γ H2AX (Shaheen et al, 2011).

Según la literatura, la fosforilación de H2AX está mediada por los tres miembros principales de la familia PIKK: ATM (Burma et al, 2001; Wang et al, 2005), ATR (Anderson et al, 2001; Chanoux et al, 2009) y DNA-PKcs (An et al, 2010; Park et al, 2003), teniendo todos ellos el potencial de fosforilar H2AX cuando los otros están genéticamente comprometidos (Andegeko et al, 2001; Burma et al, 2001; Stiff et al, 2004; Wang et al, 2005). En los ensayos anteriores, el incremento de la señal de pH2AX en presencia de DNA-PK inhibida sugirió que ATM podría ser la quinasa responsable de esta fosforilación. El estudio de la señal de pH2AX en presencia de los inhibidores NU7441 y KU55933 por separado o en combinación mostró que la inhibición de la DNA-PK incrementa los niveles de pH2AX tras el tratamiento con doxorubicina, mientras que la inhibición de ATM tanto en presencia como en ausencia de DNA-PK inhibida los disminuye considerablemente. Esto implica que la inhibición de DNA-PK incrementa la señal de pH2AX, puesto de manifiesto anteriormente, mientras que la disminución de γ H2AX en presencia de ATM inhibida no es una consecuencia de una menor generación de DSB, como demuestran los ensayos de cometa, sino que es consistente con datos que sugieren que ATM es la principal quinasa que fosforila H2AX y que DNA-PK puede fosforilar H2AX sólo en ausencia de ATM, pero no en presencia de ATM inhibida químicamente (Kinner et al, 2008). No obstante, podrían realizarse experimentos de desfosforilación *in vitro* para corroborar los resultados.

Los resultados de los experimentos de reparación de DSB mostraron que la inhibición de la DNA-PK inhibe parcialmente la reparación de roturas de doble cadena inducidas con mitoxantrona. Este resultado coincide con el descrito por Tavecchio y colaboradores en células M059-Fus-1 (competentes para DNA-PK), las cuales reparan casi en su totalidad las roturas inducidas por IR en las 24 horas siguientes al tratamiento, mientras que en presencia de NU7441 se retrasó la desaparición de acúmulos de γ H2AX, con al menos un 32% restante a las 24 horas (Tavecchio et al, 2012). También, con lo descrito por Ciszewski y colaboradores en células MCF-7, MDA-MB-231 y T47D de cáncer de mama tratadas con IR, las cuales fueron incapaces de reparar el 90% de las DSB durante las 24 horas de incubación con NU7441 (Ciszewski et al, 2014).

En la literatura se ha sugerido que, cuando la DNA-PK está defectuosa o inhibida, las células son más dependientes del sistema de recombinación homóloga para reparar las roturas de doble cadena en el DNA (Shrivastav et al, 2009). Los resultados de la actividad de HR

medida a través de la detección de acúmulos de Rad51 mostraron, sorprendentemente, que la inhibición de la DNA-PK a través de NU7026 reduce en gran medida la señal de Rad51 inducida tras el tratamiento con mitoxantrona, inhibiendo por tanto la actividad de HR. En la literatura, observaciones publicadas de niveles mayores de Rad51 en células defectuosas para DNA-PK (Shrivastav et al, 2009) apoyaban la hipótesis inicial de que cuando DNA-PK está inhibida o defectuosa las células son más dependientes de HR para reparar las DSB. Sin embargo, la reducción de la actividad de HR podría deberse a que, en presencia de NU7026, la DNA-PK permanece unida a las DSB, obstruyendo el acceso de otras proteínas reparadoras como Rad51. Esta explicación estaría en consonancia con estudios que sugieren que la inhibición de la DNA-PK obstruye el acceso de PARP-1 al DNA (Veuger et al, 2004), y corroborada por resultados en los que se observó una reducción de acúmulos de Rad51 en células M059-Fus-1 y SW620 tratadas con IR y NU7441 (Tavecchio et al, 2012).

Además de desempeñar un papel importante en la reparación mediada por NHEJ de las DSB, se ha demostrado recientemente que la DNA-PK está involucrada en el mantenimiento de la estabilidad de la formación del huso mitótico y en la prevención de la catástrofe mitótica (Shang et al, 2010). En este contexto, se ha demostrado que un gran número de proteínas de respuesta al daño en el DNA están relacionadas con la estabilización del centrosoma y la construcción del huso, así como en la regulación negativa de la muerte celular, y cuya inactivación puede facilitar la inducción de catástrofe mitótica. Entre estas proteínas se encuentra Chk2 (Castedo et al, 2004). Ante la hipótesis de que la DNA-PK podría estar funcionalmente asociada con Chk2 en el mantenimiento de la estabilidad de la formación del huso en situaciones de daño en el DNA, nuestros resultados mostraron, en primer lugar, una disminución de la señal de pChk2 en presencia de KU55933 y KU55933+NU7441, indicando que ATM sería la principal quinasa responsable de su fosforilación. Asimismo, mostraron una disminución en la señal de la fosfoproteína en presencia de NU7441, sugiriendo que la inhibición de la DNA-PK inhibe parcialmente la fosforilación de Chk2 y sugiriendo, por tanto, una asociación funcional entre ambas. Estos resultados son los únicos encontrados en la literatura en células tumorales de próstata y concuerdan con los descritos por Shang y colaboradores en células HeLa y AT5BIVA, en los que la inactivación de la DNA-PKs por siRNA ó NU7026 redujo la fosforilación de Chk2 inducida por IR (Shang et al, 2010). También concuerdan con publicaciones anteriores que describen cómo la DNA-PKs regula la fosforilación de Chk2 en células deficientes para ATM (Tomimatsu et al, 2009).

En último lugar, se realizaron en este trabajo estudios de muerte celular con el objetivo de evaluar el tipo de muerte celular inducida por la mitoxantrona y por su combinación con los inhibidores de la DNA-PK. Así, los resultados de los ensayos de marcaje con Anexina V mostraron que ni la mitoxantrona ni la combinación con los inhibidores de la DNA-PK inducen señales de activación de apoptosis temprana en las primeras 48 horas. En este tiempo y en las mismas condiciones tampoco se observó activación de las caspasas efectoras 3 y 7, enzimas críticas en la cascada de señalización de la apoptosis (Inoue et al, 2009). Los ensayos de marcaje mitocondrial mostraron que la mitoxantrona tan sólo induce señales muy leves de apoptosis a las 72 horas de tratamiento, siendo similar en presencia de DNA-PK inhibida. Por último, tampoco se observaron señales morfológicas de apoptosis en las células tratadas en estas condiciones y tiempo en los resultados de microscopía y *time-lapse*. En la literatura se han encontrado varias publicaciones que contradicen estos resultados. Así, publicaciones antiguas argumentan que la sensibilidad celular a agentes que dañan el DNA refleja la muerte celular por apoptosis (Jaffrezou et al, 1998; Martin & Green, 1994; Perego et al, 2001; Wu & El-Deiry, 1996; Zunino et al, 1997). Asimismo, se describe que la mitoxantrona y la doxorubicina inducen muerte celular mediante la formación de DSB permanentes, que causan parada del ciclo celular y desencadenan muerte celular programada mediada por p53 (Muller et al, 1998). Otras publicaciones argumentan que el daño en el DNA inducido por los complejos DNA-TOP2 son seguidos de una parada en el ciclo celular en las fases G₁ y G₂ y de una entrada en apoptosis (Heger et al, 2013; Perego et al, 2001). También, y según la literatura, los inhibidores de TOP2 bloquean eficazmente la transcripción y la replicación, las DSB son detectadas rápidamente y las células, posteriormente, entran en apoptosis (Nitiss, 2009).

Sin embargo, y aunque ha sido ampliamente aceptado que el daño en el DNA puede desencadenar muerte celular por apoptosis, entre los genes que influyen en la respuesta apoptótica parece que p53 y bcl-2 son cruciales (Perego et al, 2001). El gen p53 en su estado nativo participa en la respuesta celular a agentes que dañan el DNA, a través de la regulación de la progresión del ciclo celular, la reparación del DNA y la apoptosis (Harris, 1996). Sin embargo, la mutación de este gen se ha relacionado con resistencia a fármacos debido a una capacidad reducida de las células para activar la respuesta apoptótica (Perego et al, 1996). Las células PC-3 utilizadas en nuestro trabajo carecen de proteína p53 funcional, debido a una mutación con cambio de pauta del gen causada por una delección en el codón 138 y por pérdida del otro alelo (Isaacs et al, 1991). La falta de p53 funcional podría no estar desencadenando la activación de los procesos de apoptosis ante los fármacos inductores de daño, como la mitoxantrona o los inhibidores de DNA-PK. Este hecho también estaría corroborado en la

literatura por Norbury y colaboradores, que argumentan que la pérdida de función de reguladores proapoptóticos como p53 y/o la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 pueden inclinar la balanza a favor de la supervivencia de la célula tumoral tras un terapia con agentes inductores de daño en el DNA (Norbury & Zhivotovsky, 2004) (Figura 6.1). También, Shaheen y colaboradores describen que la presencia de p53 en células LNCaP indujo un gran incremento de la población apoptótica con dosis altas de doxorubicina en presencia de DNA-PK y ATM inhibidas (a las 48 horas), mientras que en ausencia de p53 en células PC-3 en las mismas condiciones de tratamiento no se observó un incremento de la muerte celular. A dosis bajas de doxorubicina, la población apoptótica incrementó en LNCaP tras 48 horas, frente a las 96 horas que fueron necesarias en PC-3 para observar estas señales apoptóticas (Shaheen et al, 2011). Estos resultados sugieren que la ausencia de apoptosis observada con mitoxantrona tanto en solitario como en combinación con los inhibidores de DNA-PK podría deberse a la pérdida de función de p53.

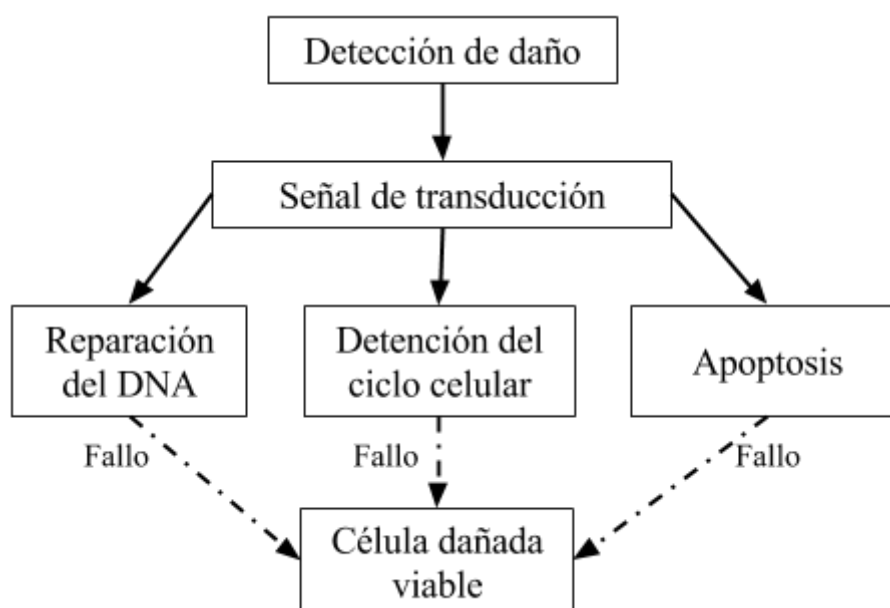


Figura 6.1. Mecanismos de vida o muerte tras el daño en el DNA. Detección de daño y mecanismos de transducción de señales comunes son compartidos entre vías que regulan la reparación del DNA, la activación de los puntos de control del ciclo celular y la apoptosis. Las consecuencias de cualquier nivel de daño en el DNA son específicas de cada tipo celular. La supervivencia y proliferación de células con DNA dañado contribuye al fracaso de estos procesos y a la tumorigénesis y resistencia al cáncer. Figura tomada de Norbury and Zhivotovsky (2004).

Por último, los estudios de expresión génica mostraron que las células tratadas con mitoxantrona no presentan un patrón diferencial de expresión de genes apoptóticos con

respecto al control. Así, en primer lugar, el tratamiento con mitoxantrona indujo un incremento en la expresión de los genes antiapoptóticos BIRC3, IGF1R y TNFRSF11B.

BIRC3 es miembro de la familia de inhibidores de apoptosis e interfiere con la activación de las caspasas (GrandPre et al, 2002). Esta inhibición se produce a través de la unión a los receptores del TNF (del inglés *Tumor Necrosis Factor*) TRAF1 y TRAF2, probablemente interfiriendo con la activación de las proteasas ICE (Uren et al, 1996). Actúa como una proteína ubiquitina ligasa E3, regulando la señalización de NFκB (Zhou et al, 2013) y de proteínas como RIPK1, RIPK2, RIPK3, RIPK4, CASP3, CASP7, CASP8, IKBKE, TRAF1 y BCL10 (Bertrand et al, 2011).

IGF1R es un receptor transmembrana de tipo tirosina quinasa que se une al factor de crecimiento insulínico tipo 1 con una alta afinidad. Este receptor desempeña un papel crítico en eventos de transformación y en la progresión del ciclo celular. Está altamente sobreexpresado en la mayoría de tejidos malignos, donde funciona como un agente antiapoptótico y potenciador de la supervivencia celular. La proteína p53 mutante tiene un efecto estimulante sobre la actividad del promotor de IGF1R, mientras que p53 en su estado nativo suprime la actividad del mismo (Pop et al, 2006). En la literatura se describe que IGF1R está implicado en cáncer de mama, próstata y pulmón (Frosig et al, 2007; Miura et al, 1993; Thornberry et al, 1992), y que en la mayor parte de los tumores primarios y metastásicos de pacientes con cáncer de próstata se encuentran niveles de expresión muy elevados de IGF1R (Thornberry et al, 1992). En algunos casos sus propiedades antiapoptóticas permiten que las células tumorales resistan la citotoxicidad de los fármacos quimioterapéuticos o la radioterapia.

TNFRSF11B codifica para la osteoprotegerina (OPG), miembro de la superfamilia de receptores del TNF. OPG es un receptor señuelo secretado por osteoblastos que funciona como regulador negativo de la resorción ósea, mediante la inhibición de la diferenciación de precursores de osteoclastos, la inhibición de la activación de osteoclastos maduros y a través de la estimulación de la apoptosis de osteoclastos (Simonet et al, 1997; Tsuda et al, 1997). OPG también actúa como un receptor señuelo del ligando activador del receptor de NF-κB (RANKL) (Aoki et al, 2010; Miyashita et al, 2004), por lo que mediante su unión evita la activación de NF-κB.

Además, se observó un incremento en la expresión de los genes GADD45A, TXNL4B y CYLD.

GADD45A (del inglés *Growth arrest and DNA-damage-inducible protein*) incrementa sus niveles de transcripción en condiciones de parada del crecimiento debida a estrés y tras el

tratamiento con agentes inductores de daño en el DNA (Salvador et al, 2013), activando la vía p38/JNK a través de las quinasas MTK1/MEKK4 (Takekawa & Saito, 1998). La transcripción de este gen está mediada por mecanismos tanto dependientes como independientes de p53 (Carrier et al, 1994). GADD45A colabora en la reparación del DNA, inhibiendo la entrada de las células en fase S (Smith et al, 1994) e interactuando con p21, un inhibidor del ciclo celular (Kearsey et al, 1995). Este gen contribuye al mantenimiento de la estabilidad genómica, la reparación del DNA y a la inhibición de la replicación. En nuestros experimentos GADD45A constituye un indicativo del daño generado en el DNA por la mitoxantrona.

TXNL4B codifica para la proteína DLP o DIM2, requerida en la progresión del ciclo celular para la transición de la fase S a G2, y con un papel esencial en el proceso de empalme del pre-RNA_m (Reuter et al, 1999; Sun et al, 2004).

CYLD codifica para una enzima deubiquitinasa que rompe cadenas de poliubiquitina unidas a lisina 63 de proteínas diana, regulando así la supervivencia celular o la proliferación. Entre otros, CYLD actúa como regulador negativo de NF-κB (Miyashita et al, 1994), describiéndose en la literatura que la inhibición de CYLD potencia la activación de NF-κB, aumentando la resistencia a la apoptosis y sugiriendo un mecanismo a través del cual la pérdida de CYLD contribuye a la oncogénesis (Yin et al, 2006). Dado que la pérdida de la expresión de CYLD se puede observar en diferentes tipos de cáncer humano, se ha demostrado que CYLD actúa como un gen supresor de tumores (Massoumi, 2011).

Aunque con niveles bajos de expresión, también se observó un incremento en la expresión de los genes MAG, TNF e IGF1.

MAG (del inglés *Myelin-Associated Glycoprotein*) codifica para una glicoproteína de membrana que participa en el proceso de mielinización (Ona et al, 1999). Esta proteína actúa como receptor de glicoconjugados sialilados y media interacciones mielina-neurona.

TNF codifica para una citoquina multifuncional proinflamatoria que pertenece a la superfamilia del factor de necrosis tumoral TNF. Esta citoquina es secretada principalmente por macrófagos y se une y funciona a través de los receptores TNFRSF1A/TNFR1 y TNFRSF1B/TNFR2. Está involucrada en la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos, como la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, metabolismo lipídico y la coagulación (Kearsey et al, 1995; Takekawa & Saito, 1998; Trompouki et al, 2003). En nuestros resultados la sobreexpresión de TNF podría estar más relacionada con la proliferación celular que con la apoptosis.

IGF1 codifica para una proteína similar a la insulina en función y estructura, que se une específicamente al receptor IGF1R (Zhu & Kahn, 1997). Esta proteína desempeña un papel importante en el crecimiento y media muchos de los efectos estimulantes provocados por la hormona del crecimiento (GH) (Le Roith et al, 2001), estando a su vez su síntesis estimulada por esta hormona. Es uno de los activadores más potentes de la transducción de la señal PKB (Hers, 2007) y un potente inhibidor de la muerte celular programada (Murray et al, 2003; Saeki et al, 2002).

Por otra parte, el tratamiento con mitoxantrona indujo la regulación negativa de los genes proapoptóticos BAX y CASP1, así como del gen INS.

BAX codifica para una proteína perteneciente a la familia de proteínas Bcl-2. Los miembros de la familia Bcl-2 forman hetero- u homodímeros y actúan como reguladores anti o pro-apoptóticos que están involucrados en una amplia variedad de actividades celulares. Bax forma un heterodímero con Bcl-2 y funciona como un activador de la apoptosis (Carrier et al, 1994). Esta proteína interactúa con el canal de aniones dependiente de voltaje mitocondrial (VDAC), provocando una pérdida del potencial de membrana y la liberación de citocromo c (Salvador et al, 2013).

CASP1 fue identificado por su capacidad de cortar proteolíticamente y activar el precursor inactivo de la interleuquina-1 (Thornberry et al, 1992). Se ha demostrado que este gen induce la apoptosis celular (Miura et al, 1993) y que puede funcionar en diversas etapas del desarrollo.

INS codifica para la proteína insulina, hormona polipeptídica secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas que interviene en el aprovechamiento metabólico de los nutrientes. La unión de la insulina al receptor de insulina (INSR) estimula la captación de glucosa (Frosig et al, 2007).

En resumen, la mitoxantrona parece incrementar la expresión de genes implicados en la respuesta al daño en el DNA, como GADD45A. Asimismo, parece incrementar la expresión de genes antiapoptóticos y disminuir la expresión de algunos genes proapoptóticos. La ausencia de cambios de expresión de los genes proapoptóticos CASP3, CASP6, CASP7, CASP9, FAS y FASLG corrobora estos resultados, sugiriendo que la mitoxantrona no induce muerte celular por apoptosis en las células PC-3.

En segundo lugar, el tratamiento con mitoxantrona en presencia de DNA-PK inhibida indujo nuevamente un incremento en la expresión de los genes antiapoptóticos BIRC3, IGF1R

y TNFRSF11B, así como de los genes GADD45A, TXNL4B, CYLD, MAG, TNF e IGF1. Además, indujo la regulación positiva del gen antiapoptótico BCL2A1 y de los genes antiapoptóticos no pertenecientes a la familia Bcl-2 CFLAR y BIRC2.

BCL2A1 codifica para un miembro de la familia de proteínas Bcl-2. La proteína codificada por este gen reduce la liberación de citoquinas proapoptóticas como citocromo c de la mitocondria y bloquear la activación de las caspasas.

CFLAR (del inglés *Caspase-8 and FADD like apoptosis regulator*) codifica para la proteína inhibidora FLIP (del inglés *FLICE inhibitory protein*), que se une al DISC (del inglés *death-inducing signalling complex*) e interfiere en la inducción de la apoptosis.

BIRC2, también llamada c-IAP1, codifica para una proteína miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis, que inhiben este proceso mediante su unión a TRAF1 y TRAF2, probablemente interfiriendo en la activación de las proteasas ICE.

Asimismo, indujo un incremento de expresión de genes proapoptóticos de la familia Bcl-2, como BCL2L11 y BMF.

BCL2L11 (del inglés *bcl-2-like protein 11*), también llamado BIM, es un activador de la apoptosis que interacciona con BCL2L1/BCL-X(L). **BMF** también funciona como un activador de la apoptosis.

También, se observó un incremento en la expresión de los genes ULK1, DPYSL4, CCDC103 y ATG12.

ULK1 (del inglés *Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase*) codifica para una serina-treonina quinasa que desempeña un papel clave en la inducción de la autofagia, regulando la formación de los precursores de autofagosomas. La autofagia está regulada por la vía de mTORC1, que regula el crecimiento celular (He & Klionsky, 2009; Jung et al, 2010; Yang & Klionsky, 2010). En condiciones favorables mTORC1 estimula la síntesis proteica y el crecimiento celular y suprime la autofagia, mientras que en condiciones desfavorables mTORC1 se inhibe, lo que resulta en la supresión del crecimiento celular y la inducción de la autofagia (Mizushima, 2010). mTORC1 inhibe la autofagia a través de la fosforilación de ULK1 (Jung et al, 2009). En nuestros resultados, el daño en el DNA inducido por la mitoxantrona y por la inhibición de DNA-PK podría estar afectando la expresión de mTORC1, resultando en la supresión del crecimiento celular y en un aumento de expresión de ULK1, aunque no se observan señales morfológicas de autofagia.

DPYSL4 codifica para la proteína colapsina CRMP3 ó ULIP4, implicada en la regulación de la diferenciación neuronal (Byk et al, 1996). Kimura y colaboradores demostraron agentes antitumorales inducían la expresión de DPYSL4, regulada por p53, y que la apoptosis inducida por estos agentes era reprimida en células silenciadas para este gen (Kimura et al, 2011), sugiriendo que DPYSL4 es un nuevo factor inductor de apoptosis en respuesta al daño en el DNA. En nuestros resultados y en ausencia de p53 no se observan señales claras de apoptosis, aunque la expresión de este gen estaría aumentada como consecuencia del daño en el DNA inducido.

CCDC103 codifica para una proteína de anclaje a dineínas necesaria para la movilidad ciliar (Panizzi et al, 2012).

ATG12 es el homólogo humano de una proteína de levadura implicada en la autofagia (Mizushima et al, 1998).

Por último, el tratamiento con mitoxantrona indujo la regulación negativa del gen proapoptótico BAX y del gen INS. Asimismo, indujo la regulación negativa del gen antiapoptótico BCL2 y de los genes ESR1, CD40LG y KCNIP1.

BCL2 (del inglés *B cell lymphoma/leukemia 2 gene*) está implicado en la regulación de la homeostasis del calcio y el flujo de protones en la mitocondria (Zhu et al, 1999) y, como consecuencia, inhibe la liberación del citocromo c (Murphy et al, 2000).

ESR1 codifica para un receptor de estrógenos compuesto por varios dominios importantes en la unión de hormonas, unión al DNA y la activación de la transcripción. Los estrógenos y sus receptores son esenciales para el desarrollo sexual y la función reproductiva. En la literatura se ha descrito su implicación en cáncer de próstata (Wang et al, 2013).

CD40LG codifica para una proteína que se expresa en la superficie de las células T y está implicada en la regulación de la función de células B a través de CD40.

KCNIP1 codifica para un miembro de la familia de proteínas citosólicas que interactúan con canales de potasio dependientes de voltaje. Los canales de potasio controlan el potencial de membrana, y contribuyen a los potenciales de acción nervioso y cardiaco, así como a la liberación de neurotransmisores. También están involucrados en la liberación de insulina, la diferenciación, activación, proliferación o la apoptosis. La alteración de la expresión de estos canales se ha detectado en un gran número de células cancerosas y tumorales (Felipe et al, 2006).

En resumen, el tratamiento combinado de mitoxantrona con los inhibidores de DNA-PK parece incrementar igualmente la expresión de genes implicados en la respuesta al daño en el DNA, como GADD45A. Además, y a pesar de incrementar la expresión de dos genes proapoptóticos de la familia de Bcl-2, parece también incrementar en términos generales la expresión de genes antiapoptóticos (más que con la mitoxantrona en solitario) y mantener la disminución del gen proapoptótico BAX. Asimismo, parece mantener la ausencia de cambios de expresión de genes codificantes para caspasas, FAS y FASLG.

Recientemente, el término necroptosis se ha utilizado para designar un tipo particular de necrosis programada que depende de la actividad serina/treonina quinasa de RIP1 (Kroemer et al, 2009). Se ha demostrado que la inhibición farmacológica o genética de varios enzimas clave afecta profundamente a la ejecución de la necroptosis, entre los que se incluyen RIP1, ciclofilina D, PARP-1 y el factor inductor de apoptosis AIF (Galluzzi & Kroemer, 2008). La actividad de RIP1 se requiere para la muerte por necroptosis tanto en células murinas como humanas (Holler et al, 2000), y la activación excesiva de la proteína de reparación del DNA PARP1 se ha visto implicada en la necrosis desencadenada por la alquilación del DNA (Zong et al, 2004). Nuestros resultados no mostraron un incremento en la expresión de PARP1. Además, entre los 84 genes analizados no se encontraban RIP1 ni AIF, por lo que no podemos afirmar que la mitoxantrona induzca procesos de necroptosis. No obstante, en este proceso está implicada la proteína CYLD, encargada de deubiquitinar RIP1 para activar, en última instancia, la ejecución de la necroptosis (Galluzzi et al, 2012). Nuestros resultados mostraron un incremento notable en la expresión de este gen tanto tras el tratamiento con mitoxantrona como con los inhibidores de DNA-PK. Además, se observó un incremento de la expresión de BMF tras el tratamiento con inhibidores de DNA-PK, estando también la proteína codificada por este gen implicada en la necroptosis (Hitomi et al, 2008) a través de la interferencia con el bloqueo de la permeabilización de la membrana mitocondrial interna mediado por Bcl-2/Bcl-xL (Galluzzi & Kroemer, 2008). Por tanto, no podemos descartar la necroptosis como tipo de muerte celular desencadenada por nuestros tratamientos, aunque sería importante analizar la expresión de RIP1 o AIF, así como hacer estudios de morfología celular a tiempos mayores que los analizados en este trabajo.

El otro tipo de muerte celular que podría estar desencadenándose en las células PC-3 sería la catástrofe mitótica, porque cumple varias de sus condiciones. En primer lugar, ésta se activa por mitosis aberrantes y, tras ellas, las células exhiben frecuentemente grandes

alteraciones nucleares, como micro- y multinucleaciones, que han sido utilizadas como marcadores morfológicos para la detección de este tipo de muerte celular (Galluzzi et al, 2012). Nuestros resultados mostraron multinucleación en la mayoría de células tanto tratadas con mitoxantrona como en combinación con los inhibidores. Además, este mecanismo es iniciado por perturbaciones del aparato mitótico, tanto de cromosomas como de la maquinaria que asegura su correcta segregación, y es paralelo a cierto grado de parada del ciclo en mitosis (Galluzzi et al, 2012). Esto coincide con nuestros resultados, en los que dosis bajas de mitoxantrona inducen una parada del ciclo en fase S a las 24 horas y en S y G₂/M a las 48 horas. Sin embargo, y según Galluzzi y colaboradores, la señalización inducida por daño en el DNA e iniciada en la transición G₂/M por el punto de control G₂ (que a menudo, aunque no siempre, es mediado por miembros de la familia de TP53) no constituye un caso de catástrofe mitótica, por lo que el tratamiento con mitoxantrona podría no ajustarse a este mecanismo de muerte celular. No obstante, según Shang y colaboradores (Shang et al, 2010), la catástrofe mitótica sí puede ser inducida por agentes que dañan el DNA, como la radiación ionizante (Huang et al, 2005; Nitta et al, 2004) o agentes que interfieren con los microtúbulos (Dowling et al, 2005).

La inhibición de la DNA-PK en células tratadas con mitoxantrona inhibe parcialmente la fosforilación de Chk2, necesaria para la estabilización del centrosoma y la correcta formación del huso mitótico, por lo que la combinación de mitoxantrona con NU7026 ó NU7441 sí podría desencadenar el mecanismo de catástrofe mitótica. Además, y por definición, en última instancia las células sufren muerte celular o senescencia (Galluzzi et al, 2012), lo que se corrobora con los ensayos de citotoxicidad. Además, este mecanismo no está limitado por la activación de p53, lo que podría encajar con la ausencia de p53 funcional característica de las células PC-3.

En conclusión, los datos presentados en este trabajo demuestran la capacidad citotóxica de la combinación con los inhibidores de la DNA-PK en la línea tumoral PC-3, su efecto sinérgico en combinación con la mitoxantrona y el retraso tanto en la reparación de DSB del DNA como en la actividad reparadora del sistema de recombinación homóloga, así como un estudio de los mecanismos de muerte celular inducida por estos fármacos. Todos estos resultados demuestran que la combinación de sustancias inhibidoras de los sistemas de reparación del DNA como el NU7026 o el NU7441 con fármacos inductores de estos daños puede ser de utilidad terapéutica.

7. CONCLUSIONES

1. La inhibición de la DNA-PK, por NU7026 ó NU7441, aumenta la sensibilidad de las células PC-3 al inhibidor de TOP2 mitoxantrona y al agente antimitótico vincristina. La combinación de mitoxantrona con estos inhibidores de la DNA-PK muestra un efecto citotóxico sinérgico en esta línea celular.
2. Los inhibidores de la DNA-PK en combinación con la mitoxantrona aumentan levemente la inducción de roturas de doble cadena (DSB), especialmente a tiempos bajos.
3. La ATM es la principal quinasa responsable de la fosforilación de H2AX en células PC-3 tras el tratamiento con doxorubicina. Además, la DNA-PK no puede fosforilar H2AX cuando la ATM es inhibida por KU55933.
4. Los inhibidores de la DNA-PK NU7026 y NU7441 retrasan la reparación de las roturas de doble cadena inducidas por la mitoxantrona.
5. El inhibidor de la DNA-PK NU7026 inhibe la actividad reparadora del sistema de Recombinación Homóloga (HR) tras el tratamiento con mitoxantrona.
6. La ATM es la principal quinasa responsable de la fosforilación de la quinasa mitótica Chk2 en T68 que es inducida por la mitoxantrona, aunque la DNA-PK también puede contribuir a este proceso.
7. La mitoxantrona, en solitario o en presencia de inhibidores de la DNA-PK, no activa reacciones apoptóticas. Esto se confirma por observaciones de microscopía en “time-lapse” de las células tratadas.
8. El efecto citotóxico inducido por la mitoxantrona, tanto en presencia como en ausencia de inhibidores de la DNA-PK, no implica la expresión de genes proapoptóticos, según el resultado de experimentos de retrotranscripción y PCR cuantitativa.

8. CONCLUSIONS

1. The inhibition of DNA-PK, by NU7026 or NU7441, increases the sensitivity of PC-3 cells to the TOP2 inhibitor mitoxantrone and the microtubule-targeting agent vincristine. The combination of mitoxantrone with these DNA-PK inhibitors shows a cytotoxic synergistic effect in this cell line.
2. DNA-PK inhibitors in combination with mitoxantrone increase slightly the induction of double strand breaks (DSB), especially at early time points.
3. ATM is the major kinase responsible for H2AX phosphorylation in PC-3 cells following doxorubicin treatment. Furthermore, DNA-PK appears unable to phosphorylate H2AX when ATM is inhibited by KU55933.
4. DNA-PK inhibitors NU7026 and NU7441 delay mitoxantrone-induced double strand breaks repair.
5. DNA-PK inhibitor NU7026 inhibits Homologous Recombination (HR) repair system activity following mitoxantrone treatment.
6. ATM is the major kinase responsible for mitoxantrone-induced checkpoint kinase 2 (Chk2) phosphorylation at T68 although DNA-PK may also contribute to this process.
7. Mitoxantrone, alone or in the presence of DNA-PK inhibitors, does not activate apoptotic reactions. This is confirmed by time-lapse microscopy observation of treated cells.
8. The mitoxantrone-induced cytotoxic effect observed in the presence or the absence of DNA-PK inhibitors does not imply expression of proapoptotic genes, as assessed by RT-qPCR.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abraham RT (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & development* **15**: 2177-2196

Alberts DS, Peng YM, Bowden GT, Dalton WS, Mackel C (1985) Pharmacology of mitoxantrone: mode of action and pharmacokinetics. *Investigational new drugs* **3**: 101-107

An J, Huang YC, Xu QZ, Zhou LJ, Shang ZF, Huang B, Wang Y, Liu XD, Wu DC, Zhou PK (2010) DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC molecular biology* **11**: 18

Andegeko Y, Moyal L, Mittelman L, Tsarfaty I, Shiloh Y, Rotman G (2001) Nuclear retention of ATM at sites of DNA double strand breaks. *The Journal of biological chemistry* **276**: 38224-38230

Anderson L, Henderson C, Adachi Y (2001) Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Molecular and cellular biology* **21**: 1719-1729

Andreassen PR, Ho GP, D'Andrea AD (2006) DNA damage responses and their many interactions with the replication fork. *Carcinogenesis* **27**: 883-892

Aoki S, Honma M, Kariya Y, Nakamichi Y, Ninomiya T, Takahashi N, Udagawa N, Suzuki H (2010) Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **25**: 1907-1921

Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C, Spalla C (1969) Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and bioengineering* **11**: 1101-1110

Baker J, Ajani J, Scotte F, Winther D, Martin M, Aapro MS, von Minckwitz G (2009) Docetaxel-related side effects and their management. *European journal of oncology nursing : the official journal of European Oncology Nursing Society* **13**: 49-59

Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**: 499-506

Bakkenist CJ, Kastan MB (2004) Phosphatases join kinases in DNA-damage response pathways. *Trends in cell biology* **14**: 339-341

Bellmunt J, Theodore C, Demkov T, Komyakov B, Sengelov L, Daugaard G, Caty A, Carles J, Jagiello-Gruszfeld A, Karyakin O, Delgado FM, Hurlteloup P, Winqvist E, Morsli N, Salhi Y, Culine S, von der Maase H (2009) Phase III trial of vinflunine plus best supportive care compared with best supportive care alone after a platinum-containing regimen in patients with advanced transitional cell carcinoma of the urothelial tract. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 4454-4461

Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, Garewal H (2002) DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation research* **511**: 145-178

Bertrand MJ, Lippens S, Staes A, Gilbert B, Roelandt R, De Medts J, Gevaert K, Declercq W, Vandenaabeele P (2011) cIAP1/2 are direct E3 ligases conjugating diverse types of ubiquitin chains to receptor interacting proteins kinases 1 to 4 (RIP1-4). *PloS one* **6**: e22356

Bhatti S, Kozlov S, Farooqi AA, Naqi A, Lavin M, Khanna KK (2011) ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**: 2977-3006

Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis JH, Wallach D (1995) Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas/APO1 prompts signaling for TNF and Fas/APO1 effects. *The Journal of biological chemistry* **270**: 387-391

Boskovic J, Rivera-Calzada A, Maman JD, Chacon P, Willison KR, Pearl LH, Llorca O (2003) Visualization of DNA-induced conformational changes in the DNA repair kinase DNA-PKcs. *The EMBO journal* **22**: 5875-5882

Boulton S, Kyle S, Durkacz BW (1999) Interactive effects of inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-dependent protein kinase on cellular responses to DNA damage. *Carcinogenesis* **20**: 199-203

Boulton S, Kyle S, Yalcintepe L, Durkacz BW (1996) Wortmannin is a potent inhibitor of DNA double strand break but not single strand break repair in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* **17**: 2285-2290

Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J (2013) Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **132**: 1133-1145

Bryant HE, Petermann E, Schultz N, Jemth AS, Loseva O, Issaeva N, Johansson F, Fernandez S, McGlynn P, Helleday T (2009) PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *The EMBO journal* **28**: 2601-2615

Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001) ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry* **276**: 42462-42467

Byk T, Dobransky T, Cifuentes-Diaz C, Sobel A (1996) Identification and molecular characterization of Unc-33-like phosphoprotein (Ulip), a putative mammalian homolog of the axonal guidance-associated unc-33 gene product. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**: 688-701

Caldecott K, Jeggo P (1991) Cross-sensitivity of gamma-ray-sensitive hamster mutants to cross-linking agents. *Mutation research* **255**: 111-121

- Capranico G, Kohn KW, Pommier Y (1990) Local sequence requirements for DNA cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of doxorubicin. *Nucleic acids research* **18**: 6611-6619
- Capranico G, Tinelli S, Zunino F, Kohn KW, Pommier Y (1993) Effects of base mutations on topoisomerase II DNA cleavage stimulated by mAMSA in short DNA oligomers. *Biochemistry* **32**: 145-152
- Carrier F, Smith ML, Bae I, Kilpatrick KE, Lansing TJ, Chen CY, Engelstein M, Friend SH, Henner WD, Gilmer TM, et al. (1994) Characterization of human Gadd45, a p53-regulated protein. *The Journal of biological chemistry* **269**: 32672-32677
- Casado P, Prado MA, Zuazua-Villar P, Del Valle E, Artime N, Cabal-Hierro L, Ruperez P, Burlingame AL, Lazo PS, Ramos S (2009) Microtubule interfering agents and KSP inhibitors induce the phosphorylation of the nuclear protein p54(nrb), an event linked to G2/M arrest. *Journal of proteomics* **71**: 592-600
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Yakushijin K, Horne D, Medema R, Kroemer G (2004) The cell cycle checkpoint kinase Chk2 is a negative regulator of mitotic catastrophe. *Oncogene* **23**: 4353-4361
- Ciszewski WM, Tavecchio M, Dastych J, Curtin NJ (2014) DNA-PK inhibition by NU7441 sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation and doxorubicin. *Breast cancer research and treatment* **143**: 47-55
- Clarke SJ, Rivory LP (1999) Clinical pharmacokinetics of docetaxel. *Clinical pharmacokinetics* **36**: 99-114
- Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical journal* **326** (Pt 1): 1-16
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology* **26**: 249-261
- Collis SJ, DeWeese TL, Jeggo PA, Parker AR (2005) The life and death of DNA-PK. *Oncogene* **24**: 949-961
- Conde C, Caceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature reviews Neuroscience* **10**: 319-332
- Constantinou A, Davies AA, West SC (2001) Branch migration and Holliday junction resolution catalyzed by activities from mammalian cells. *Cell* **104**: 259-268
- Cornforth MN, Bedford JS (1985) On the nature of a defect in cells from individuals with ataxia-telangiectasia. *Science* **227**: 1589-1591

Cortes-Funes H, Coronado C (2007) Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovascular toxicology* **7**: 56-60

Curtin NJ (2012) DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature reviews Cancer* **12**: 801-817

Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y (2000) Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* **406**: 855-862

Champoux JJ (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annual review of biochemistry* **70**: 369-413

Chan DW, Lees-Miller SP (1996) The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *The Journal of biological chemistry* **271**: 8936-8941

Chan TY, Partin AW, Walsh PC, Epstein JI (2000) Prognostic significance of Gleason score 3+4 versus Gleason score 4+3 tumor at radical prostatectomy. *Urology* **56**: 823-827

Chanoux RA, Yin B, Urtishak KA, Asare A, Bassing CH, Brown EJ (2009) ATR and H2AX cooperate in maintaining genome stability under replication stress. *The Journal of biological chemistry* **284**: 5994-6003

Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FK (2009) Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* **137**: 1112-1123

Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **193**: 3-34

Chu G (1997) Double strand break repair. *The Journal of biological chemistry* **272**: 24097-24100

d'Adda di Fagagna F, Hande MP, Tong WM, Roth D, Lansdorp PM, Wang ZQ, Jackson SP (2001) Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Current biology : CB* **11**: 1192-1196

De Bont R, van Larebeke N (2004) Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* **19**: 169-185

Denis LJ, Griffiths K (2000) Endocrine treatment in prostate cancer. *Seminars in surgical oncology* **18**: 52-74

Denizot F, Lang R (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods* **89**: 271-277

- Desai A, Mitchison TJ (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annual review of cell and developmental biology* **13**: 83-117
- Dowling M, Voong KR, Kim M, Keutmann MK, Harris E, Kao GD (2005) Mitotic spindle checkpoint inactivation by trichostatin a defines a mechanism for increasing cancer cell killing by microtubule-disrupting agents. *Cancer biology & therapy* **4**: 197-206
- Dumontet C, Jordan MA (2010) Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature reviews Drug discovery* **9**: 790-803
- Elliott SL, Crawford C, Mulligan E, Summerfield G, Newton P, Wallis J, Mainou-Fowler T, Evans P, Bedwell C, Durkacz BW, Willmore E (2011) Mitoxantrone in combination with an inhibitor of DNA-dependent protein kinase: a potential therapy for high risk B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology* **152**: 61-71
- Erickson HP (2000) Gamma-tubulin nucleation: template or protofilament? *Nature cell biology* **2**: E93-96
- Falck J, Coates J, Jackson SP (2005) Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **434**: 605-611
- Faulds D, Balfour JA, Chrisp P, Langtry HD (1991) Mitoxantrone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs* **41**: 400-449
- Felipe A, Vicente R, Villalonga N, Roura-Ferrer M, Martinez-Marmol R, Sole L, Ferreres JC, Condom E (2006) Potassium channels: new targets in cancer therapy. *Cancer detection and prevention* **30**: 375-385
- Fernandez-Garcia B, Casado P, Prado MA, Ugarte-Gil LJ, Artime N, Cabal-Hierro L, Calvo E, Lopez JA, Ramos S, Lazo PS (2010) Proteomic analysis of annexin A2 phosphorylation induced by microtubule interfering agents and kinesin spindle protein inhibitors. *Journal of proteome research* **9**: 4649-4660
- Figg WD, Dahut W, Duray P, Hamilton M, Tompkins A, Steinberg SM, Jones E, Premkumar A, Linehan WM, Floeter MK, Chen CC, Dixon S, Kohler DR, Kruger EA, Gubish E, Pluda JM, Reed E (2001) A randomized phase II trial of thalidomide, an angiogenesis inhibitor, in patients with androgen-independent prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **7**: 1888-1893
- Foray N, Priestley A, Alsbeih G, Badie C, Capulas EP, Arlett CF, Malaise EP (1997) Hypersensitivity of ataxia telangiectasia fibroblasts to ionizing radiation is associated with a repair deficiency of DNA double-strand breaks. *International journal of radiation biology* **72**: 271-283
- Frosig C, Rose AJ, Trebak JT, Kiens B, Richter EA, Wojtaszewski JF (2007) Effects of endurance exercise training on insulin signaling in human skeletal muscle: interactions at the level of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and AS160. *Diabetes* **56**: 2093-2102

Galluzzi L, Kroemer G (2008) Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* **135**: 1161-1163

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nunez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon HU, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* **19**: 107-120

Gerke V, Moss SE (2002) Annexins: from structure to function. *Physiological reviews* **82**: 331-371

Gilley D, Tanaka H, Hande MP, Kurimasa A, Li GC, Oshimura M, Chen DJ (2001) DNA-PKcs is critical for telomere capping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 15084-15088

Gottlieb TM, Jackson SP (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**: 131-142

GrandPre T, Li S, Strittmatter SM (2002) Nogo-66 receptor antagonist peptide promotes axonal regeneration. *Nature* **417**: 547-551

Grue P, Grasser A, Sehested M, Jensen PB, Uhse A, Straub T, Ness W, Boege F (1998) Essential mitotic functions of DNA topoisomerase IIalpha are not adopted by topoisomerase IIbeta in human H69 cells. *The Journal of biological chemistry* **273**: 33660-33666

Gu Y, Jin S, Gao Y, Weaver DT, Alt FW (1997) Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 8076-8081

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674

Hande KR (1998) Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochimica et biophysica acta* **1400**: 173-184

Harris CC (1996) Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *Journal of the National Cancer Institute* **88**: 1442-1455

He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics* **43**: 67-93

- He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X (2009) Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* **137**: 1100-1111
- Heger Z, Cernei N, Kudr J, Gumulec J, Blazkova I, Zitka O, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V, Kizek R (2013) A novel insight into the cardiotoxicity of antineoplastic drug doxorubicin. *International journal of molecular sciences* **14**: 21629-21646
- Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP (2007) DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA repair* **6**: 923-935
- Helleday T, Petermann E, Lundin C, Hodgson B, Sharma RA (2008) DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nature reviews Cancer* **8**: 193-204
- Hers I (2007) Insulin-like growth factor-1 potentiates platelet activation via the IRS/PI3Kalpha pathway. *Blood* **110**: 4243-4252
- Hickson I, Zhao Y, Richardson CJ, Green SJ, Martin NM, Orr AI, Reaper PM, Jackson SP, Curtin NJ, Smith GC (2004) Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer research* **64**: 9152-9159
- Hinchcliffe EH, Sluder G (2001) "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes & development* **15**: 1167-1181
- Hitomi J, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Yuan J (2008) Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* **135**: 1311-1323
- Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**: 366-374
- Hoeijmakers JH (2009) DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine* **361**: 1475-1485
- Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature immunology* **1**: 489-495
- Huang X, Tran T, Zhang L, Hatcher R, Zhang P (2005) DNA damage-induced mitotic catastrophe is mediated by the Chk1-dependent mitotic exit DNA damage checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 1065-1070
- Indraccolo S (2010) Interferon-alpha as angiogenesis inhibitor: learning from tumor models. *Autoimmunity* **43**: 244-247
- Inoue S, Browne G, Melino G, Cohen GM (2009) Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell death and differentiation* **16**: 1053-1061

Isaacs WB, Carter BS, Ewing CM (1991) Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. *Cancer research* **51**: 4716-4720

Izzard RA, Jackson SP, Smith GC (1999) Competitive and noncompetitive inhibition of the DNA-dependent protein kinase. *Cancer research* **59**: 2581-2586

Jackman J, O'Connor PM (2001) Methods for synchronizing cells at specific stages of the cell cycle. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S Bonifacino [et al]* **Chapter 8**: Unit 8 3

Jaffrezou JP, Bettaieb A, Levade T, Laurent G (1998) Antitumor agent-induced apoptosis in myeloid leukemia cells: a controlled suicide. *Leukemia & lymphoma* **29**: 453-463

Jaglowski SM, Byrd JC (2010) Rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in hematology* **47**: 156-169

Janssen A, Medema RH (2011) Mitosis as an anti-cancer target. *Oncogene* **30**: 2799-2809

Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J, Jackson SP (2006) ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature cell biology* **8**: 37-45

Jeggo PA, Taccioli GE, Jackson SP (1995) Menage a trois: double strand break repair, V(D)J recombination and DNA-PK. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **17**: 949-957

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* **61**: 69-90

Jensen PB, Sehested M (1997) DNA topoisomerase II rescue by catalytic inhibitors: a new strategy to improve the antitumor selectivity of etoposide. *Biochemical pharmacology* **54**: 755-759

Johnson CE, Kornbluth S (2008) Caspase cleavage is not for everyone. *Cell* **134**: 720-721

Jordan MA (2002) Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Current medicinal chemistry Anti-cancer agents* **2**: 1-17

Jordan MA, Thrower D, Wilson L (1991) Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer research* **51**: 2212-2222

Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H, Wilson L (1996) Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer research* **56**: 816-825

- Jordan MA, Wilson L (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature reviews Cancer* **4**: 253-265
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**: 549-554
- Ju BG, Lunnyak VV, Perissi V, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG (2006) A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* **312**: 1798-1802
- Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH (2009) ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell* **20**: 1992-2003
- Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters* **584**: 1287-1295
- Kameoka S, Duque P, Konarska MM (2004) p54(nrb) associates with the 5' splice site within large transcription/splicing complexes. *The EMBO journal* **23**: 1782-1791
- Kantidze OL, Iarovaia OV, Klochkov DB, Razin SV (2006) [Illegitimate recombination as a possible mechanism of DNA-topoisomerase II induced chromosomal rearrangements]. *Molekuliarnaia biologiiia* **40**: 878-885
- Kantoff PW, Halabi S, Conaway M, Picus J, Kirshner J, Hars V, Trump D, Winer EP, Vogelzang NJ (1999) Hydrocortisone with or without mitoxantrone in men with hormone-refractory prostate cancer: results of the cancer and leukemia group B 9182 study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **17**: 2506-2513
- Kearsey JM, Shivji MK, Hall PA, Wood RD (1995) Does the p53 up-regulated Gadd45 protein have a role in excision repair? *Science* **270**: 1004-1005; author reply 1005-1006
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**: 239-257
- Kimura J, Kudoh T, Miki Y, Yoshida K (2011) Identification of dihydropyrimidinase-related protein 4 as a novel target of the p53 tumor suppressor in the apoptotic response to DNA damage. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **128**: 1524-1531
- Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G (2008) Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic acids research* **36**: 5678-5694
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal* **14**: 5579-5588

Kong X, Shen Y, Jiang N, Fei X, Mi J (2011) Emerging roles of DNA-PK besides DNA repair. *Cellular signalling* **23**: 1273-1280

Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* **87**: 99-163

Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* **16**: 3-11

Kumagai A, Lee J, Yoo HY, Dunphy WG (2006) TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* **124**: 943-955

Kumar S (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell death and differentiation* **14**: 32-43

Lavin MF, Shiloh Y (1997) The genetic defect in ataxia-telangiectasia. *Annual review of immunology* **15**: 177-202

Le Roith D, Scavo L, Butler A (2001) What is the role of circulating IGF-I? *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **12**: 48-52

Le Sourd F, Boulben S, Le Bouffant R, Cormier P, Morales J, Belle R, Mulner-Lorillon O (2006) eEF1B: At the dawn of the 21st century. *Biochimica et biophysica acta* **1759**: 13-31

Leavy O (2010) V(D)J recombination: RAG recombination centres. *Nature reviews Immunology* **10**: 383

Lee E, Oh E, Lee J, Sul D (2004) Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **81**: 121-132

Lee JH, Paull TT (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**: 551-554

Leuther KK, Hammarsten O, Kornberg RD, Chu G (1999) Structure of DNA-dependent protein kinase: implications for its regulation by DNA. *The EMBO journal* **18**: 1114-1123

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**: 479-489

Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**: 709-715

- Lisby M, Rothstein R (2009) Choreography of recombination proteins during the DNA damage response. *DNA repair* **8**: 1068-1076
- Liu LF (1989) DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Annual review of biochemistry* **58**: 351-375
- Lord CJ, Garrett MD, Ashworth A (2006) Targeting the double-strand DNA break repair pathway as a therapeutic strategy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **12**: 4463-4468
- Lorusso A, Covino C, Priori G, Bachi A, Meldolesi J, Chieregatti E (2006) Annexin2 coating the surface of enlargeosomes is needed for their regulated exocytosis. *The EMBO journal* **25**: 5443-5456
- Luo K, Yuan J, Chen J, Lou Z (2009) Topoisomerase IIalpha controls the decatenation checkpoint. *Nature cell biology* **11**: 204-210
- Llorca O, Pearl LH (2004) Electron microscopy studies on DNA recognition by DNA-PK. *Micron (Oxford, England : 1993)* **35**: 625-633
- Mai J, Waisman DM, Sloane BF (2000) Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression. *Biochimica et biophysica acta* **1477**: 215-230
- Malumbres M, Barbacid M (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences* **30**: 630-641
- Martin SJ, Green DR (1994) Apoptosis as a goal of cancer therapy. *Current opinion in oncology* **6**: 616-621
- Massoumi R (2011) CYLD: a deubiquitination enzyme with multiple roles in cancer. *Future oncology (London, England)* **7**: 285-297
- McClendon AK, Osheroff N (2007) DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutation research* **623**: 83-97
- McNamara S, Wang H, Hanna N, Miller WH, Jr. (2008) Topoisomerase IIbeta negatively modulates retinoic acid receptor alpha function: a novel mechanism of retinoic acid resistance. *Molecular and cellular biology* **28**: 2066-2077
- Mehlen P, Bredesen DE (2011) Dependence receptors: from basic research to drug development. *Science signaling* **4**: mr2
- Melia J (2005) Part 1: The burden of prostate cancer, its natural history, information on the outcome of screening and estimates of ad hoc screening with particular reference to England and Wales. *BJU international* **95 Suppl 3**: 4-15

- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartweg EA, Yuan J (1993) Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* **75**: 653-660
- Miyashita T, Kawakami A, Nakashima T, Yamasaki S, Tamai M, Tanaka F, Kamachi M, Ida H, Migita K, Origuchi T, Nakao K, Eguchi K (2004) Osteoprotegerin (OPG) acts as an endogenous decoy receptor in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis of fibroblast-like synovial cells. *Clinical and Experimental Immunology* **137**: 430-436
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of *bcl-2* and *bax* gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**: 1799-1805
- Mizushima N (2010) The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current opinion in cell biology* **22**: 132-139
- Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T, Ohsumi Y (1998) A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *The Journal of biological chemistry* **273**: 33889-33892
- Mould E, Berry P, Jamieson D, Hill C, Cano C, Tan N, Elliott S, Durkacz B, Newell D, Willmore E (2014) Identification of dual DNA-PK MDR1 inhibitors for the potentiation of cytotoxic drug activity. *Biochemical pharmacology* **88**: 58-65
- Muller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH (1998) p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *The Journal of experimental medicine* **188**: 2033-2045
- Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB (2000) Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell death and differentiation* **7**: 102-111
- Murray SA, Zheng H, Gu L, Jim Xiao ZX (2003) IGF-1 activates p21 to inhibit UV-induced cell death. *Oncogene* **22**: 1703-1711
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* **85**: 817-827
- Neale MJ, Keeney S (2006) Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. *Nature* **442**: 153-158
- Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation* **6**: 1028-1042

Nitiss JL (2009) Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature reviews Cancer* **9**: 338-350

Nitta M, Kobayashi O, Honda S, Hirota T, Kuninaka S, Marumoto T, Ushio Y, Saya H (2004) Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. *Oncogene* **23**: 6548-6558

Norbury CJ, Zhivotovsky B (2004) DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* **23**: 2797-2808

O'Driscoll M, Jeggo PA (2006) The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nature reviews Genetics* **7**: 45-54

Olive PL (1999) DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *International journal of radiation biology* **75**: 395-405

Olive PL, Banath JP (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols* **1**: 23-29

Olive PL, Banath JP, Durand RE (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation research* **122**: 86-94

Ona VO, Li M, Vonsattel JP, Andrews LJ, Khan SQ, Chung WM, Frey AS, Menon AS, Li XJ, Stieg PE, Yuan J, Penney JB, Young AB, Cha JH, Friedlander RM (1999) Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* **399**: 263-267

Ostling O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* **123**: 291-298

Panizzi JR, Becker-Heck A, Castleman VH, Al-Mutairi DA, Liu Y, Loges NT, Pathak N, Austin-Tse C, Sheridan E, Schmidts M, Olbrich H, Werner C, Haffner K, Hellman N, Chodhari R, Gupta A, Kramer-Zucker A, Olale F, Burdine RD, Schier AF, O'Callaghan C, Chung EM, Reinhardt R, Mitchison HM, King SM, Omran H, Drummond IA (2012) CCDC103 mutations cause primary ciliary dyskinesia by disrupting assembly of ciliary dynein arms. *Nature genetics* **44**: 714-719

Park EJ, Chan DW, Park JH, Oettinger MA, Kwon J (2003) DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic acids research* **31**: 6819-6827

Perego P, Corna E, De Cesare M, Gatti L, Polizzi D, Pratesi G, Supino R, Zunino F (2001) Role of apoptosis and apoptosis-related genes in cellular response and antitumor efficacy of anthracyclines. *Current medicinal chemistry* **8**: 31-37

Perego P, Giarola M, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Delia D, Pierotti MA, Miyashita T, Reed JC, Zunino F (1996) Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems. *Cancer research* **56**: 556-562

Pigault C, Follenius-Wund A, Schmutz M, Freyssinet JM, Brisson A (1994) Formation of two-dimensional arrays of annexin V on phosphatidylserine-containing liposomes. *Journal of molecular biology* **236**: 199-208

Pisansky TM, Cha SS, Earle JD, Durr ED, Kozelsky TF, Wieand HS, Oesterling JE (1993) Prostate-specific antigen as a pretherapy prognostic factor in patients treated with radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **11**: 2158-2166

Pommier Y, Sordet O, Rao VA, Zhang H, Kohn KW (2005) Targeting chk2 kinase: molecular interaction maps and therapeutic rationale. *Current pharmaceutical design* **11**: 2855-2872

Pop C, Timmer J, Sperandio S, Salvesen GS (2006) The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Molecular cell* **22**: 269-275

Prado MA, Casado P, Zuazua-Villar P, del Valle E, Artime N, Cabal-Hierro L, Martinez-Campa CM, Lazo PS, Ramos S (2007) Phosphorylation of human eukaryotic elongation factor 1Bgamma is regulated by paclitaxel. *Proteomics* **7**: 3299-3304

Proteau A, Blier S, Albert AL, Lavoie SB, Traish AM, Vincent M (2005) The multifunctional nuclear protein p54nrb is multiphosphorylated in mitosis and interacts with the mitotic regulator Pin1. *Journal of molecular biology* **346**: 1163-1172

Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK (2005) Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *The international journal of lower extremity wounds* **4**: 138-144

Reuter K, Nottrott S, Fabrizio P, Luhrmann R, Ficner R (1999) Identification, characterization and crystal structure analysis of the human spliceosomal U5 snRNP-specific 15 kD protein. *Journal of molecular biology* **294**: 515-525

Risinger AL, Giles FJ, Mooberry SL (2009) Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer treatment reviews* **35**: 255-261

Robertson AM, Bird CC, Waddell AW, Currie AR (1978) Morphological aspects of glucocorticoid-induced cell death in human lymphoblastoid cells. *The Journal of pathology* **126**: 181-187

Rosenzweig KE, Youmell MB, Palayoor ST, Price BD (1997) Radiosensitization of human tumor cells by the phosphatidylinositol3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 correlates with inhibition of DNA-dependent protein kinase and prolonged G2-M delay. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **3**: 1149-1156

Ross WE, Glaubiger DL, Kohn KW (1978) Protein-associated DNA breaks in cells treated with adriamycin or ellipticine. *Biochimica et biophysica acta* **519**: 23-30

Rotman G, Shiloh Y (1998) ATM: from gene to function. *Human molecular genetics* **7**: 1555-1563

- Saeki M, Maeda S, Wada K, Kamisaki Y (2002) Insulin-like growth factor-1 protects peroxynitrite-induced cell death by preventing cytochrome c-induced caspase-3 activation. *Journal of cellular biochemistry* **84**: 708-716
- Salvador JM, Brown-Clay JD, Fornace AJ, Jr. (2013) Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Advances in experimental medicine and biology* **793**: 1-19
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* **73**: 39-85
- Sardao VA, Oliveira PJ, Holy J, Oliveira CR, Wallace KB (2009) Doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction is secondary to nuclear p53 activation in H9c2 cardiomyoblasts. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **64**: 811-827
- Sarkaria JN, Eshleman JS (2001) ATM as a target for novel radiosensitizers. *Seminars in radiation oncology* **11**: 316-327
- Sarkaria JN, Tibbetts RS, Busby EC, Kennedy AP, Hill DE, Abraham RT (1998) Inhibition of phosphoinositide 3-kinase related kinases by the radiosensitizing agent wortmannin. *Cancer research* **58**: 4375-4382
- Savill J, Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**: 784-788
- Scott LJ, Figgitt DP (2004) Mitoxantrone: a review of its use in multiple sclerosis. *CNS drugs* **18**: 379-396
- Schiff PB, Horwitz SB (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 1561-1565
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *European journal of biochemistry / FEBS* **254**: 439-459
- Schutze S, Tchikov V, Schneider-Brachert W (2008) Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 655-662
- Shaheen FS, Znojek P, Fisher A, Webster M, Plummer R, Gaughan L, Smith GC, Leung HY, Curtin NJ, Robson CN (2011) Targeting the DNA double strand break repair machinery in prostate cancer. *PloS one* **6**: e20311
- Shang ZF, Huang B, Xu QZ, Zhang SM, Fan R, Liu XD, Wang Y, Zhou PK (2010) Inactivation of DNA-dependent protein kinase leads to spindle disruption and mitotic catastrophe with attenuated checkpoint protein 2 Phosphorylation in response to DNA damage. *Cancer research* **70**: 3657-3666

Shav-Tal Y, Zipori D (2002) PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS letters* **531**: 109-114

Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature reviews Cancer* **3**: 155-168

Shiloh Y, Ziv Y (2013) The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nature reviews Molecular cell biology* **14**: 197-210

Shrivastav M, Miller CA, De Haro LP, Durant ST, Chen BP, Chen DJ, Nickoloff JA (2009) DNA-PKcs and ATM co-regulate DNA double-strand break repair. *DNA repair* **8**: 920-929

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89**: 309-319

Slee EA, Adrain C, Martin SJ (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **276**: 7320-7326

Smith GC, Jackson SP (1999) The DNA-dependent protein kinase. *Genes & development* **13**: 916-934

Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ, Jr. (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* **266**: 1376-1380

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES (1996) Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitible protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 14486-14491

Stanton RA, Gernert KM, Nettles JH, Aneja R (2011) Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Medicinal research reviews* **31**: 443-481

Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA (2004) ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer research* **64**: 2390-2396

Sun X, Zhang H, Wang D, Ma D, Shen Y, Shang Y (2004) DLP, a novel Dim1 family protein implicated in pre-mRNA splicing and cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry* **279**: 32839-32847

Swain SM, Arezzo JC (2008) Neuropathy associated with microtubule inhibitors: diagnosis, incidence, and management. *Clinical advances in hematology & oncology : H&O* **6**: 455-467

- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, Yamaguchi-Iwai Y, Shinohara A, Takeda S (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal* **17**: 5497-5508
- Takekawa M, Saito H (1998) A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell* **95**: 521-530
- Tanaka T, Yamagami T, Oka Y, Nomura T, Sugiyama H (1993) The scid mutation in mice causes defects in the repair system for both double-strand DNA breaks and DNA cross-links. *Mutation research* **288**: 277-280
- Tanenbaum ME, Medema RH (2010) Mechanisms of centrosome separation and bipolar spindle assembly. *Developmental cell* **19**: 797-806
- Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, Ernst DS, Neville AJ, Moore MJ, Armitage GR, Wilson JJ, Venner PM, Coppin CM, Murphy KC (1996) Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **14**: 1756-1764
- Tavecchio M, Munck JM, Cano C, Newell DR, Curtin NJ (2012) Further characterisation of the cellular activity of the DNA-PK inhibitor, NU7441, reveals potential cross-talk with homologous recombination. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **69**: 155-164
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 231-241
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**: 768-774
- Tomimatsu N, Mukherjee B, Burma S (2009) Distinct roles of ATR and DNA-PKcs in triggering DNA damage responses in ATM-deficient cells. *EMBO reports* **10**: 629-635
- Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tsihrizis T, Farmer H, Ashworth A, Mosialos G (2003) CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* **424**: 793-796
- Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K (1997) Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* **234**: 137-142
- Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL (1996) Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor

receptor-associated factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 4974-4978

Vande Walle L, Van Damme P, Lamkanfi M, Saelens X, Vandekerckhove J, Gevaert K, Vandenabeele P (2007) Proteome-wide Identification of HtrA2/Omi Substrates. *Journal of proteome research* **6**: 1006-1015

Veuger SJ, Curtin NJ, Richardson CJ, Smith GC, Durkacz BW (2003) Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer research* **63**: 6008-6015

Veuger SJ, Curtin NJ, Smith GC, Durkacz BW (2004) Effects of novel inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and the DNA-dependent protein kinase on enzyme activities and DNA repair. *Oncogene* **23**: 7322-7329

Vindelov LL, Christensen IJ (1994) Detergent and proteolytic enzyme-based techniques for nuclear isolation and DNA content analysis. *Methods in cell biology* **41**: 219-229

Wajant H (2002) The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* **296**: 1635-1636

Walker JV, Nitiss JL (2002) DNA topoisomerase II as a target for cancer chemotherapy. *Cancer investigation* **20**: 570-589

Wang H, Wang M, Bocker W, Iliakis G (2005) Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *Journal of cellular physiology* **202**: 492-502

Wang JC (1998) Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Quarterly reviews of biophysics* **31**: 107-144

Wang YM, Liu ZW, Guo JB, Wang XF, Zhao XX, Zheng X (2013) ESR1 Gene Polymorphisms and Prostate Cancer Risk: A HuGE Review and Meta-Analysis. *PloS one* **8**: e66999

Weiss RB (1992) The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Seminars in oncology* **19**: 670-686

Wilson L, Jordan MA (1995) Microtubule dynamics: taking aim at a moving target. *Chemistry & biology* **2**: 569-573

Williams JR, Little JB, Shipley WU (1974) Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA. *Nature* **252**: 754-755

Willmore E, de Caux S, Sunter NJ, Tilby MJ, Jackson GH, Austin CA, Durkacz BW (2004) A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* **103**: 4659-4665

Willmore E, Elliott SL, Mainou-Fowler T, Summerfield GP, Jackson GH, O'Neill F, Lowe C, Carter A, Harris R, Pettitt AR, Cano-Soumillac C, Griffin RJ, Cowell IG, Austin CA, Durkacz BW (2008) DNA-dependent protein kinase is a therapeutic target and an indicator of poor prognosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**: 3984-3992

Wu GS, El-Deiry WS (1996) Apoptotic death of tumor cells correlates with chemosensitivity, independent of p53 or bcl-2. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2**: 623-633

Wyllie AH (1997) Apoptosis: an overview. *British medical bulletin* **53**: 451-465

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology* **68**: 251-306

Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, Zheng N, Chen PL, Lee WH, Pavletich NP (2002) BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* **297**: 1837-1848

Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ (2003) ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* **24**: 1571-1580

Yang Z, Klionsky DJ (2010) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology* **22**: 124-131

Yin Q, Park HH, Chung JY, Lin SC, Lo YC, da Graca LS, Jiang X, Wu H (2006) Caspase-9 holoenzyme is a specific and optimal procaspase-3 processing machine. *Molecular cell* **22**: 259-268

Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ (1999) Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* **400**: 886-891

Yvon AM, Wadsworth P, Jordan MA (1999) Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Molecular biology of the cell* **10**: 947-959

Zachos G, Rainey M, Gillespie DA (2003) Lethal errors in checkpoint control--life without Chk1. *Cell Cycle* **2**: 14-16

Zakian VA (1995) ATM-related genes: what do they tell us about functions of the human gene? *Cell* **82**: 685-687

Zhao Y, Thomas HD, Batey MA, Cowell IG, Richardson CJ, Griffin RJ, Calvert AH, Newell DR, Smith GC, Curtin NJ (2006) Preclinical evaluation of a potent novel DNA-dependent protein kinase inhibitor NU7441. *Cancer research* **66**: 5354-5362

Zhou AY, Shen RR, Kim E, Lock YJ, Xu M, Chen ZJ, Hahn WC (2013) IKKepsilon-mediated tumorigenesis requires K63-linked polyubiquitination by a cIAP1/cIAP2/TRAF2 E3 ubiquitin ligase complex. *Cell reports* **3**: 724-733

Zhou BB, Bartek J (2004) Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nature reviews Cancer* **4**: 216-225

Zhu J, Kahn CR (1997) Analysis of a peptide hormone-receptor interaction in the yeast two-hybrid system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 13063-13068

Zhu L, Ling S, Yu XD, Venkatesh LK, Subramanian T, Chinnadurai G, Kuo TH (1999) Modulation of mitochondrial Ca²⁺ homeostasis by Bcl-2. *The Journal of biological chemistry* **274**: 33267-33273

Zong WX, Ditsworth D, Bauer DE, Wang ZQ, Thompson CB (2004) Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes & development* **18**: 1272-1282

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997) Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**: 405-413

Zunino F, Perego P, Pilotti S, Pratesi G, Supino R, Arcamone F (1997) Role of apoptotic response in cellular resistance to cytotoxic agents. *Pharmacology & therapeutics* **76**: 177-185

10. ANEXOS

10.1. Material Suplementario

| Gen | Símbolo | Regulación (+/-) Mito | Regulación (+/-) Mito + NU7026 | Regulación (+/-) Mito + NU7441 |
|---|----------|-----------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase | ABL1 | 1,02 | 1,09 | -1,33 |
| V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 | AKT1 | -1,14 | -1,10 | -1,33 |
| Apoptotic peptidase activating factor 1 | APAF1 | -1,11 | 1,69 | 1,27 |
| Amyloid beta (A4) precursor protein | APP | -1,08 | 1,21 | 1,04 |
| ATG12 autophagy related 12 homolog (S. cerevisiae) | ATG12 | 1,50 | 2,29 | 1,45 |
| ATG16 autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae) | ATG16L1 | -1,63 | -1,77 | -1,37 |
| ATG3 autophagy related 3 homolog (S. cerevisiae) | ATG3 | -1,02 | -1,33 | -1,53 |
| ATG5 autophagy related 5 homolog (S. cerevisiae) | ATG5 | -1,07 | 1,17 | 1,01 |
| ATG7 autophagy related 7 homolog (S. cerevisiae) | ATG7 | -1,28 | 1,05 | -1,25 |
| ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G2 | ATP6V1G2 | 1,17 | 1,52 | 1,25 |
| BCL2-associated X protein | BAX | -2,42 | -6,58 | -7,24 |
| B-cell CLL/lymphoma 2 | BCL2 | -1,40 | -1,95 | -2,69 |
| BCL2-related protein A1 | BCL2A1 | 1,29 | 2,61 | 1,62 |
| BCL2-like 1 | BCL2L1 | -1,53 | -1,97 | -2,43 |
| BCL2-like 11 (apoptosis facilitator) | BCL2L11 | 1,12 | 2,07 | 1,19 |
| Beclin 1, autophagy related | BECN1 | 1,24 | 1,66 | 1,26 |
| Baculoviral IAP repeat containing 2 | BIRC2 | 1,30 | 2,01 | 1,38 |
| Baculoviral IAP repeat containing 3 | BIRC3 | 3,61 | 6,60 | 4,30 |
| Bcl2 modifying factor | BMF | 1,06 | 5,46 | 2,61 |
| Chromosome 1 open reading frame 159 | C1orf159 | 1,58 | 1,14 | -1,33 |
| Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase) | CASP1 | -4,15 | -1,18 | -1,47 |
| Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP2 | -1,11 | 1,08 | -1,10 |
| Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP3 | 1,14 | 1,62 | 1,25 |
| Caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP6 | -1,37 | -1,32 | -1,48 |
| Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP7 | -1,05 | 1,23 | -1,12 |
| Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP9 | -1,94 | 1,23 | 1,05 |
| Coiled-coil domain containing 103 | CCDC103 | 1,28 | 2,59 | 2,90 |
| CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5 | CD40 | -1,21 | 1,04 | -1,30 |

| | | | | |
|--|----------|---------------|-----------------|----------------|
| CD40 ligand | CD40LG | -2,69 | -2,07 | -5,62 |
| CASP8 and FADD-like apoptosis regulator | CFLAR | 1,42 | 2,08 | 1,79 |
| COMM domain containing 4 | COMMD4 | 1,11 | 1,27 | -1,02 |
| Cathepsin B | CTSB | -1,18 | 1,37 | 1,05 |
| Cathepsin S | CTSS | 1,26 | 1,72 | 1,92 |
| Cylindromatosis (turban tumor syndrome) | CYLD | 2,27 | 3,88 | 3,37 |
| Defensin, beta 1 | DEFB1 | 1,14 | 1,14 | -2,07 |
| DENN/MADD domain containing 4A | DENND4A | -1,03 | 1,35 | 1,10 |
| DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide | DFFA | 1,04 | -1,19 | -1,52 |
| Dihydropyrimidinase-like 4 | DPYSL4 | 1,24 | 2,65 | 2,25 |
| Eukaryotic translation initiation factor 5B | EIF5B | -1,00 | -1,27 | -1,30 |
| Estrogen receptor 1 | ESR1 | -1,19 | -2,24 | -3,02 |
| Fas (TNF receptor superfamily, member 6) | FAS | 1,23 | 1,31 | 1,19 |
| Fas ligand (TNF superfamily, member 6) | FASLG | -1,09 | -4,07 | -60,71 |
| Forkhead box I1 | FOXI1 | 1,45 | 1,95 | 1,27 |
| Glucosidase, alpha; acid | GAA | 1,02 | 1,51 | 1,04 |
| Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha | GADD45A | 10,67 | 13,37 | 7,59 |
| UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 5 (GalNAc-T5) | GALNT5 | -2,55 | -1,35 | 1,07 |
| Growth factor receptor-bound protein 2 | GRB2 | -1,16 | 1,05 | 1,05 |
| HSPB (heat shock 27kDa) associated protein 1 | HSPBAP1 | 1,43 | 1,76 | 1,26 |
| Huntingtin | HTT | -1,17 | 1,17 | -1,16 |
| Interferon, gamma | IFNG | -2,12 | -13,80 | -9,12 |
| Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C) | IGF1 | -2,29 | -15,50 | -18,50 |
| Insulin-like growth factor 1 receptor | IGF1R | 168,39 | 10800,42 | 3680,84 |
| Insulin | INS | -3,88 | -12,84 | -21,93 |
| Immunity-related GTPase family, M | IRGM | 1,29 | 3,82 | -1,74 |
| Junctophilin 3 | JPH3 | -2,43 | -3,91 | -4,67 |
| Kv channel interacting protein 1 | KCNIP1 | -6,22 | -63,26 | -33,00 |
| Myelin associated glycoprotein | MAG | 6,54 | 2,16 | 2,97 |
| Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha | MAP1LC3A | 1,03 | 1,83 | -1,28 |
| Mitogen-activated protein kinase 8 | MAPK8 | 1,33 | 1,63 | 1,48 |
| Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related) | MCL1 | -1,01 | 1,32 | -1,05 |
| Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 | NFKB1 | 1,67 | 1,86 | 1,25 |
| Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain) | NOL3 | -1,16 | -1,13 | -1,30 |
| Olfactory receptor, family 10, subfamily J, member 3 | OR10J3 | 1,89 | -2,98 | -3,56 |

| | | | | |
|--|-----------|-------------|-------------|--------------|
| Poly (ADP-ribose) polymerase 1 | PARP1 | -1,09 | -1,76 | -1,47 |
| Poly (ADP-ribose) polymerase 2 | PARP2 | -1,06 | -1,58 | -1,56 |
| Phosphoinositide-3-kinase, class 3 | PIK3C3 | 1,24 | 1,50 | 1,10 |
| Poliovirus receptor | PVR | 1,83 | 1,72 | 1,01 |
| RAB25, member RAS oncogene family | RAB25 | 1,25 | 1,11 | -1,14 |
| Ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1 | RPS6KB1 | 1,00 | 1,48 | 1,25 |
| S100 calcium binding protein A7A | S100A7A | -1,41 | -1,32 | 1,27 |
| Synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor) | SNCA | -1,79 | -1,83 | -2,02 |
| Spermatogenesis associated 2 | SPATA2 | 1,20 | 1,25 | 1,01 |
| Sequestosome 1 | SQSTM1 | 1,36 | 1,89 | 1,88 |
| Synaptonemal complex protein 2 | SYCP2 | 1,03 | 1,49 | -1,31 |
| Transmembrane protein 57 | TMEM57 | -1,05 | 1,01 | -1,26 |
| Tumor necrosis factor | TNF | 3,90 | 9,45 | 1,80 |
| Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a | TNFRSF10A | 1,27 | -1,02 | -1,38 |
| Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b | TNFRSF11B | 3,57 | 2,67 | 2,53 |
| Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A | TNFRSF1A | -1,34 | -1,44 | -1,62 |
| Tumor protein p53 | TP53 | 1,78 | 4,00 | 1,93 |
| TNF receptor-associated factor 2 | TRAF2 | -1,12 | 1,08 | -1,17 |
| Thioredoxin-like 4B | TXNL4B | 2,95 | 2,06 | 1,82 |
| Unc-51-like kinase 1 (C. elegans) | ULK1 | 1,75 | 3,71 | 2,30 |
| X-linked inhibitor of apoptosis | XIAP | 1,26 | 1,45 | 1,15 |
| Actin, beta | ACTB | -1,15 | -1,10 | -1,25 |
| Beta-2-microglobulin | B2M | 1,29 | 1,32 | 1,47 |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | GAPDH | -1,05 | -1,16 | -1,07 |
| Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 | HPRT1 | -1,09 | -1,18 | -1,26 |
| Ribosomal protein, large, P0 | RPLP0 | 1,01 | 1,14 | 1,16 |

Tabla 10.1. Expresión diferencial de genes en células tratadas con mitoxantrona en presencia o ausencia de NU7026 ó NU7441. Valores de cambios de expresión con respecto al control de 84 genes en células PC-3 tratadas durante 14 horas con mitoxantrona 0,3 μM en presencia o ausencia de NU7026 10 μM ó NU7441 1 μM , medidos mediante RT-qPCR array. En rojo se muestran los valores cuyo cambio de expresión es $> 1,95$ (regulación positiva); en azul se muestran los valores cuyo cambio de expresión es $< 1,95$ (regulación negativa). El array correspondiente al control y al tratamiento con mitoxantrona se realizó por duplicado, mientras que los arrays de los tratamientos combinados se realizaron una sola vez. Mito: mitoxantrona; Mito+NU7026: mitoxantrona+NU7026; Mito+NU7441: mitoxantrona+NU7441.

11. PUBLICACIONES

Proteomic Analysis of Annexin A2 Phosphorylation Induced by Microtubule Interfering Agents and Kinesin Spindle Protein Inhibitors

Belen Fernandez-Garcia,[†] Pedro Casado,[†] Miguel A. Prado,[†] Lorea J. Ugarte-Gil,[†] Noelia Artime,[†] Lucía Cabal-Hierro,[†] Enrique Calvo,[‡] Juan Antonio López,[‡] Sofía Ramos,[†] and Pedro S. Lazo^{*†}

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular and Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo, 33071 Oviedo, Spain, and Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid, Spain

Received April 27, 2010

Microtubule interfering agents (MIAs) are antitumor drugs that inhibit microtubule dynamics, while kinesin spindle protein (KSP) inhibitors are substances that block the formation of the bipolar spindle during mitosis. All these compounds cause the accumulation of mitotic cells and subsequently cell death. We used two-dimensional gel electrophoresis (2DE) followed by MALDI-MS analysis to demonstrate that the MIAs vinblastine (Velban) and paclitaxel (Taxol), as well as the KSP inhibitor S-trityl-L-cysteine, induce the phosphorylation of annexin A2 in human lung carcinoma A549 cells. Further tandem mass spectrometry analysis using a combination of peptide fragmentation methods (CID and ETD) and multiple reaction monitoring (MRM) analysis determined that this modification occurs mainly at threonine 19. We show that MIAs and KSP inhibitors only induce this phosphorylation in cells capable of reaching the M phase. Furthermore, we demonstrate that CDK activity is required for the phosphorylation of annexin A2 induced by MIAs and KSP inhibitors. Finally, we have used double thymidine block synchronization to demonstrate that annexin A2 is not phosphorylated during a normal mitosis, indicating that this phosphorylation of annexin A2 is a specific response to these drugs.

Keywords: 2DE • annexin A2 • mass spectrometry • vinblastine • mitosis • phosphorylation

Introduction

Microtubule dynamics is a relevant process during mitosis where the microtubule architecture undergoes intense modifications. This implication in cell division makes microtubules an important target for antitumor drugs.¹

Microtubule interfering agents (MIAs) are substances that bind to tubulin and block microtubule dynamics.² This blockage makes the cells unable to satisfy the mitotic checkpoint requirements, therefore causing the accumulation of M phase cells. Eventually, most of these mitotic cells will die through different mechanisms.³ MIAs are the most frequently used and most effective drugs in cancer treatment; therefore, intensive studies of these drugs, as well as of compounds with similar mechanisms of action, have been carried out over the last years. Nowadays, the most used MIAs for cancer treatment are vinca alkaloids (VAs) and taxanes.⁴

VAs are drugs derived from the periwinkle *Catharanthus roseus*. This group comprises natural molecules such as vincristine (Oncovin) and vinblastine (Velban) and semisynthetic molecules such as vinorelbine (Navelbine).⁵ These agents

inhibit microtubule dynamics by binding to the interface of two tubulin heterodimers. This interaction forms a wedge that blocks the polymerization of microtubules.⁶

Taxanes are drugs derived from the trees *Taxus baccata* and *Taxus brevifolia*. This group comprises the natural molecule paclitaxel (Taxol) and the semisynthetic molecule docetaxel (Taxotere). These agents block microtubule dynamics by binding to the taxane binding domain of β -tubulin. This event stabilizes the microtubule network and inhibits its depolymerization.²

Many molecular effects of MIAs are still unknown. Thus, the determination of these molecular actions is of great importance since they may be related to side effects and resistance development, one of the major problems after MIA treatment.

Some of these unwanted effects are caused by the inhibition of microtubule dynamics in nondividing cells. In the past few years, kinesin spindle protein (KSP) has become a new target for cancer treatment. This mitotic kinesin is essential for the formation of the bipolar spindle.⁷ KSP activity can be specifically inhibited with compounds, for example, S-trityl-L-cysteine (STLC) or Ispinesib, directed to loop 5, which is not present in other related kinesins. As for MIAs, treatment of cells with these inhibitors makes the cells unable to satisfy the mitotic checkpoint causing their accumulation at the mitotic phase and eventually causing them to die. However, these substances

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +34-985102717. Fax: +34-985104213. E-mail: pslazo@uniovi.es.

[†] Universidad de Oviedo.

[‡] Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

cause fewer side effects, since they do not have any described effect in nondividing cells. Currently, the KSP inhibitor Ispinesib is in phase II clinical trials.⁸

Annexins are calcium-dependent phospholipid-binding proteins implicated in many cellular functions. These proteins have a highly conserved C-terminal annexin core domain implicated in lipid and ion binding and a variable N-terminal domain that participates in the interaction with the S100 protein family.⁹ Annexin A2 (Anx A2) is also able to bind cholesterol containing membranes in a calcium-independent manner.¹⁰ This annexin can be found as monomers or forming heterotetramers normally with S100A10 (also known as p11).¹¹ As a lipid-interacting protein, annexin A2 is implicated in several membrane-related events, such as the organization of membrane domains or membrane-cytoskeleton linkages,¹² endocytosis and exocytosis,^{13,14} cell-cell adhesion,¹⁵ cell surface fibrinolysis,¹⁶ and the regulation of ion channels.¹⁷ Furthermore, annexin A2 interacts with actin and plays a role in actin filament dynamics.¹⁸ This annexin has also been detected in the nucleus, and in vitro experiments show that it can enhance DNA polymerase α .¹⁹ In relation to tumorigenesis, several publications associate annexin A2 with cell proliferation,^{20–22} migration and differentiation,^{23,24} invasion,²⁵ angiogenesis, and metastasis.²⁶ However, the role of annexin A2 in cancer is controversial since it is upregulated in hepatocellular carcinoma, pancreatic adenocarcinoma, high-grade glioma, gastric carcinoma, acute promyelocytic leukemia, primary colorectal cancer, lung cancer, breast cancer, and cervical squamous cell carcinoma but downregulated in laryngeal or esophageal squamous cell carcinoma and prostate adenocarcinoma.²⁷ Moreover, annexin A2 is overexpressed in multidrug-resistant breast cancer cells,²⁵ and it is processed by the protease Omi/HtrA2 during cisplatin-induced apoptosis.²⁸ It has been associated with p53-induced cell death,²⁹ and there is also one study that correlates the combination of annexin 2 presence and annexin A1 absence with poor response to neoadjuvant chemotherapy in advanced breast cancer.³⁰

In the past few years, the development of proteomic techniques has made two-dimensional gel electrophoresis (2DE) followed by mass spectrometry (MS) analysis a powerful tool for the analysis of complex protein mixtures. This methodology has been recently used to investigate proteins that are regulated by chemotherapeutic agents.^{31,32} By using 2DE and MS analysis, we have determined that MIAs and the KSP inhibitor STLC induce the phosphorylation of annexin A2 at least at threonine 19 (T19) in A549 cells. We have also demonstrated that cells have to reach the M phase for this phosphorylation to occur during mitosis and that CDK activity appears to be required. Finally, we show that this phosphorylation does not occur during a normal mitosis, which clearly indicates that it is a specific response to the drug treatment.

Experimental Section

Cell Culture, Treatment, and Synchronization. A549 cells were propagated in DMEM F12 (Lonza), containing 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin and 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Lonza). For experiments, cells were treated with 0.1 μM vinblastine (Sigma), 0.1 μM paclitaxel (Sigma), and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aphidicolin (Sigma), which were dissolved in ethanol, and 5 μM STLC (Calbiochem) and 50 μM roscovitine (Calbiochem), which were dissolved in DMSO. The final concentrations of ethanol and DMSO were 0.01%. For cell synchronization, double thymidine block was used.³³ Briefly, A549 cells were

grown in medium containing 2 mM thymidine for 16 h. Then, they were washed with PBS and grown in fresh medium without thymidine for 10 h. After that, cells were grown again for 16 h in medium supplemented with 2 mM thymidine to obtain a culture of cells arrested at S phase. Finally, cells were released by replacing the thymidine supplemented medium with fresh medium and harvested when required.

Flow Cytometry. Cells were collected by trypsinization and fixed for at least 30 min in 70% ethanol at -20°C . Then, ethanol was removed, and cells were stained with staining solution (PBS supplemented with 0.1% (v/v) sodium citrate, pH 7.4, 0.2 mg/mL RNase A, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide). Cell cycle was analyzed in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) using Cytomics RXP and ModFYT software.

Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2DE). Protein separation analysis by 2DE experiments was carried out as described previously.³⁴ Briefly, cells were solubilized in UTATH buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 1% (v/v) amidosulfobetaine-14, 50 mM 2-hydroxyethyl disulfide (HED), 0.5% (v/v) IPG buffer, pH 3–10 (Bio-Rad)] and desalted with a desalting spin column (Pierce), and 60–100 μg of protein was loaded onto a strip holder. The first dimension was run in 7 cm Immobiline DryStrips pH 3–11 (GE-Healthcare) for 12 h at 30 V, 250 V h at 500 V, 500 V h at 1000 V and 8000 V h at 5000 V. For second dimension, strips were equilibrated in equilibration buffer (6 M urea, 30% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 0.002% (w/v) bromophenol blue) and run in 10% polyacrylamide gels supplemented with 50 mM HED and 6 M urea.

Gel Staining and Spot Quantitation. Gels were sequentially stained with the phosphospecific dye ProQ-Diamond (Invitrogen) and with the general protein dye Sypro-Ruby (Invitrogen) as indicated by the manufacturer's protocol, and scanned with a Typhoon Trio (GE Healthcare). Spot intensities were measured with Same Spots software (Nonlinear Dynamics) using the Sypro-stained electropherograms. For manual excision of spots of interest, gels were stained with Coomassie blue. Thus, gels were fixed with fixing solution (20% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid) for 24 h, stained with Coomassie solution (0.25% (w/v) brilliant blue R250, 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid) for 2 h, and destained with fixing solution for 24 h.

MALDI-MS Analysis and Database Searching. Protein spots from Coomassie-stained gels were manually excised, destained in destaining solution [50 mM HED, 25 mM ammonium bicarbonate/ACN 70:30 (v/v)] and incubated with 12 ng/mL trypsin (Promega) in 25 mM ammonium bicarbonate at 60°C for 1 h. Four microliters of 1% TFA was added to each sample. Then, the samples were sonicated for 10 min and desalted with a ZipTip (Millipore). Peptides were eluted with 2 μL of matrix solution, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) (10 mg/mL) in ACN/0.1% TFA (50:50 v/v). Protein identification by MALDI-MS was performed on a Voyager-DE STR (Applied Biosystems). Data from 50–200 laser shots were collected to produce a mass spectrum in a mass range of 1000–4000 Da.

The resulting raw data files from MALDI-MS analysis were converted into complete peak lists using Data Explorer 4.0.0 (Applied Biosystems) software, using baseline correction, noise filter, and deisotoping. The mass spectrum data were searched against Swiss-Prot database (release 56.9) restricted to human subset database (20 276 entries) using the Aldente software (version 11/02/2008, <http://www.expasy.org/tools/aldente/>).³⁵ Peptide tolerances in MS and MS/MS modes were 200 ppm and 0.2 Da, respectively. Trypsin was designated as protease,

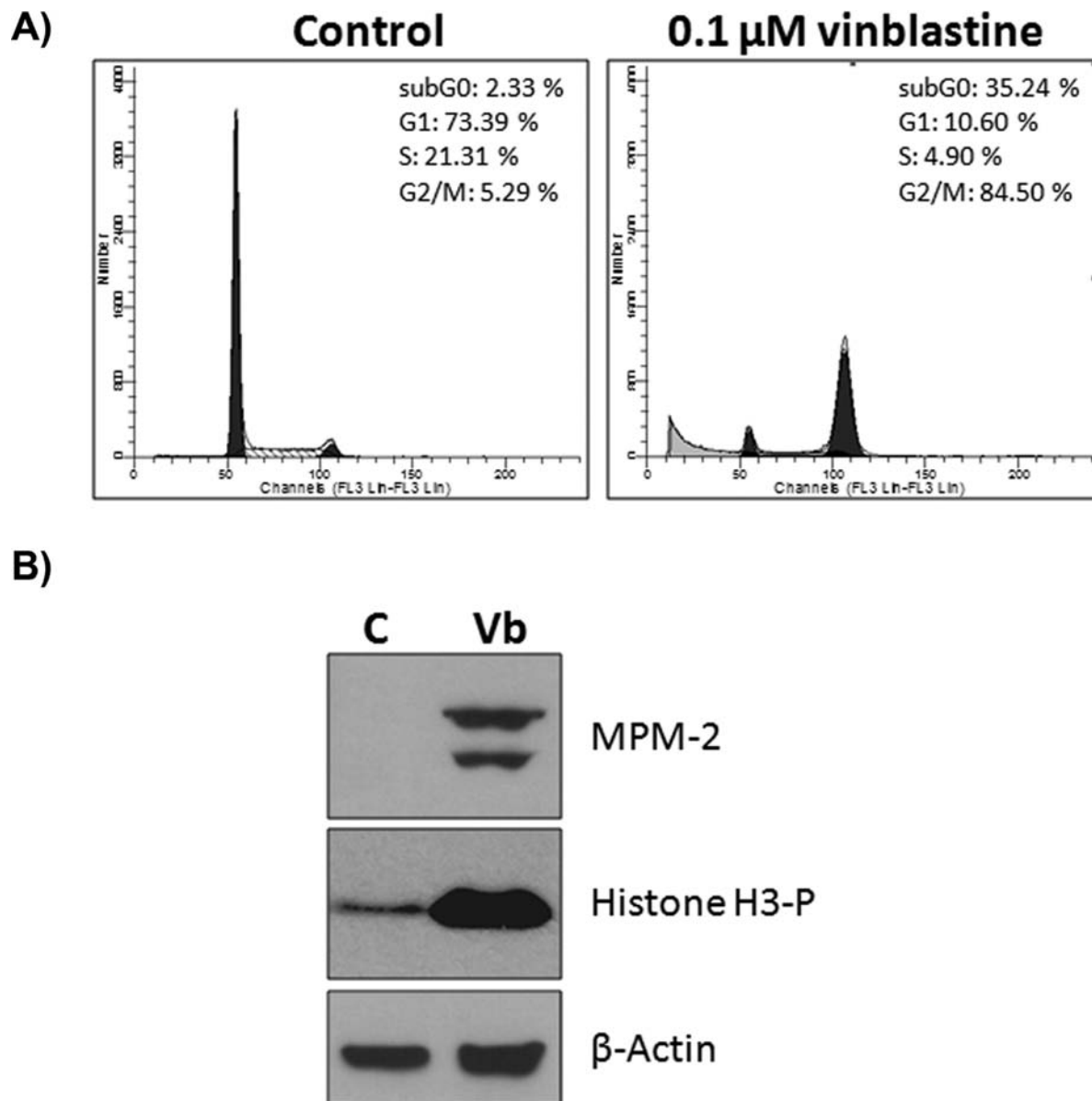


Figure 1. Vinblastine induces cell death and causes the accumulation of mitotic cells. A549 cells were treated with vehicle (control) or 0.1 μ M vinblastine for 20 h: (A) cells were stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry; (B) cell extracts were subjected to Western blot analysis using antibodies against phosphorylate histone H3 at serine 10 (upper panel), MPM2 epitopes (middle panel), and β -Actin (lower panel).

and one missed cleavage was allowed; searches were performed with HED-modified cysteine and oxidation of methionine residues allowed as variable modifications.

MS Analysis by LTQ-Orbitrap XL-ETD. Protein spots from Coomassie-stained gels were excised and digested with trypsin or Lys-C endoproteases. Gel plugs were reduced with 10 mM DTT in 50 mM ammonium bicarbonate and alkylated with 50 mM iodoacetamide in 50 mM ammonium bicarbonate. For trypsin digestion, modified porcine trypsin (sequencing grade, Promega) was added at a final ratio of 1:50 (trypsin/protein) in 50 mM ammonium bicarbonate to the dried gel pieces. For the Lys-C digestion, 0.3 μ g of endoproteinase Lys-C (Sigma) was added per reaction. In both cases, digestion proceeded overnight at 37 $^{\circ}$ C. The resulting digestion solutions were vacuum-dried and finally dissolved in 1% acetic acid for protein identification and characterization by nano LC-MS analysis.

Peptides were injected onto a C-18 reversed phase (RP) nanocolumn (100 μ m internal diameter and 12 cm, Mediter-

ranea sea, Teknokroma) and analyzed in a continuous acetonitrile gradient consisting of 0–40% B in 45 min, 50–90% B in 1 min (B = 95% acetonitrile, 0.5% acetic acid). A flow rate of 300 nL/min was used to elute peptides from the RP nanocolumn to an emitter nanospray needle for real time ionization and peptide fragmentation on an ETD equipped LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher). An enhanced FT-resolution spectrum (resolution = 30 000) followed by the data-dependent fragmentation spectra from the three most intense parent ions (dissociated using two different activations, ETD and CID) were performed on each ion and analyzed along the chromatographic run (70 min). Complementary activation by ETD was conducted to facilitate the fragmentation of phosphorylated peptide precursors; the reaction time of peptide precursors with fluoranthene was set at 100 ms. Dynamic exclusion was set at 0.5 min.

For protein identification and posttranslational modification characterization, fragmentation spectra were searched against

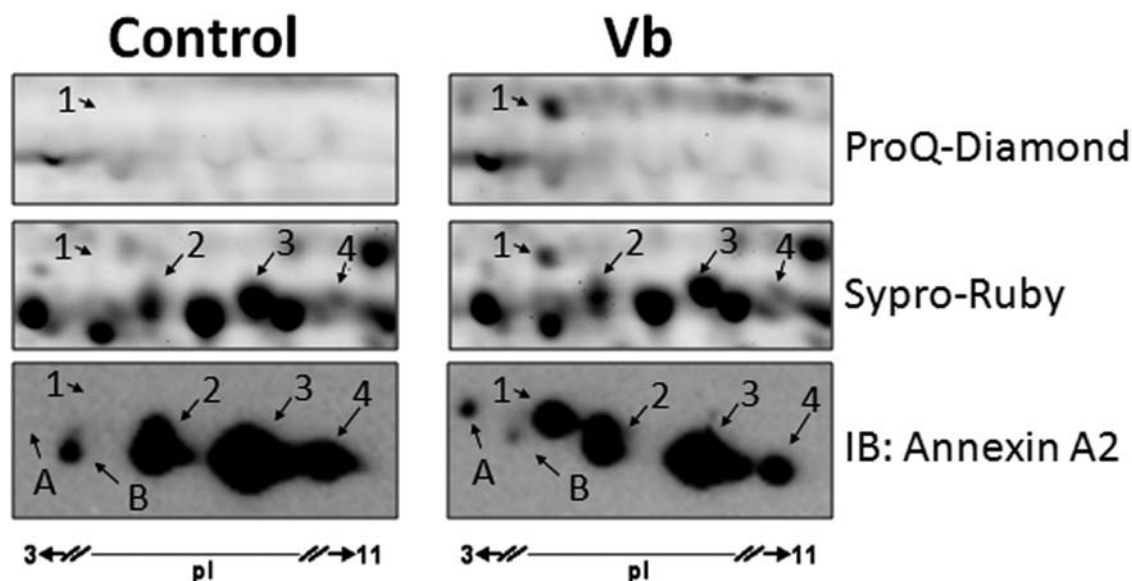


Figure 2. Annexin A2 is affected by vinblastine treatment in A549 cells. Cells were treated with vehicle (control) or 0.1 μM vinblastine for 20 h. Cell extracts were resolved in a 2DE. Then, proteins were stained with ProQ-Diamond (upper panels) or Sypro-Ruby (middle panels) or transferred to a PVDF membrane and subjected to Western blot analysis using antibodies against annexin A2 (lower panels). Only the region of interest of the 2D-gel is shown.

Table 1. Identification and Quantification of the Indicated Spots in Vinblastine-Treated Cells

| spot ^a | fold change | p-value | protein | accession number | score | % con ^b | no. of unique peptides |
|-------------------|-------------|---------|---------|------------------|--------|--------------------|------------------------|
| 1 | 3.9 | 0.004 | ANXA2 | P07355 | 93.52 | 43 | 11 |
| 2 | 1.0 | 0.856 | ANXA2 | P07355 | 129.71 | 49 | 12 |
| 3 | 1.1 | 0.576 | ANXA2 | P07355 | 209.11 | 53 | 13 |
| 4 | 1.1 | 0.729 | ANXA2 | P07355 | 49.88 | 30 | 8 |

^aSpot number according to Figure 2. ^bPercentage of sequence coverage.

MSDB database using the Mascot software (Matrix Science, London, U.K.; <http://www.matrixscience.com>). Two missed cleavages were allowed, and an error of 10 ppm or 0.8 Da was set for full MS or MS/MS spectra searches, respectively. Oxidation of methionine and phosphorylation of serine, threonine, and tyrosine were used as variable modifications. All identifications were performed by Proteome Discoverer 1.0 software (Thermo Fisher). Decoy database search for FDR (false discovery rates) analysis was set at 0.05 by applying corresponding filters. Manual spectra inspection was conducted on all potential phosphopeptides to eliminate false positives. Each final data set was the result of four biological replicates.

Multiple Reaction Monitoring (MRM) Experiments. Samples were treated following the same previously detailed preparation protocol and analyzed with a 4000 Q-Trap hybrid system (Applied Biosystems). An MRM analysis of selected pairs followed by an enhanced resolution scan (for charge and mass determination), and an enhanced product ion scan (for sequence CID fragmentation) were analyzed along the chromatographic run (80 min).

For protein identification and posttranslational modification characterization, all MS/MS spectra were searched against MSDB database using the Analyst 1.4 software (Applied Biosystems).

Western Blot Analysis. For 1D Western blot analysis, cell extracts were obtained in Laemmli buffer and heat denatured, and 5–10 μg of protein was electrophoresed on 10% SDS-PAGE

gels. For 2DE Western blot analysis, cell were extracted in UTATH buffer and separated as described above. After electrophoresis, proteins were transferred to PVDF membranes (Millipore). Membranes were blocked with TBS/Tween-20 supplemented with 5% w/v nonfat milk for 1 h at room temperature, then incubated with primary antibody overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$ and with secondary antibody for 1 h at room temperature and developed with enhanced chemiluminescence reagents (GE-Healthcare). Anti-annexin A2 (BD Bioscience, cat. no. 610068), anti-p54^{mtb} (BD Biosciences, cat. no. 611278), anti-phospho-Ser/Thr-Pro MPM-2 (Millipore, cat. no. 05-368), anti-histone H3 phosphorylated at serine 10 (Santa Cruz, cat. no. sc-8656), anti- β -actin (Sigma, cat. no. A-5441), anti-rabbit peroxidase (Cell Signaling, cat. no. 7074), and anti-mouse peroxidase (Sigma, cat. no. A-9044) were used at 1:10 000, 1:10 000, 1:2000, 1:50 000, 1:20 000, 1:20 000, and 1:10 000 dilutions, respectively.

In Vitro Dephosphorylation Assay. Vinblastine-treated cells were lysed in UTATH buffer. Once UTATH was removed using a Microcone filter device (Millipore), proteins were recovered in water and quantified by Bradford assay. Proteins (560 μg) were dephosphorylated with λ protein phosphatase (λ -PPase) (New England BioLabs) as described in the manufacturer's protocol. After elimination of reaction buffer with a microcone, proteins were recovered in UTATH buffer and separated by 2DE as described above.

Results and Discussion

Response of A549 Cells to Vinblastine Treatment. Treatment of cells with VAs induces an accumulation of cells at M phase and eventually cell death. To confirm these effects in our culture conditions, A549 cells were treated with either vehicle or 0.1 μM vinblastine for 20 h. DNA content of these cells was analyzed using propidium iodide staining followed by flow cytometry. The results showed that vinblastine addition increases the peak that comprises the unviable subG0 cell population as well as the peak that comprises cells at G2 or M phase (Figure 1A). To distinguish between G2 and M cells, we

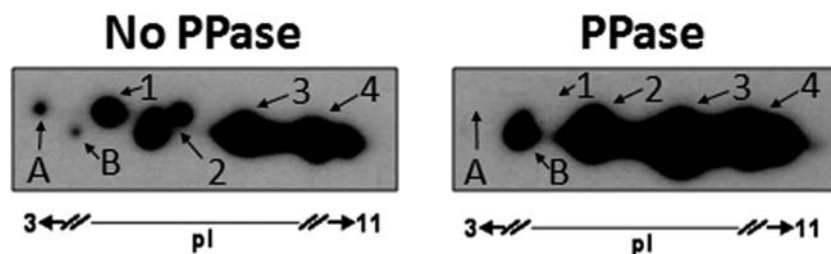


Figure 3. Identification of phosphorylated annexin A2 in vinblastine-treated cells. Cell extracts from vinblastine-treated A549 cells were incubated in the presence or the absence of λ -PPase. After incubation, cell extracts were analyzed by 2DE followed by Western blot analysis using antibodies against annexin A2.

used the activity of two mitotic kinases: histone H3 phosphorylated at serine 10, considered as a substrate of aurora B kinase,^{36,37} and the epitopes recognized by the MPM-2 antibody, considered as substrates of CDK1. These epitopes are phosphorylated serines or threonines followed by a proline ([S/T]P) and are strongly phosphorylated during the M phase.³⁸ Western blot analysis showed that both phosphorylated histone H3 and MPM-2 epitopes increase after vinblastine treatment (Figure 1B). These data demonstrate that in our culture conditions vinblastine induces cell death and the accumulation of cells at M phase.

Identification of Annexin A2 as a Vinblastine-Regulated Protein. To study the proteins altered upon vinblastine treatment, A549 cells were treated with either vehicle or 0.1 μ M vinblastine for 20 h. Protein extracts were separated by 2DE, and proteins were sequentially stained with ProQ-Diamond and Sypro-Ruby dyes. The electropherogram obtained after Sypro-Ruby staining showed several up-regulated spots in vinblastine-treated cells (not shown). Among these, we focused our attention on a spot that we named 1 (Figure 2, middle panels). Fluorescence quantification of three independent experiments with SameSpots software (using Sypro-Ruby staining images) determined that spot 1 undergoes a statistically significant ($p \leq 0.05$) increase of 3.9 fold after drug treatment (Table 1). Spot 1 was also stained with the phosphospecific dye ProQ-Diamond, indicating the presence of phosphorylated proteins in this spot (Figure 2, upper panels). For protein identification, gels were stained with Coomassie blue, and spot 1 was manually excised from the gel and digested with trypsin. Then, the peptides obtained were analyzed by MALDI-MS. Aldente analysis of MS data demonstrated that spot 1 contains annexin A2 with a statistically significant score of 93.52 (Table 1). The presence of annexin A2 in spot 1 was confirmed using Western blot analysis (Figure 2, lower panels). This analysis also revealed another five spots containing annexin A2 (named 2, 3, 4, A, and B), which differ in their electrophoretic mobility very likely as a consequence of post-translational modifications of the protein. Spots 2, 3, and 4 were also observed in Sypro-Ruby electropherograms but not after ProQ-Diamond staining (Figure 2, upper and middle panels). Fluorescence quantification determined no significant variation of these spots after drug treatment. Spot A (induced in vinblastine-treated cells) and spot B were not localized in gels stained with Sypro-Ruby, and they were therefore not quantified.

Identification of Phosphorylated Annexin A2 in Vinblastine-Treated Cells. As described above, spot 1 but not spots 2, 3, and 4 was stained with the phosphospecific dye ProQ-Diamond (Figure 2, upper panels) indicating that annexin A2 is phosphorylated after vinblastine treatment. To confirm that the vinblastine-induced forms of annexin A2 are phosphory-

lated, an *in vitro* dephosphorylation assay was performed. Thus, protein extracts from cells treated with 0.1 μ M vinblastine for 20 h were incubated in the presence or in the absence of λ -PPase, as described in the Experimental Section. Then, extracts were subjected to 2DE followed by Western blot analysis. Vinblastine-induced forms of annexin A2 (spots 1 and A) were undetected after phosphatase treatment (Figure 3), clearly indicating that vinblastine induced the phosphorylation of annexin A2.

To characterize the phosphorylation site(s) induced by vinblastine, spots containing annexin A2 were excised and digested with trypsin or Lys-C endoproteases, and the resulting peptides mixtures were subjected to LC-MS/MS analysis using an ETD equipped LTQ-Orbitrap XL hybrid system. The combination of the two different proteases allowed the identification of annexin A2 with high sequence coverage (61%; Supplemental Figure S1, Supporting Information). MS analysis of peptides in spot 1 showed unambiguously the presence of a phosphorylation site at residue T19 in the sequence LSLEGDH-StPPSAYGSVK, where t is the phosphothreonine (Figure 4). This phosphopeptide was characterized using two different activation forms, CID and ETD (Figure 4A,B, respectively).

Despite T19 being the most abundant phosphorylation site within the annexin A2-derived peptides, other phosphorylation sites were also detected, but with lower intensity. Thus, the analysis of the CID fragmentation spectrum unveils phosphorylation of residues S18 and S22 (Figure 4A, insert). In addition, the analysis of the ETD fragmentation spectrum revealed the presence of phosphorylated residues at S12 and Y24. All these phosphorylation sites were confirmed by the comprehensive analysis of the corresponding ETD fragmentation spectra (Supplementary Figure S2, Supporting Information).

It has been previously demonstrated that the phosphorylation of annexin A2 at Y23 by Src regulates actin remodelling and cell scattering. These events implicate Y23 phosphorylation in the epithelial–mesenchymal transition,³⁹ and also, phosphorylation in Y23 regulates translocation of annexin A2 to the cell surface.⁴⁰ Furthermore, the phosphorylation of annexin A2 at serine 25 by PKC regulates nuclear entry of this protein.⁴¹ This nuclear localization has been related to DNA synthesis and cell proliferation. It has been also demonstrated that serine 11 can be phosphorylated by PKC *in vitro* and that the phosphorylation at this position also regulates the nuclear localization of the protein.⁴² Phosphorylation of annexin A2 at serine 18 has been detected in protein extracts from isolated mitotic spindles.⁴³ However, phosphorylation of annexin A2 at threonine 19 has only been observed in large proteome analysis, and there are no data about the regulation or the function of this modification.^{44,45}

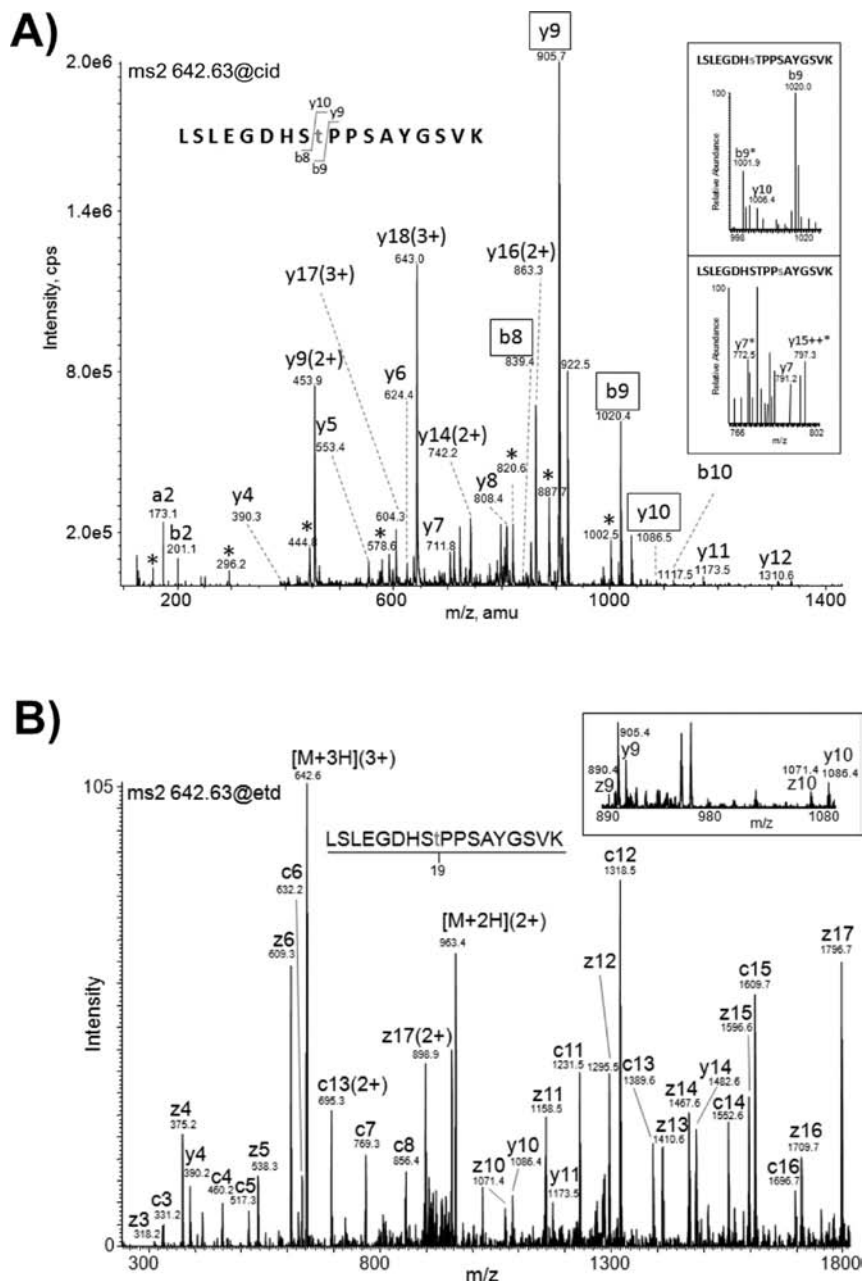


Figure 4. Characterization of the phosphorylation site in annexin A2 by CID and ETD activation. (A) Characterization of the triply charged peptide LSLEGDHSTPPSAYGSVK at m/z 642.4 Da by CID activation. The MS/MS spectrum displays the fragment ions corresponding to the principal fragmentation series (y-carboxy and b-amino). Water loss is labeled with an asterisk and doubly and triply charged fragment ions are marked with (2+) and (3+) symbols, respectively. Fragments for accompanied series (a series) are also labeled. The analysis of the spectrum indicates that T19 is the main phosphorylated residue, as demonstrated by both y-series (y9–y10) and b-series (b8–b9), numbered boxes; however, the detection of indicative fragments with lower intensity (inserts) suggests the presence of two additional phosphorylated sites within the molecule, that is, S18 (upper insert) and S22 (lower insert). (B) Characterization of the triply charged peptide LSLEGDHSTPPSAYGSVK by ETD activation. MS/MS spectrum of the peptide at m/z 642.4 Da displays the fragment ions corresponding to the principal fragmentation series (c-carboxy and z-amino). Doubly- and triply charged fragment ions are marked with (2+) and (3+) symbols. T19 is the main phosphorylated residue as demonstrated in the insert (ions z9 and z10).

Intracellular localization of annexin A2 appears to be closely associated with its ongoing distinct function.⁴⁶ Annexin A2 has a nuclear export signal (NES) domain in the N-terminus and several phosphorylation sites, and this might play an important role in regulating annexin A2 function in the nucleus. Also, the complex formed by annexin A2 and the antiapoptotic protein HSP27 translocates from cytoplasm into nuclei after UVC radiation, and this event is involved in UVC resistance in human cells.⁴⁷ In our study, we demonstrate that Vb induces

the phosphorylation of annexin A2 at least in T19, and we propose that this modification might be regulating the intracellular localization and therefore the activity of annexin A2.

Induction of Annexin A2 Phosphorylation by Taxanes and KSP Inhibitors. Once we demonstrated that vinblastine induces the phosphorylation of annexin A2, we analyzed whether other mitotic damaging agents also induce this modification. Thus, A549 cells were treated with vehicle, 0.1 μ M vinblastine, 0.1 μ M paclitaxel, or 5 μ M STLC for 20 h.

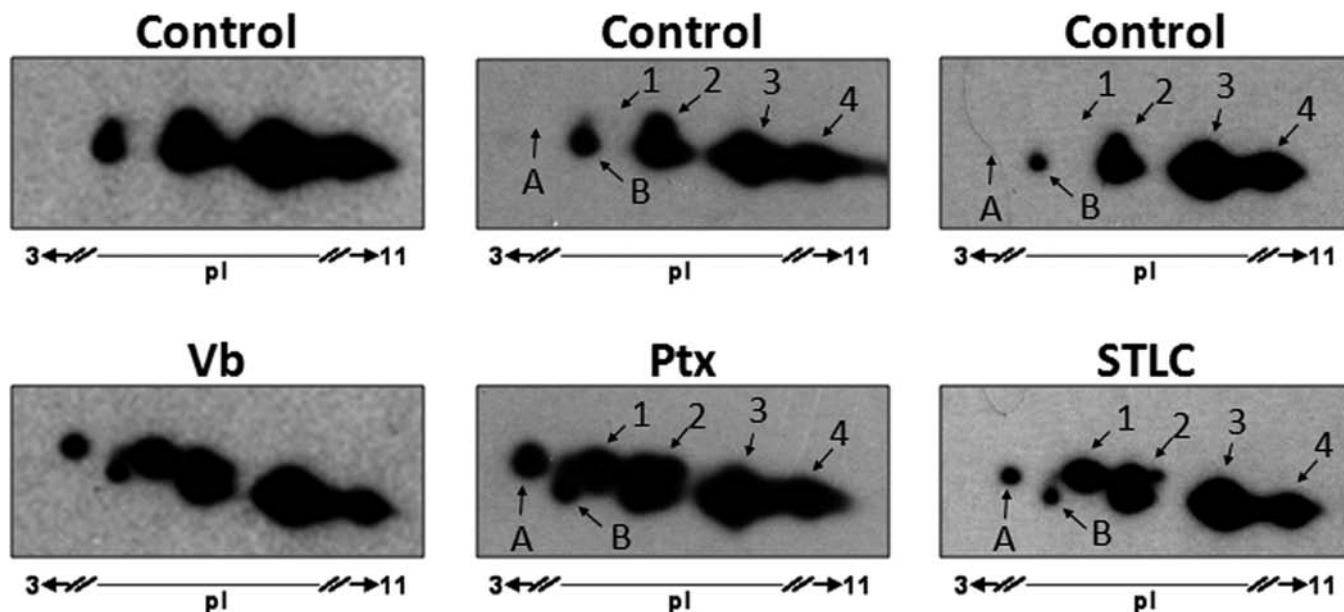


Figure 5. Taxanes and KSP inhibitors also induce the phosphorylation of annexin A2. A549 cells were treated for 20 h with vehicle (control) or 0.1 μ M vinblastine (Vb), 0.1 μ M paclitaxel (Ptx), or 5 μ M S-tritil-L-cysteine (STLC) as indicated. Then, cell extracts were subjected to 2DE followed by Western blot analysis using antibodies against annexin A2.

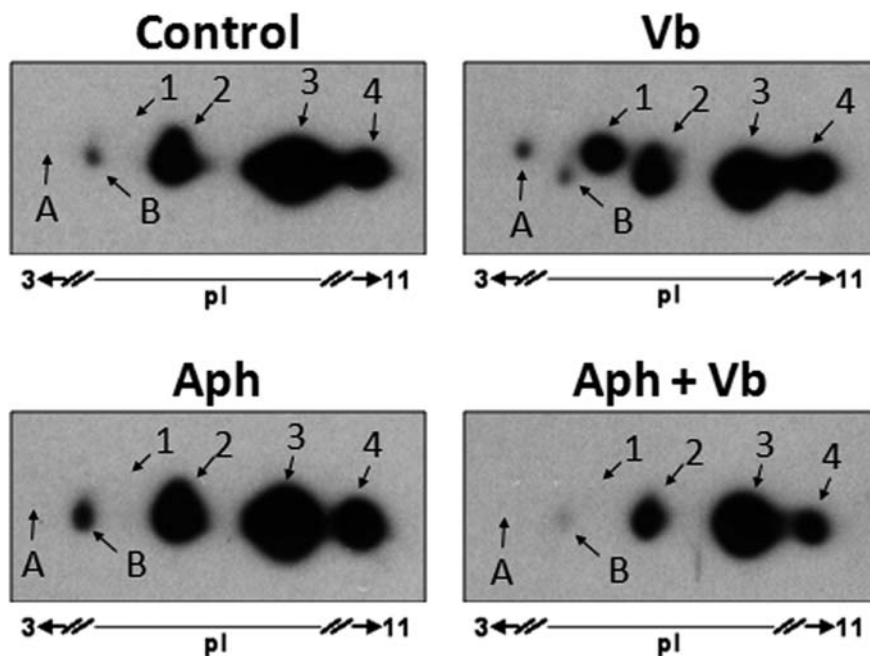


Figure 6. Aphidicolin-induced cell cycle arrest at S phase inhibits vinblastine-mediated phosphorylation of annexin A2. A549 cells were treated with vehicle (control), 0.1 μ M vinblastine (Vb), 2 μ g/mL aphidicolin (Aph) or the combination of both reagents (Aph + Vb) for 20 h. Aphidicolin was added 24 h before MIA treatment. Then, cell extracts were subjected to 2DE followed by Western blot analysis using antibodies against annexin A2.

Western blot analysis using antibodies against phosphorylated histone H3 and MPM-2 epitopes showed that all these drugs cause the accumulation of cells at M phase (Supporting Information, Figure S3A). 2DE followed by Western blot analysis showed that all MIAs and KSP inhibitors tested induced the phosphorylation of annexin A2 (Figure 5).

Relationship between the Accumulation of Mitotic Cells and the Phosphorylation of Annexin A2 Induced by Mitotic Damaging Agents. To analyze whether the accumulation of cells at M phase induced by mitotic damaging agents is necessary for the phosphorylation of annexin A2 to take place,

we arrested cells at the beginning of S phase by using the DNA polymerase inhibitor aphidicolin. Thus, A549 cells were treated with vehicle, 2 μ g/mL aphidicolin, 0.1 μ M vinblastine, or the combination of both reagents for 20 h. Aphidicolin was added 24 h prior to MIA treatment. Western blot analysis using antibodies against phosphorylated histone H3 and MPM-2 epitopes demonstrated that vinblastine is unable to induce the accumulation of mitotic cells in the presence of aphidicolin (Supporting Information, Figure S3B). 2DE of cell extracts followed by Western blot analysis showed that vinblastine induced the phosphorylation of annexin A2, as expected.

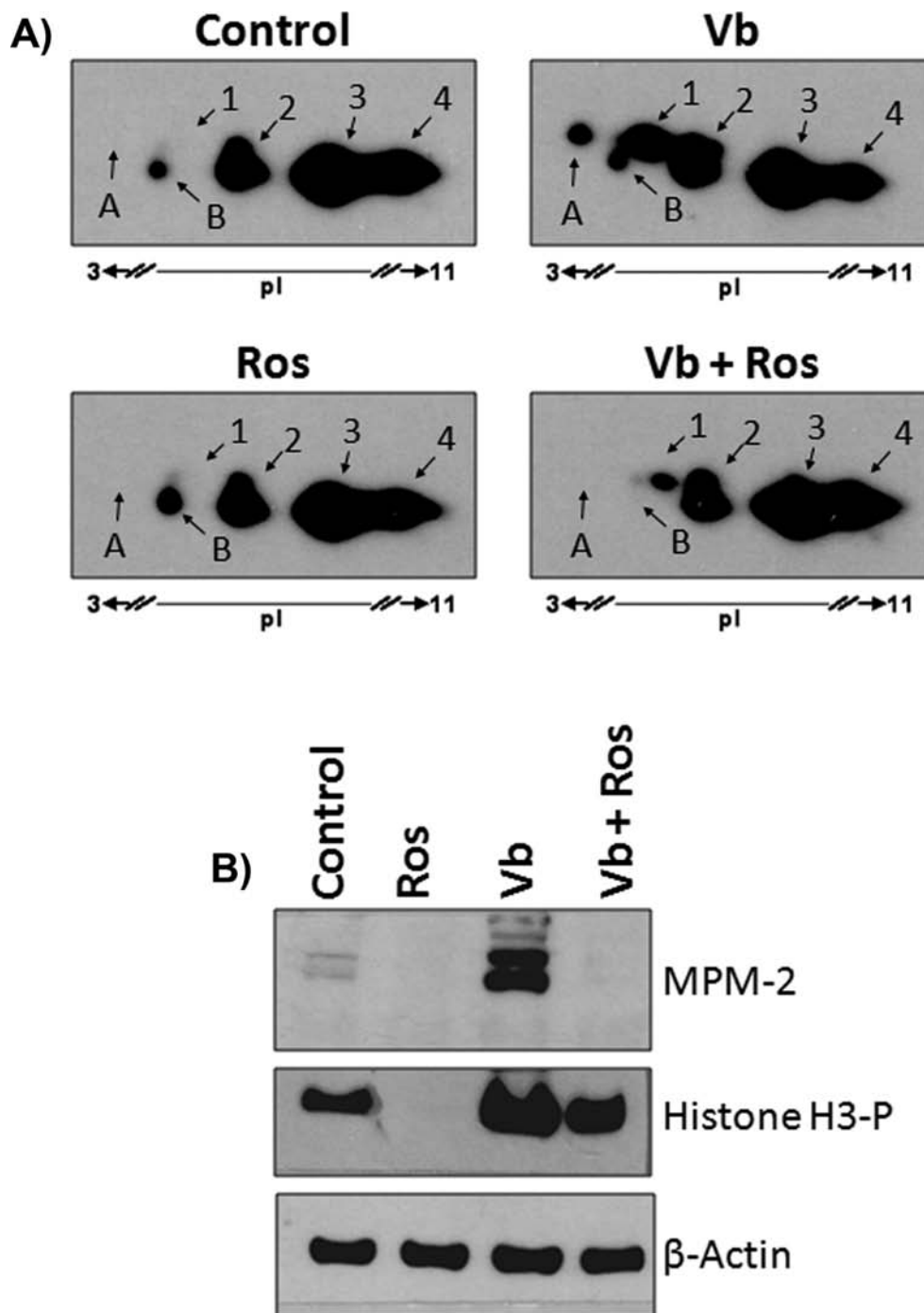


Figure 7. Annexin A2 is dephosphorylated after mitotic exit. (A) A549 cells were treated with vehicle (control), 0.1 μ M vinblastine (Vb), 50 μ M roscovitine (Ros), or the combination of both reagents (Vb + Ros) for 6 h. Vinblastine was added 20 h before roscovitine treatment. Then cell extracts were subjected to 2DE followed by Western blot analysis using antibodies against annexin A2. (B) Cell extracts were subjected to Western blot analysis using antibodies against MPM-2 epitopes (upper panel), phosphorylated histone H3 (middle panel) or β -actin (lower panel).

Interestingly however, vinblastine is not able to induce the phosphorylation of annexin A2 in the presence of aphidicolin (Figure 6). These results clearly demonstrate an association between the accumulation of mitotic cells induced by vinblastine and the phosphorylation of annexin A2.

Annexin A2 Phosphorylation Is Dependent on CDK Activity. After showing that the phosphorylation of annexin A2 only occurs when cells reach the M phase, we analyzed whether annexin A2 was dephosphorylated when cells exit mitosis. For

this purpose, we used roscovitine, an inhibitor of CDK activity that causes premature mitotic exit.⁴⁸ Thus, A549 cells were treated with vehicle, 0.1 μ M vinblastine, 50 μ M roscovitine, or the combination of both reagents for 6 h. Vinblastine was added 20 h before roscovitine. 2DE of cell extracts followed by Western blot analysis using antibodies against annexin A2 showed that vinblastine induces the phosphorylation of annexin A2 as expected. Interestingly however, addition of roscovitine after vinblastine treatment causes annexin A2 dephosphorylation

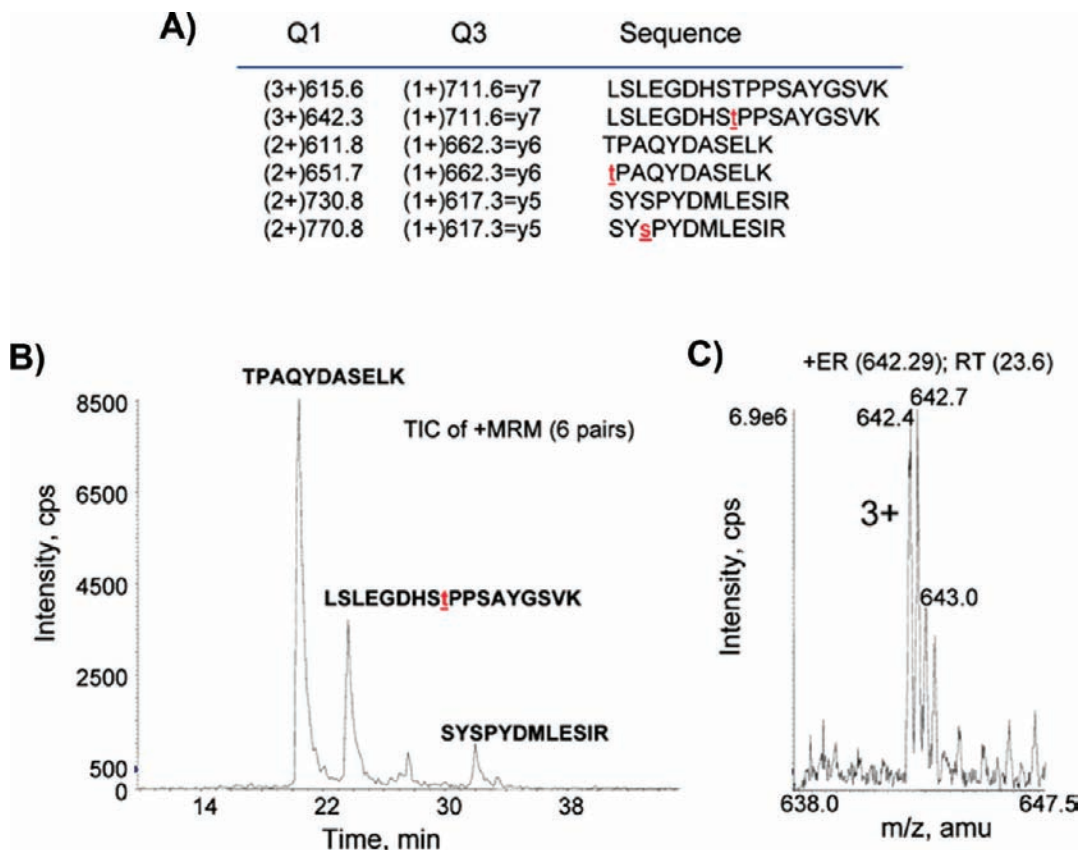


Figure 8. Analysis of the vinblastine-induced phosphorylation of the [T/S]P motifs of annexin A2 by MRM. (A) Experimental design of the MRM analysis. Selected masses set at the quadrupoles Q1 and Q3 for the analysis of phosphorylation at T19, T105, and S236. Masses corresponding to both the nonphosphorylated and the phosphorylated peptides (labeled with an asterisk) were monitored along the chromatogram in Q1, and a characteristic fragment ion was set in Q3 for each peptide. (B) Total ion chromatogram (TIC) of the six pairs selected. Sequences found are labeled at the corresponding retention time. (C) Enhanced resolution (ER) scan of the triply charged peptide at m/z 642.4 spanning the sequence LSLEGDHS*PPSAYGSVK and containing one phosphorylation at T19.

(Figure 7A). Western blot analysis using MPM-2 antibody showed that roscovitine inhibited the CDK activity induced by vinblastine. Moreover, Western blot analysis also showed that the addition of roscovitine to vinblastine-treated cells reduced the levels of phosphorylated histone H3, though not to the control levels (Figure 7B). Thus, it is likely that after 6 h of roscovitine treatment CDK was inhibited although not every cell exited mitosis. These data indicate that annexin A2 is dephosphorylated when cells exit mitosis. Furthermore, it suggests that the phosphorylation of annexin A2 is dependent on CDK activity. This is consistent with previous results showing that level of annexin A2 protein is regulated in a cell-cycle specific manner, and posttranslational modifications of the protein may also contribute to the regulation of its activity or stability.⁴⁹

Phosphothreonine 19 Is Contained in the Major Phosphorylated [T/S]P Motif of Annexin A2 Induced by Vinblastine.

As indicated above, annexin A2 phosphorylation depends on CDK activity. CDK1, the main CDK in mitosis, phosphorylates preferentially serine or threonine included in [S/T]P motifs. Threonine 19, which is the major substrate for antimitotic-induced phosphorylation, is contained in a [S/T]P motif. To determine whether other [S/T]P motifs present in annexin A2 were also phosphorylated, we used a high-sensitivity, targeted MRM analysis with a hybrid triple quadrupole system to analyze the phosphorylated and the nonphosphorylated forms of the peptide containing these motifs. Spot 1 was manually

excised from the gel and processed as described in the Experimental Section. We specifically searched for the phosphorylated and the nonphosphorylated forms of the peptide LSLEGDHS*PPSAYGSVK, which contains T19, the peptide TPAQYDASELK which contains T105, and the peptide SYSPYDMLESIR, which contains S236 (Figure 8). The corresponding paired transitions (parent ion mass/diagnostic ions) were set in Q1 and Q3 quadrupoles, respectively (Figure 8A). Only three chromatographic intense peaks were detected in the MRM analysis, comprising the nonphosphorylated sequences for peptides TPAQYDASELK and SYSPYDMLESIR (Figure 8B) and the T19-phosphorylated sequence LSLEGDHS*PPSAYGSVK, as expected (Figure 8C). These data clearly show that T19 is the major [S/T]P motif of annexin A2 that is phosphorylated after vinblastine treatment.

Annexin A2 Is Not Phosphorylated during Normal Mitosis.

To analyze whether the phosphorylation of annexin A2 observed after the treatment with vinblastine is a consequence of the accumulation of mitotic cells or is a specific effect of the drug, we studied whether annexin A2 is phosphorylated during normal mitosis. Thus, A549 cells were synchronized at S phase using double thymidine block and then released to obtain cell populations at different time points. Western blot analysis of cell extracts using antibodies against phosphorylated histone H3 and MPM-2 epitopes showed that cells enter M phase between 8 and 9 h after release and leave mitosis at about 12 h after release (Figure 9A). Flow cytometry analysis

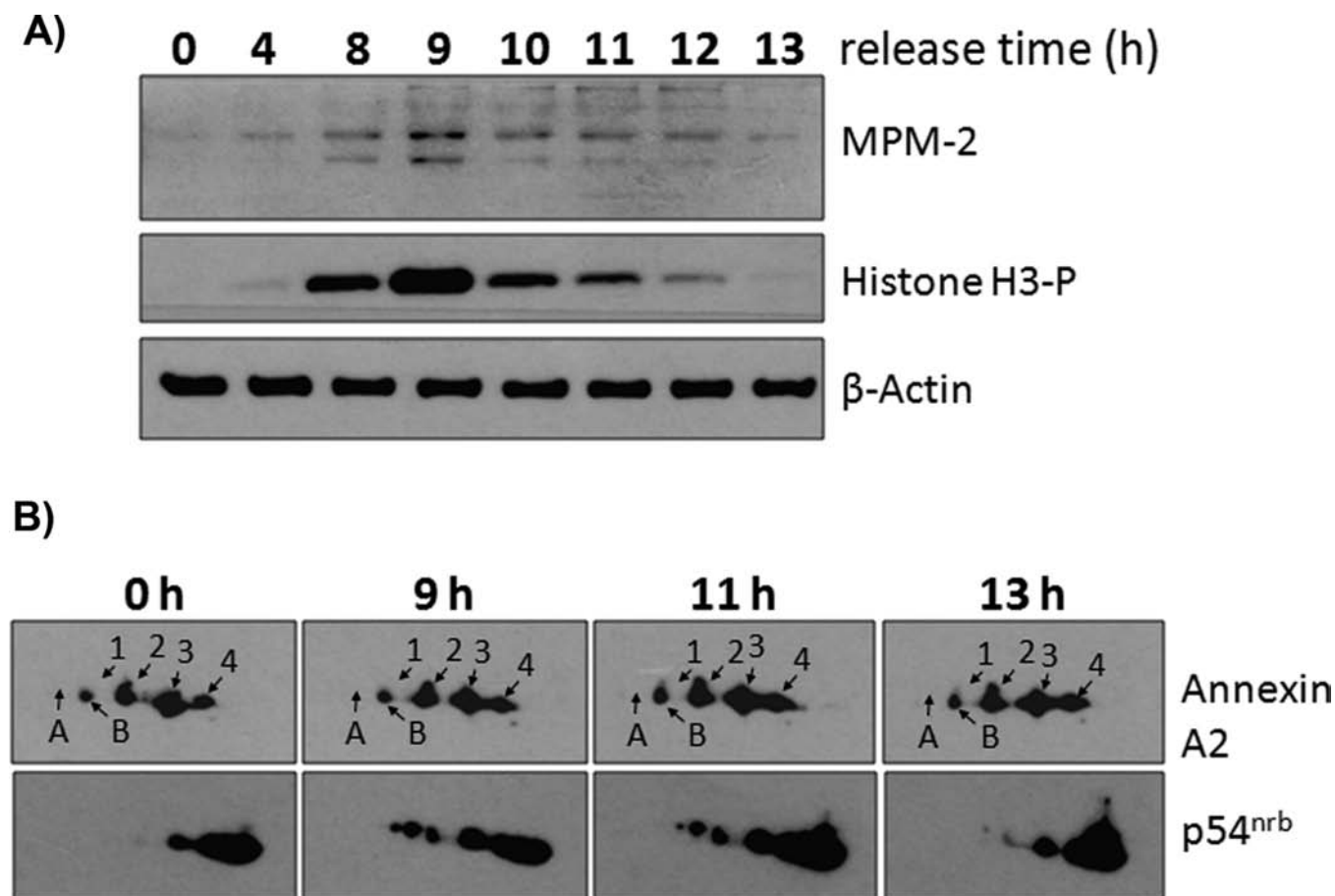


Figure 9. Study of annexin A2 phosphorylation during normal mitosis. A549 cells were synchronized at S phase using double thymidine block as indicated in the Experimental Section. Cells were then released from thymidine block, and aliquots of the culture were harvested at the indicated times for analysis. (A) Cell extracts were analyzed by Western blot analysis using antibodies against MPM-2 epitopes (upper panel), phosphorylated histone H3 (middle panel), or β -actin (lower panel). (B) 2DE followed by Western blot analysis using antibodies against annexin A2 (upper panels) or $p54^{nrp}$ (lower panel).

also confirmed these events (Supporting Information, Figure S4). 2DE of cell extracts followed by Western blot analysis showed that $p54^{nrp}$, a nuclear protein whose phosphorylation has been linked to the M phase,^{50,51} is phosphorylated 9 h after release (mitosis) and dephosphorylated 13 h after release (after mitotic exit) (Figure 9B, lower panel). Opposite to $p54^{nrp}$, annexin A2 is not phosphorylated during mitosis and remains nonphosphorylated after the mitotic exit (Figure 9B, upper panel). These data clearly indicate that annexin A2 is not phosphorylated during a normal mitosis, and therefore the phosphorylation induced by antimetabolic compounds is a specific response of cells to these drugs.

The phosphorylation of annexin A2 might be mediated by a kinase that is not active during normal mitosis. However, while a normal mitosis takes about 1 h, the drug-treated cells are maintained in mitosis for more than 8 h. It is possible that this phosphorylation occurs due to the aberrant activation of a kinase that is also activated during a normal mitosis, CDK1 being a likely candidate. This possibility is consistent with the fact that the phosphorylation found in annexin A2 occurs at T19, which is contained in a [S/T]P motif, which are preferentially phosphorylated by CDK1.

As previously mentioned, MIA and KSP inhibitors make the cells unable to satisfy the mitotic checkpoint, which dramatically extends the duration of mitosis. There are data indicating that the extension of the mitotic process is detected by the cells

and considered as a stress situation that finally triggers cell death in normal cells. Annexin A2 appears to have an antiapoptotic function, since its downregulation resulted in decreased proliferation, invasive potential, cell cycle inhibition, and increased apoptosis.^{20,21,28,29} Also, annexin A2 binds to and mediates the role of TM601 as an antiangiogenic therapeutic agent,⁵² which is consistent with previous studies that suggests a role for annexin A2 as a therapeutic target in angiogenesis and tumor progression.⁵³ The work described here indicates that annexin A2 is not phosphorylated during a normal mitosis, and therefore the phosphorylation induced by MIAs and KSP inhibitors is a specific response of cells to these drugs. These results indicate that the phosphorylation of annexin A2 at threonine 19 could be used as a mitotic stress marker.

Conclusions

In this paper, we have used proteomic approaches to determine that microtubule interfering agents and KSP inhibitors induce the phosphorylation of annexin A2 at least on threonine 19. This phosphorylation of annexin A2 at threonine 19 has only been observed previously in large proteome analysis, and there are no data about the regulation or the function of this modification.^{44,45} We show that in cells unable to reach the M phase of the cell cycle due to the treatment with aphidicolin, MIAs are unable to induce the phosphorylation

lation of annexin A2. Annexin A2 is dephosphorylated when cells exit mitosis after treatment with vinblastine followed by roscovitine (as demonstrated when both mitotic markers MPM-2 and phosphorylated histone H3 disappear), indicating that this phosphorylation of annexin A2 is dependent on CDK activity.

Our data clearly indicate that the phosphorylation of annexin A2 occurs only during the mitosis arrest induced by antimitotic drugs. Furthermore, using double thymidine block synchronization, we have demonstrated that this phosphorylation does not occur during a normal mitosis. Altogether, these data indicate that the phosphorylation of annexin A2 is a response of cells to drug treatment and is not a consequence of the accumulation of cells at M phase. Annexin A2 is phosphorylated only during mitosis in which mitotic stress is present, but not during normal mitosis, suggesting that this phosphorylation could be involved in the cell response to these drugs, and therefore phosphorylation of annexin A2 at threonine 19 could be used as a mitotic stress marker.

Abbreviations: 2DE, two-dimensional gel electrophoresis; CHCA, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; CID, collision-induced dissociation; EPIS, enhanced product ion scan; ERs, enhanced resolution scan; ETD, electron transfer dissociation; KSP, kinesin spindle protein; MIA, microtubule interfering agent; MRM, multiple reaction monitoring; λ -PPase, λ -protein phosphatase; STLC, S-tritil-L-cysteine; TIC, total ion chromatogram; VA, vinca alkaloid.

Acknowledgment. We thank Ana Salas for help with flow cytometry analysis. This work was supported by grants from Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2006-09686 and SAF 2009-07227) and Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnológica (FICYT; PC07-02 and IB09-066). B.F.G. and P.C. are recipients of postdoctoral contracts from IUOPA. M.A.P., L.J.U.G., L.C.H. and N.A. are recipients of fellowships from FICYT. The Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA) is supported by Obra Social Cajastur-Asturias. The CNIC is supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación and the Fundación Pro CNIC.

Supporting Information Available: Annexin A2 sequence coverage of the combined digestion analysis by LTQ-Orbitrap, additional phosphorylation sites in the peptide LSLEGDHSTPPSAYGSVK, phosphorylation state of histone H3 and MPM2 under different treatments, and cell cycle evolution in S-phase synchronized cells after the release. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules and actin filaments: Dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10* (1), 123–130.
- Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (4), 253–265.
- Blagosklonny, M. V. Mitotic arrest and cell fate: Why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Cell Cycle* **2007**, *6* (1), 70–74.
- Fojo, T. Can mutations in gamma-actin modulate the toxicity of microtubule targeting agents? *J. Natl. Cancer Inst.* **2006**, *98* (19), 1345–1347.
- Duflos, A.; Kruczynski, A.; Barret, J. M. Novel aspects of natural and modified vinca alkaloids. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2002**, *2* (1), 55–70.
- Gigant, B.; Wang, C.; Ravelli, R. B.; Roussi, F.; Steinmetz, M. O.; Curmi, P. A.; Sobel, A.; Knossow, M. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* **2005**, *435* (7041), 519–522.
- Blangy, A.; Arnaud, L.; Nigg, E. A. Phosphorylation by p34cdc2 protein kinase regulates binding of the kinesin-related motor HsEg5 to the dynactin subunit p150. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (31), 19418–19424.
- Jackson, J. R.; Patrick, D. R.; Dar, M. M.; Huang, P. S. Targeted anti-mitotic therapies: Can we improve on tubulin agents? *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7* (2), 107–117.
- Gerke, V.; Creutz, C. E.; Moss, S. E. Annexins: Linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6* (6), 449–461.
- Rescher, U.; Gerke, V. Annexins—unique membrane binding proteins with diverse functions. *J. Cell Sci.* **2004**, *117* (Pt 13), 2631–2639.
- Waisman, D. M. Annexin II tetramer: Structure and function. *Mol. Cell. Biochem.* **1995**, *149–150*, 301–322.
- Gerke, V.; Moss, S. E. Annexins: From structure to function. *Physiol. Rev.* **2002**, *82* (2), 331–371.
- Jost, M.; Zeuschner, D.; Seemann, J.; Weber, K.; Gerke, V. Identification and characterization of a novel type of annexin-membrane interaction: Ca²⁺ is not required for the association of annexin II with early endosomes. *J. Cell Sci.* **1997**, *110* (Pt 2), 221–228.
- Lorusso, A.; Covino, C.; Priori, G.; Bachi, A.; Meldolesi, J.; Chiaregatti, E. Annexin2 coating the surface of enlargosomes is needed for their regulated exocytosis. *EMBO J.* **2006**, *25* (23), 5443–5456.
- Mai, J.; Waisman, D. M.; Sloane, B. F. Cell surface complex of cathepsin B/annexin II tetramer in malignant progression. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1477* (1–2), 215–230.
- Hajjar, K. A.; Acharya, S. S. Annexin II and regulation of cell surface fibrinolysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2000**, *902*, 265–271.
- Burger, A.; Berendes, R.; Liemann, S.; Benz, J.; Hofmann, A.; Gottig, P.; Huber, R.; Gerke, V.; Thiel, C.; Romisch, J.; Weber, K. The crystal structure and ion channel activity of human annexin II, a peripheral membrane protein. *J. Mol. Biol.* **1996**, *257* (4), 839–847.
- Hayes, M. J.; Shao, D.; Bailly, M.; Moss, S. E. Regulation of actin dynamics by annexin 2. *EMBO J.* **2006**, *25* (9), 1816–1826.
- Vishwanatha, J. K.; Jindal, H. K.; Davis, R. G. The role of primer recognition proteins in DNA replication: Association with nuclear matrix in HeLa cells. *J. Cell Sci.* **1992**, *101* (Pt 1), 25–34.
- Chiang, Y.; Rizzino, A.; Sibenaller, Z. A.; Wold, M. S.; Vishwanatha, J. K. Specific down-regulation of annexin II expression in human cells interferes with cell proliferation. *Mol. Cell. Biochem.* **1999**, *199* (1–2), 139–147.
- Bao, H.; Jiang, M.; Zhu, M.; Sheng, F.; Ruan, J.; Ruan, C. Overexpression of Annexin II affects the proliferation, apoptosis, invasion and production of proangiogenic factors in multiple myeloma. *Int. J. Hematol.* **2009**, *90* (2), 177–185.
- Braden, A. R.; Kafka, M. T.; Cunningham, L.; Jones, H.; Vishwanatha, J. K. Polymeric nanoparticles for sustained down-regulation of annexin A2 inhibit prostate tumor growth. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2009**, *9* (5), 2856–2865.
- Gilmore, W. S.; Olwill, S.; McGlynn, H.; Alexander, H. D. Annexin A2 expression during cellular differentiation in myeloid cell lines. *Biochem. Soc. Trans.* **2004**, *32* (Pt 6), 1122–1123.
- An, J. H.; Lee, S. Y.; Jeon, J. Y.; Cho, K. G.; Kim, S. U.; Lee, M. A. Identification of gliotropic factors that induce human stem cell migration to malignant tumor. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (6), 2873–2881.
- Zhang, F.; Zhang, L.; Zhang, B.; Wei, X.; Yang, Y.; Qi, R. Z.; Ying, G.; Zhang, N.; Niu, R. Anxa2 plays a critical role in enhanced invasiveness of the Multi-Drug Resistant human breast cancer cells. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5041–5047.
- Shiozawa, Y.; Havens, A. M.; Jung, Y.; Ziegler, A. M.; Pedersen, E. A.; Wang, J.; Lu, G.; Roodman, G. D.; Loberg, R. D.; Pienta, K. J.; Taichman, R. S. Annexin II/annexin II receptor axis regulates adhesion, migration, homing, and growth of prostate cancer. *J. Cell. Biochem.* **2008**, *105* (2), 370–380.
- Zhong, L. P.; Wei, K. J.; Yang, X.; Zhang, L.; Zhou, X. J.; Pan, H. Y.; Li, J.; Chen, W. T.; Zhang, Z. Y. Increased expression of Annexin A2 in oral squamous cell carcinoma. *Arch. Oral Biol.* **2009**, *54* (1), 17–25.
- Wang, C. Y.; Lin, Y. S.; Su, W. C.; Chen, C. L.; Lin, C. F. Glycogen synthase kinase-3 and Omi/HtrA2 induce annexin A2 cleavage followed by cell cycle inhibition and apoptosis. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 4153–4161.
- Huang, Y.; Jin, Y.; Yan, C. H.; Yu, Y.; Bai, J.; Chen, F.; Zhao, Y. Z.; Fu, S. B. Involvement of Annexin A2 in p53 induced apoptosis in lung cancer. *Mol. Cell. Biochem.* **2008**, *309* (1–2), 117–123.
- Chuthapisith, S.; Bean, B. E.; Cowley, G.; Eremin, J. M.; Samphao, S.; Layfield, R.; Kerr, I. D.; Wiseman, J.; El-Sheemy, M.; Sreenivasan, T.; Eremin, O. Annexins in human breast cancer: Possible predic-

- tors of pathological response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur. J. Cancer* **2009**, *45* (7), 1274–1281.
- (31) Verrills, N. M.; Walsh, B. J.; Cobon, G. S.; Hains, P. G.; Kavallaris, M. Proteome analysis of vinca alkaloid response and resistance in acute lymphoblastic leukemia reveals novel cytoskeletal alterations. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (46), 45082–45093.
- (32) Prado, M. A.; Casado, P.; Zuazua-Villar, P.; del Valle, E.; Artime, N.; Cabal-Hierro, L.; Martinez-Campa, C. M.; Lazo, P. S.; Ramos, S. Phosphorylation of human eukaryotic elongation factor 1Bgamma is regulated by paclitaxel. *Proteomics* **2007**, *7* (18), 3299–3304.
- (33) Motiwala, T.; Kutay, H.; Ghoshal, K.; Bai, S.; Seimiya, H.; Tsuruo, T.; Suster, S.; Morrison, C.; Jacob, S. T. Protein tyrosine phosphatase receptor-type O (PTPRO) exhibits characteristics of a candidate tumor suppressor in human lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101* (38), 13844–13849.
- (34) Casado, P.; Zuazua-Villar, P.; del Valle, E.; Martinez-Campa, C.; Lazo, P. S.; Ramos, S. Vincristine regulates the phosphorylation of the antiapoptotic protein HSP27 in breast cancer cells. *Cancer Lett.* **2007**, *247* (2), 273–282.
- (35) Tuloup, M.; Hernandez, C.; Coro, I.; Hoogland, C.; Binz, P. A.; Appel, R. D. Understanding biological systems through proteomics. *Swiss Proteomics Soc. 2003 Congr.* **2003**, 174–176.
- (36) Crosio, C.; Fimia, G. M.; Loury, R.; Kimura, M.; Okano, Y.; Zhou, H.; Sen, S.; Allis, C. D.; Sassone-Corsi, P. Mitotic phosphorylation of histone H3: Spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22* (3), 874–885.
- (37) Hendzel, M. J.; Wei, Y.; Mancini, M. A.; Van Hooser, A.; Ranalli, T.; Brinkley, B. R.; Bazett-Jones, D. P.; Allis, C. D. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* **1997**, *106* (6), 348–360.
- (38) Andreassen, P. R.; Margolis, R. L. Microtubule dependency of p34cdc2 inactivation and mitotic exit in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **1994**, *127* (3), 789–802.
- (39) de Graauw, M.; Tjeldens, I.; Smeets, M. B.; Hensbergen, P. J.; Deelder, A. M.; van de Water, B. Annexin A2 phosphorylation mediates cell scattering and branching morphogenesis via cofilin Activation. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28* (3), 1029–1040.
- (40) Deora, A. B.; Kreitzer, G.; Jacovina, A. T.; Hajjar, K. A. An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (42), 43411–43418.
- (41) Luo, W.; Yan, G.; Li, L.; Wang, Z.; Liu, H.; Zhou, S.; Liu, S.; Tang, M.; Yi, W.; Dong, Z.; Cao, Y. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 mediates serine 25 phosphorylation and nuclear entry of annexin A2 via PI-PLC-PKCa/PKCbeta pathway. *Mol. Carcinog.* **2008**, *47* (12), 934–946.
- (42) Liu, J.; Rothermund, C. A.; Ayala-Sanmartin, J.; Vishwanatha, J. K. Nuclear annexin II negatively regulates growth of LNCaP cells and substitution of ser 11 and 25 to glu prevents nucleo-cytoplasmic shuttling of annexin II. *BMC Biochem.* **2003**, *4*, 10.
- (43) Nousiainen, M.; Sillje, H. H.; Sauer, G.; Nigg, E. A.; Korner, R. Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103* (14), 5391–5396.
- (44) Olsen, J. V.; Blagoev, B.; Gnäd, F.; Macek, B.; Kumar, C.; Mortensen, P.; Mann, M. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **2006**, *127* (3), 635–648.
- (45) Yu, L. R.; Zhu, Z.; Chan, K. C.; Issaq, H. J.; Dimitrov, D. S.; Veenstra, T. D. Improved titanium dioxide enrichment of phosphopeptides from HeLa cells and high confident phosphopeptide identification by cross-validation of MS/MS and MS/MS/MS spectra. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (11), 4150–4162.
- (46) Tanaka, T.; Akatsuka, S.; Ozeki, M.; Shirase, T.; Hiai, H.; Toyokuni, S. Redox regulation of annexin 2 and its implications for oxidative stress-induced renal carcinogenesis and metastasis. *Oncogene* **2004**, *23* (22), 3980–3989.
- (47) Tong, X. B.; Kita, K.; Karata, K.; Zhu, C. L.; Sugaya, S.; Ichimura, Y.; Satoh, M.; Tomonaga, T.; Nomura, F.; Jin, Y. H.; Suzuki, N. Annexin II, a novel HSP27-interacted protein, is involved in resistance to UVC-induced cell death in human Apr-1 cells. *Photochem. Photobiol.* **2008**, *84* (6), 1455–1461.
- (48) Skoufias, D. A.; Indorato, R. L.; Lacroix, F.; Panopoulos, A.; Margolis, R. L. Mitosis persists in the absence of Cdk1 activity when proteolysis or protein phosphatase activity is suppressed. *J. Cell Biol.* **2007**, *179* (4), 671–685.
- (49) Chiang, Y.; Schneiderman, M. H.; Vishwanatha, J. K. Annexin II expression is regulated during mammalian cell cycle. *Cancer Res.* **1993**, *53* (24), 6017–6021.
- (50) Casado, P.; Prado, M. A.; Zuazua-Villar, P.; Del Valle, E.; Artime, N.; Cabal-Hierro, L.; Ruperez, P.; Burlingame, A. L.; Lazo, P. S.; Ramos, S. Microtubule interfering agents and KSP inhibitors induce the phosphorylation of the nuclear protein p54(nrb), an event linked to G2/M arrest. *J. Proteomics* **2009**, *71* (6), 592–600.
- (51) Proteau, A.; Blier, S.; Albert, A. L.; Lavoie, S. B.; Traish, A. M.; Vincent, M. The multifunctional nuclear protein p54nrb is multiphosphorylated in mitosis and interacts with the mitotic regulator Pin1. *J. Mol. Biol.* **2005**, *346* (4), 1163–1172.
- (52) Kesavan, K.; Ratliff, J.; Johnson, E. W.; Dahlberg, W.; Asara, J. M.; Misra, P.; Frangioni, J. V.; Jacoby, D. B. Annexin A2 is a molecular target for TM601, a peptide with tumor-targeting and anti-angiogenic effects. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 4366–4374.
- (53) Sharma, M. C.; Sharma, M. The role of annexin II in angiogenesis and tumor progression: A potential therapeutic target. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13* (35), 3568–3575.

PR100377V

A TRAF2 binding independent region of TNFR2 is responsible for TRAF2 depletion and enhancement of cytotoxicity driven by TNFR1

Lucía Cabal-Hierro^{1,3}, Noelia Artime¹, Julián Iglesias¹, Miguel A. Prado^{1,4}, Lorea Ugarte-Gil¹, Pedro Casado^{1,5}, Belén Fernández-García¹, Bryant G. Darnay² and Pedro S. Lazo¹.

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular and Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain.

² University of Texas. MD Anderson Cancer Center. Houston, Texas, USA.

³ Present address: Abramson Cancer Center. Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania Philadelphia, PA. USA.

⁴ Present address: Department of Cell Biology. Harvard Medical School. Boston, MA. USA.

⁵ Present address: Institute of Cancer, Barts Cancer Institute. Queen Mary University of London. London, UK

Correspondence to: Pedro S. Lazo, [email:pplazo@uniovi.es](mailto:pplazo@uniovi.es)

Keywords: TNF receptors; Death Receptors; TRAF2; Apoptosis; NF-kappaB

Received: October 11, 2013

Accepted: November 27, 2013

Published: November 29, 2013

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT:

Tumor Necrosis Factor (TNF) interacts with two receptors known as TNFR1 and TNFR2. TNFR1 activation may result in either cell proliferation or cell death. TNFR2 activates Nuclear Factor-kappaB (NF-kB) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) which lead to transcriptional activation of genes related to cell proliferation and survival. This depends on the binding of TNF Receptor Associated Factor 2 (TRAF2) to the receptor. TNFR2 also induces TRAF2 degradation. In this work we have investigated the structural features of TNFR2 responsible for inducing TRAF2 degradation and have studied the biological consequences of this activity. We show that when TNFR1 and TNFR2 are co-expressed, TRAF2 depletion leads to an enhanced TNFR1 cytotoxicity which correlates with the inhibition of NF-kB. NF-kB activation and TRAF2 degradation depend of different regions of the receptor since TNFR2 mutants at amino acids 343-349 fail to induce TRAF2 degradation and have lost their ability to enhance TNFR1-mediated cell death but are still able to activate NF-kB. Moreover, whereas NF-kB activation requires TRAF2 binding to the receptor, TRAF2 degradation appears independent of TRAF2 binding. Thus, TNFR2 mutants unable to bind TRAF2 are still able to induce its degradation and to enhance TNFR1-mediated cytotoxicity. To test further this receptor crosstalk we have developed a system stably expressing in cells carrying only endogenous TNFR1 the chimeric receptor RANK-TNFR2, formed by the extracellular region of RANK (Receptor activator of NF-kB) and the intracellular region of TNFR2. This has made possible to study independently the signals triggered by TNFR1 and TNFR2. In these cells TNFR1 is selectively activated by soluble TNF (sTNF) while RANK-TNFR2 is selectively activated by RANKL. Treatment of these cells with sTNF and RANKL leads to an enhanced cytotoxicity.

INTRODUCTION.

TNF interacts with two receptors known as TNFR1 and TNFR2. Soluble TNF (sTNF) only activates TNFR1,

while membrane-bound TNF (mTNF) activates both receptors [1, 2]. Both TNFRs are highly similar in their extracellular regions which contain four cysteine-rich domains (CRD)[3]. However, TNFR1 and TNFR2 are

quite different in their intracellular regions. TNFR1 contains a Death Domain (DD) responsible for triggering apoptosis whereas TNFR2 signals depend on the binding of several TRAF proteins and does not trigger apoptosis.

TNFR1 is a ubiquitous receptor the activity of which can result in either cell proliferation or cell death depending on the cell line and the microenvironmental conditions. Upon binding of TNF to TNFR1, different signalling complexes may be formed [4]. Complex I is a transmembrane complex leading to proliferative signals mainly mediated by NF- κ B. The activation of TNFR1 also implies the internalization of the receptor and the formation of Complex II or DISC (Death Inducing Signalling Complex), implicated in the induction of apoptosis [5]. When caspases are inhibited however, Complex II is unable to trigger apoptosis, leading to the formation of a third complex named Necroptosome [6, 7] that is involved in the induction of necroptosis [8, 9].

TNFR2 is not so well characterized. The facts that TNFR2 expression is restricted to certain cell types [10] and that this receptor is activated only by mTNF [1] have contributed to this lack of information. After ligand binding, TNFR2 binds TRAF2 directly. Some other adaptor proteins such as TRAF1, TRAF3, Cellular Inhibitor of Apoptosis 1 (cIAP1) and cIAP2 bind to the receptor through TRAF2 [11, 12]. Thus, TRAF2 is a key mediator in receptor signalling [13]. TRAF2 binds to TNFR2 through two different sites in its intracellular region. The first site is comprised of amino acids 402-SKEE-405 and fits into the known TRAF binding site of the TNFR superfamily of receptors [12]. A second TRAF2 binding site has been recently identified by us [14] and is comprised of the last 15 amino acids at the C-terminal region of the receptor, being residues 425-KPL-427 directly responsible for this interaction. TNFR2 activation implies the induction of genes implicated in cell proliferation through NF- κ B and N-terminal Jun Kinase (JNK) [15-17]. More recently it has been shown that TNFR2 and other receptors belonging to the TNFR superfamily induce TRAF2 degradation [18, 19]. We have shown that amino acids 343-349 are responsible for this action [14] although little is known about the molecular mechanisms implicated. TNFR2-induced TRAF2 depletion may lead to cell death because survival and proliferative signals triggered by both TNFR1 and TNFR2 depend on TRAF2. In this work we show that TRAF2 depletion leads to an enhanced cytotoxicity mediated by TNFR1 which correlates with the inhibition of NF- κ B when both receptors are coexpressed and that TNFR2 mutants unable to induce TRAF2 degradation fail to enhance cytotoxicity. We also show that TRAF2 degradation does not rely on its interaction with the receptor. In an attempt to study independently the signals triggered by TNFR1 and TNFR2 as well as their crosstalk we have developed a system stably expressing the

chimeric receptor RANK-TNFR2 in cells carrying only endogenous TNFR1. RANK-TNFR2 triggers the same signals than TNFR2 but it is activated by RANKL. Thus, in these cells TNFR2 is selectively activated by RANKL while TNFR1 is selectively activated by sTNF. We show that, indeed, coactivation of TNFR1 and RANK-TNFR2 leads to an enhanced cytotoxicity provided that TNFR2 activation leads to TRAF2 depletion, rather than NF- κ B activation.

RESULTS

TNFR2 affects the signals triggered by TNFR1.

TNFR1 and TNFR2 differ in their intracellular regions (Fig 1A). TNFR1 contains a Death Domain whereas TNFR2 contains no Death Domain. Instead, TNFR2 contains two TRAF2 binding sites [4]. Although TNFR1 contains no TRAF2 binding sites, TRAF2 appears responsible for triggering signals initiated by both receptors. Both TNFR1 and TNFR2 activate NF- κ B [15, 20] Oligomerization of the receptors after ligand binding or by overexpression is the initial step in their function. We have studied TNFRs signalling by overexpressing them in the absence of the ligand.

Transient transfection of HEK293 cells with increasing amounts of either TNFR shows that the activation of NF- κ B behaves differently depending on the receptor. Thus, when TNFR1 is expressed the activity of NF- κ B increases as the amount of receptor increases (Fig 1B, left panel). On the other hand, when TNFR2 is expressed the activation of NF- κ B shows a biphasic behaviour: at low receptor concentrations NF- κ B activation increases with the amount of receptor but at high receptor concentrations NF- κ B is inhibited (Fig 1B, middle panel). We have investigated the consequences of coactivation by overexpressing both receptors. As shown in Fig 1B (right panel) NF- κ B is activated when both receptors are coexpressed. However, high TNFR2 concentrations lead to the inhibition of NF- κ B, resembling what happens when TNFR2 alone is overexpressed. Interestingly enough, coexpression of TNFR1 and TNFR2 also lead to an enhanced cytotoxicity (Fig 1C). As expected, expression of TNFR1 caused apoptosis in HEK293 cells despite the fact that NF- κ B was activated while expression of TNFR2 had no effect on cell viability. When TNFR1 and TNFR2 were coexpressed, the apoptotic effect of TNFR1 was enhanced (Fig 1C). Thus, TNFR2 activation has a dual consequence on TNFR1 signalling: a) it negatively affects the activation of NF- κ B and b) an enhanced cytotoxicity can be observed. These results point to a critical TNFR1-TNFR2 crosstalk in which TRAF2 appears as the critical mediator [21]. When analyzing the

intracellular levels of TRAF2 in cells expressing TNFR2 we observed that high receptor expression induces the depletion of the adaptor protein (Fig 1D, upper panel) which may explain why NF- κ B is so poorly activated at these receptor concentrations (Fig 1B). As for TNFR1, this receptor is unable to induce TRAF2 degradation (Fig 1D, middle panel). Moreover, when both receptors are co-expressed together with TRAF2, TNFR2 also induces TRAF2 degradation, indicating that at high concentrations

of both TNFR1 and TNFR2 the biological effects shown occur at low levels of TRAF2 (Fig 1D, lower panel).

TRAF2 binding and TRAF2 degradation depend on different TNFR2 regions.

To study the role of TRAF2 depletion on NF- κ B activation we generated several TNFR2 mutants in which

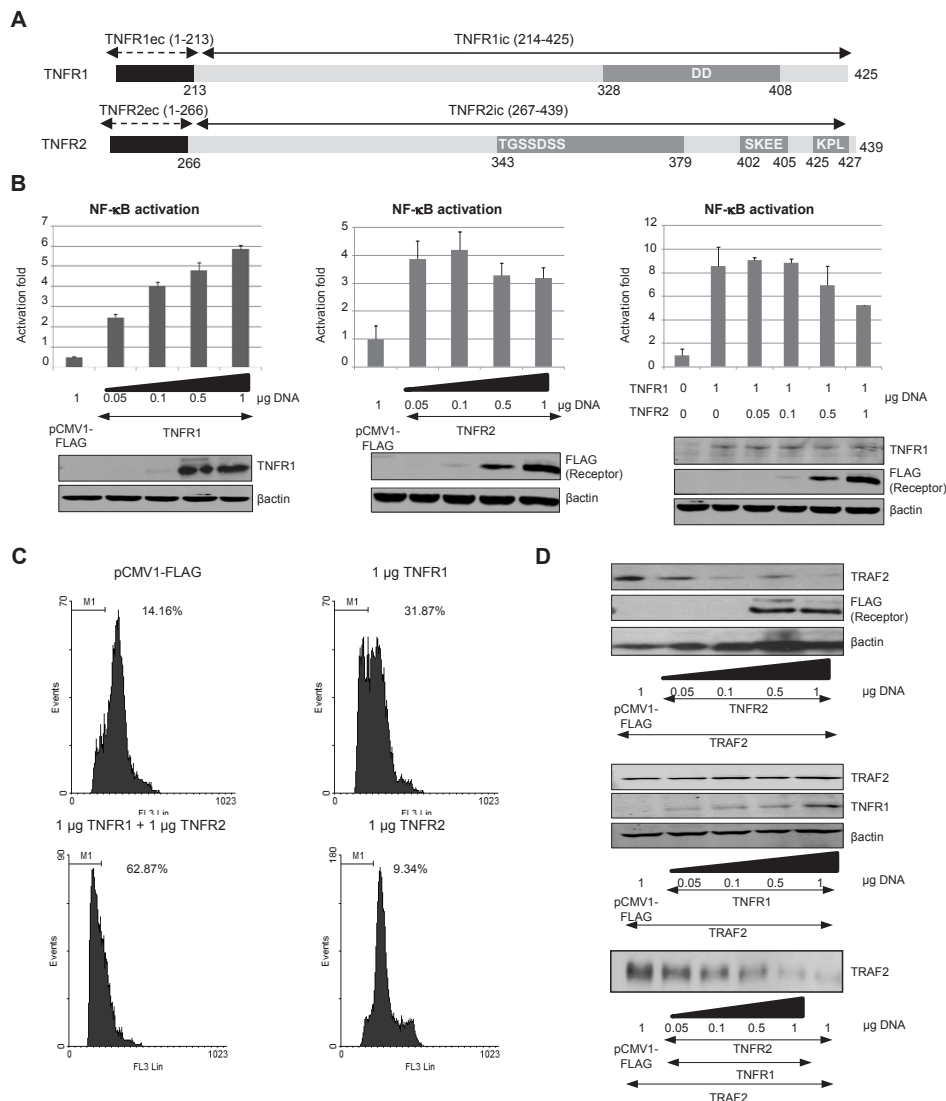


Figure 1: TNFR2 expression affects TNFR1 signalling. A) Schematic representation of TNFR1 and TNFR2. Extracellular and transmembrane regions of each receptor are represented in black while the intracellular region is shown in light grey. In both receptors the main regions involved in their biological functions are also indicated: the DD in TNFR1 (amino acids 328-408), whereas in TNFR2 both the regions involved in TRAF2 depletion (amino acids 343-379) and TRAF2 binding sites (amino acids 402-405 and 425-427) are shown. B) NF- κ B activation by TNF receptors. HEK 293 cells were transiently transfected with the indicated amounts of each expression vector encoding TNFR1 or TNFR2, as indicated, together with 0.5 μ g of pNF- κ B-luc and 0.5 μ g of pRL-TK. Forty-eight hours later luciferase was determined in cell extracts as indicated in Materials and Methods. Expression of each receptor was also analyzed by western blot (anti-TNFR1 and anti-FLAG). C) Quantification of the sub G0/G1 population induced by TNF receptors. HEK293 cells were transfected with the indicated amounts of receptor-coding plasmids together with 0.2 μ g of pGEGF-F. Forty-eight hours later, cells were harvested, stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry to quantify the sub G0/G1 population. The percentage of hypodiploid cells is indicated in each case. D) Analysis of the intracellular levels of TRAF2. HEK293 cells were transfected with the amount of the plasmids encoding the receptors indicated together with 0.5 μ g of pTRAF2. Forty-eight hours later the intracellular levels of TRAF2 were determined by western blot.

amino acids responsible for TRAF2 binding were mutated. We also generated several mutant receptors in which some of the amino acids comprising the TRAF2 degradation site were mutated (Fig 2A) [14]. After transfection of HEK293 cells with these mutant receptors the activation of NF-κB

was determined. Mutation of amino acids 402-SKEE-405 to 402-SKAA-405 and amino acids 425-KPL-427 to 425-AAA-427 (receptor TNFR2-BKO) obliterated the ability of TNFR2 to induce NF-κB activation (Fig 2B) but it was still able to induce TRAF2 depletion. These amino acids

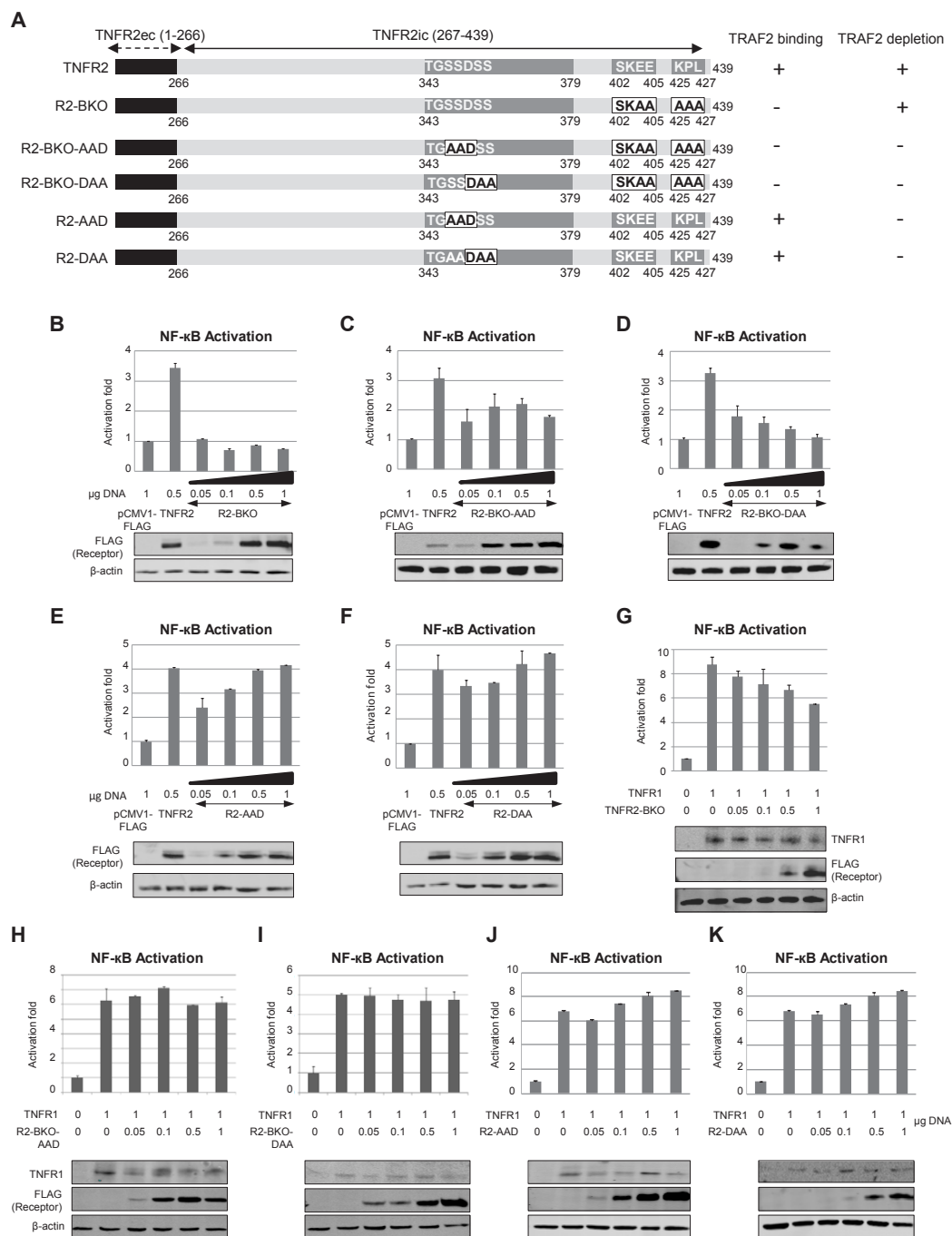


Figure 2: Effect of TNFR2-induced TRAF2 depletion on NF-κB activation by TNFR1. A) Schematic representation of TNFR2 and its mutants. Representation of the receptor is as in Figure 1A. Numbers indicate the amino acid position in the full-length human receptor. Letters in black indicate the mutated amino acids. Their activity for TRAF2 binding or TRAF2 degradation is indicated on the right. B-F) NF-κB activation caused by TNFR2 or its mutants. HEK293 cells were transiently transfected with the indicated amounts of each expression vector encoding TNFR2 or its mutants, together with 0.5 μg of pNFκB-luc and 0.5 μg of pRL-TK. Forty-eight hours later both luciferase activities were determined as described in Materials and Methods. Expression of the receptors was also determined by western blot. G-K) NF-κB activation caused by coexpression of TNFR1 and TNFR2 or its mutants. NF-κB activity was determined as above. Expression of TNFR1 and TNFR2 or its mutants was determined by western blot.

comprise the two TRAF2 binding sites[12, 14]. Receptors in which aminoacids 343-349 were mutated were unable to induce TRAF2 degradation regardless of whether they were able to bind TRAF2. Thus, receptors unable to bind and to induce TRAF2 degradation (receptors TNFR2-BKO-AAD and TNFR2-BKO-DAA) showed a much lower capacity to activate NF- κ B (Figs 2C and 2D) indicating that the interaction between the receptor and TRAF2 is essential for the activation of NF- κ B. Moreover, when expressing TNFR2 mutant receptors able to bind TRAF2 but unable to induce its degradation (receptors TNFR2-AAD and TNFR2-DAA) the activation of NF κ B increased as the amount of receptor was higher (Figs 2E and 2F). These receptors clearly differ from the wild type TNFR2 in which the activation of NF- κ B shows a biphasic behaviour (Fig 1B), thus pointing to TRAF2 depletion as a regulatory action in TNFR2 signalling.

We next addressed the question of whether TNFR2-induced TRAF2 depletion affects the activation of NF- κ B by TNFR1. For this purpose TNFR1 was coexpressed with increasing amounts of mutant receptors derived from TNFR2 and the activation of NF- κ B was studied. The coexpression of TNFR1 and TNFR2-BKO (a receptor

unable to bind TRAF2) resulted in a decrease of NF- κ B activity as the amount of mutant receptor was increased (Fig 2G), similar to what happened when TNFR1 and wild type TNFR2 were coexpressed. However, when TNFR1 was coexpressed with a TNFR2 mutant unable to bind and to induce TRAF2 degradation, NF- κ B activation was not affected by the mutant receptors (Figs 2H and 2I). Moreover, when TNFR1 was coexpressed with TNFR2 mutants in which the TRAF2 degradation site was mutated, NF- κ B activity increased as the amounts of mutant receptors were increased (Figs 2J and 2K). These receptors (TNFR2-AAD and TNFR2-DAA) were able to bind TRAF2 and therefore to activate NF- κ B. Taken together, these results show that TNFR2-induced TRAF2 depletion has a negative regulatory role on TNFR1 signalling and that the primary action of this regulatory role is the inhibition of NF- κ B.

TRAF2 depletion by TNFR2 is responsible for the enhancement of cytotoxicity driven by TNFR1.

As shown above, TNFR2 activation increases the cytotoxic effect of TNFR1 (Fig 1C). We have also shown

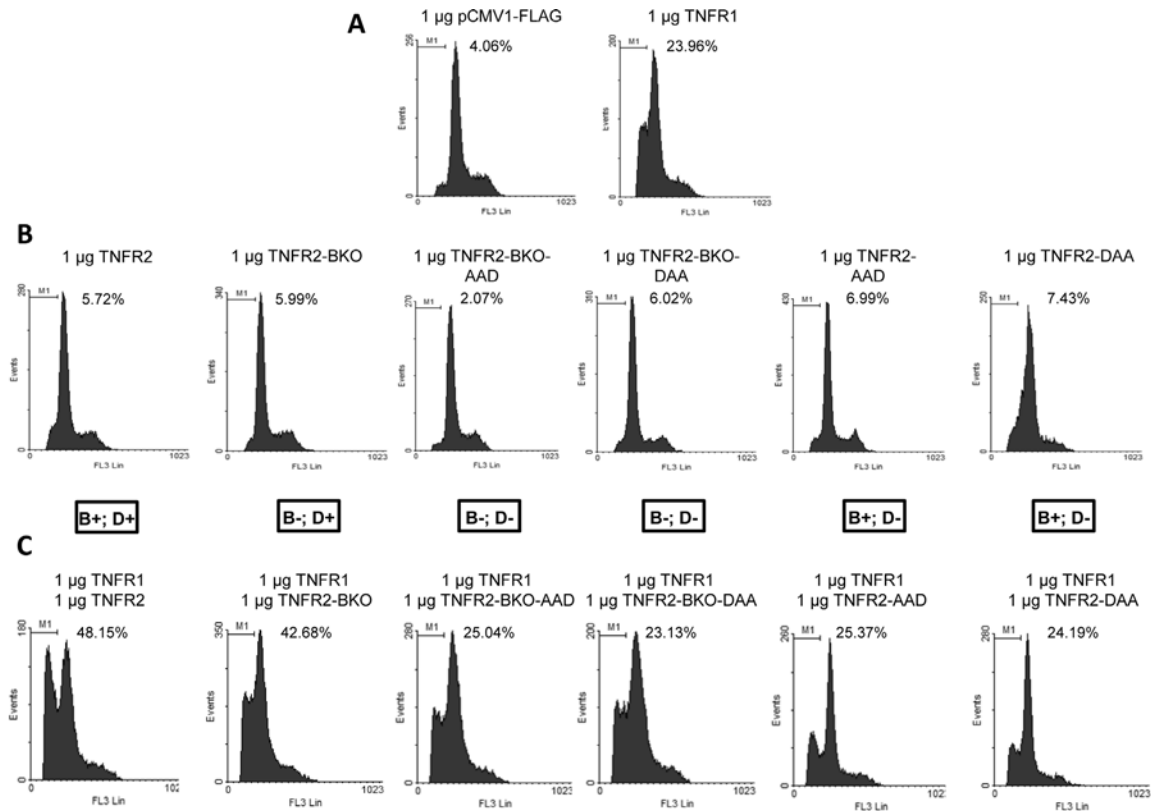


Figure 3: Effect of TNFR2-induced TRAF2 depletion on TNFR1 cytotoxicity. HEK293 cells were transfected with: A) 1 μ g of control plasmid or plasmid coding for TNFR1 plus 0.2 μ g of pGEGF-F; B) 1 μ g of the indicated receptor-coding plasmids plus 0.2 μ g of pGEGF-F; C) 1 μ g of the indicated receptor-coding plasmids and 1 μ g of plasmid coding for TNFR1 plus 0.2 μ g of pGEGF-F. TNFR2 and its mutants are named as in Figure 2 and the symbols B and D in the box under panel B refer to their ability to bind or to degrade TRAF2. Forty-eight hours later, cells were harvested, stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry to quantify the sub G0/G1 population. The percentage of apoptotic cells is indicated in each case.

that TRAF2 depletion by TNFR2 negatively affects NF- κ B activation (Fig 1B). We therefore addressed the question of whether TRAF2 degradation could be linked to the increased cytotoxicity observed when TNFR1 and TNFR2 are coexpressed. For this purpose TNFR1, TNFR2 or mutant receptors derived from the latter were expressed in HEK293 cells and levels of cell death were determined. As expected, neither wild type TNFR2 nor mutant TNFR2s unable to bind TRAF2 or to induce TRAF2 degradation, were able to induce cell toxicity by themselves (Fig 3B). When these receptors were coexpressed with TNFR1 two different behaviours were distinguished. On one hand, when TNFR1 was coexpressed with TNFR2-

BKO a enhanced cytotoxicity was observed which was comparable to that obtained by coexpression of TNFR1 and wild type TNFR2. TNFR2-BKO is a mutant receptor unable to bind TRAF2 or to activate NF- κ B but that retains its ability to induce TRAF2 degradation. On the other hand, when TNFR1 was coexpressed with TNFR2 mutant receptors unable to degrade TRAF2, no enhancement of TNFR1 cytotoxicity was observed regardless of whether the receptor was able or not to bind TRAF2 (Fig 3C). All these results show once again that TRAF2 binding (and hence activation of NF- κ B) and TRAF2 depletion are independent features of TNFR2 and also strongly suggest that TRAF2 depletion induced by TNFR2 is a key event

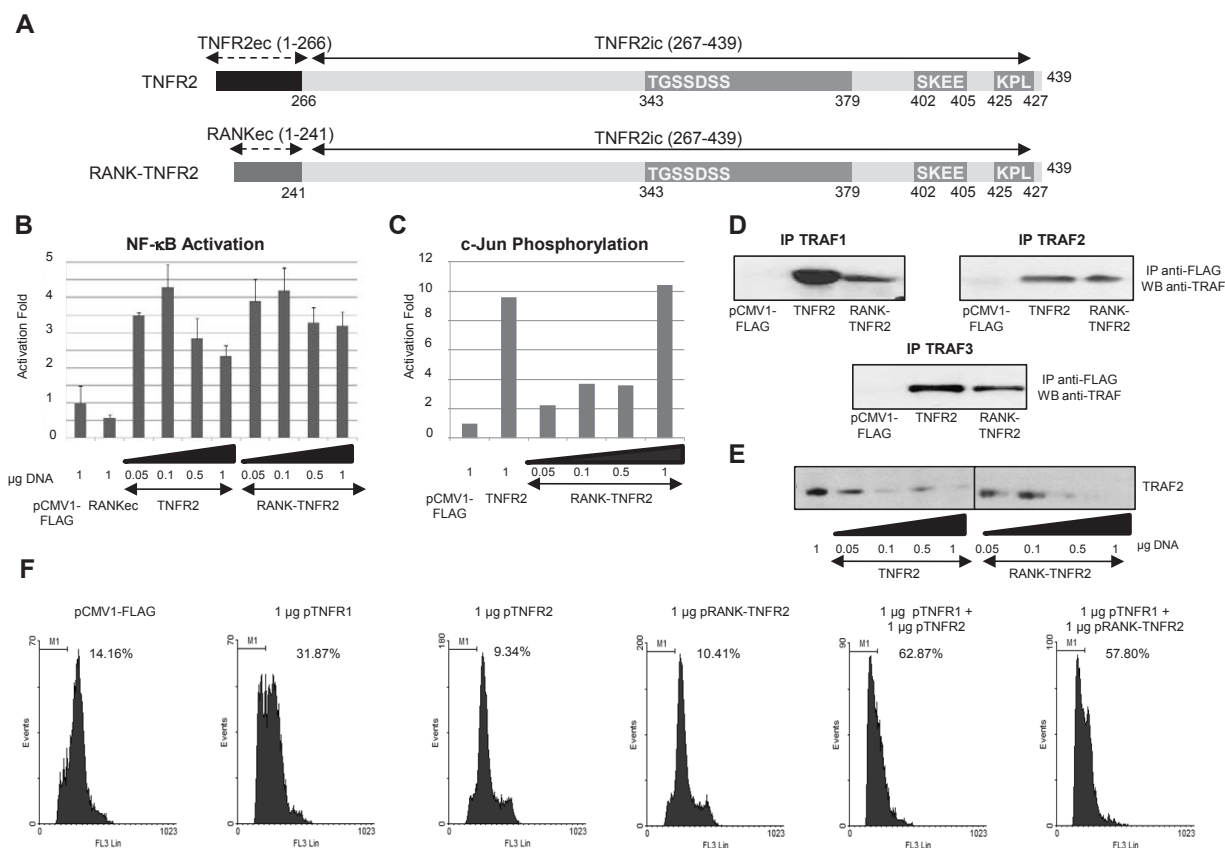


Figure 4: Functional analysis of the chimeric receptor RANK-TNFR2. A) Schematic representation of TNFR2 and RANK-TNFR2. The representation of the receptors is as in Fig. 1A. The chimeric receptor RANK-TNFR2 contains residues 1-241 corresponding to the extracellular and transmembrane domains of RANK and residues 267-439 corresponding to the intracellular region of TNFR2. B) NF- κ B activation. HEK293 cells were transiently transfected with the indicated amounts of each expression vector encoding TNFR2 or RANK-TNFR2, together with 0.5 μ g of pNF- κ B-luc and 0.5 μ g of pRL-TK. Forty-eight hours later luciferase was determined in all extracts. C) Analysis of c-Jun phosphorylation. HEK293 cells were transfected with the indicated amounts of TNFR2 or RANK-TNFR2 expression vectors and with 1 μ g of pHA-JNK. After 48 hours, cells were harvested and JNK was immunoprecipitated followed by an in vitro c-Jun phosphorylation assay. Its levels were determined by western blot assay using anti-phospho-cJun. D) TRAFs interaction assay. HEK293 cells were transfected with 1 μ g of each expression vector encoding TNFR2 or RANK-TNFR2 together with 0.5 μ g of the plasmids encoding the adaptor proteins TRAF1, TRAF2 or TRAF3. Twenty-four hours later, the cells were harvested and the receptors immunoprecipitated. The presence of each adaptor protein in the immunoprecipitates was analyzed by western blot (anti-TRAF1, anti-TRAF2 or anti-TRAF3). E) Analysis of TRAF2 intracellular levels. HEK293 cells were transfected with 1 μ g of the plasmids encoding the indicated receptors together with 0.5 μ g of pTRAF2. Forty-eight hours later the intracellular levels of TRAF2 were determined by western blot analysis. F) Quantification of sub G0/G1 populations induced by TNFR2 or RANK-TNFR2. HEK293 cells were transfected with the indicated amounts of the plasmids encoding the receptors together with 0.2 μ g of pGEGF-F. Forty-eight hours later cells were harvested, stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry to quantify the sub G0/G1 population. The percentage of apoptotic cells is indicated in each case.

in TNFR1-TNFR2 functional crosstalk. Thus, by lowering intracellular TRAF2 levels all NF- κ B-dependent pathways are inhibited while TNFR1 induced cell death is enhanced.

A chimeric receptor activated by RANKL but bearing the intracellular region of TNFR2 also enhances TNFR1 cytotoxicity.

The results reported up to now were obtained by transient overexpression of the receptors and their activation triggered by oligomerization in the absence of the ligand. We therefore addressed the question of whether in conditions in which the receptors are not overexpressed the TNFR1-TNFR2 crosstalk also occurs. Two different problems needed to be solved for this approach: a) although TNFR1 is ubiquitously expressed, TNFR2 expression is much more restricted in terms of cell type, b) TNFR2 is efficiently activated only by mTNF which also activates TNFR1; TNFR1 can be activated by soluble TNF as well. So, there are no specific ligands that

independently activate TNFR1 and TNFR2. We solved this problem by generating a chimeric receptor RANK-TNFR2 in which the extracellular and transmembrane regions of Receptor Activator of NF- κ B (RANK) were fused to the intracellular region of TNFR2 (Fig 4A). We first checked that this chimeric receptor is functionally equivalent to wild type TNFR2. Thus, by overexpressing this receptor in HEK-293 cells a biphasic activation of NF- κ B was observed (Fig 4B). Also, RANK-TNFR2 induces c-Jun phosphorylation (Fig 4C), binds TRAF1, TRAF2 and TRAF3 (Fig 4D) and is also able to induce TRAF2 degradation (Fig 4E). Moreover, when the chimeric receptor was coexpressed with TNFR1 it also enhanced TNFR1-mediated cytotoxicity (Fig 4F).

In order to test the crosstalk between ligand-activated receptors, the chimeric receptor RANK-TNFR2 or its mutant RANK-TNFR2- Δ 343 were stably expressed in the murine cell line L929. L929 cells do not express RANK and hence, NF- κ B is not activated by RANKL (data not shown). Thus, the new L929 derived cell lines (L929-RANK-TNFR2) are the appropriate tools to

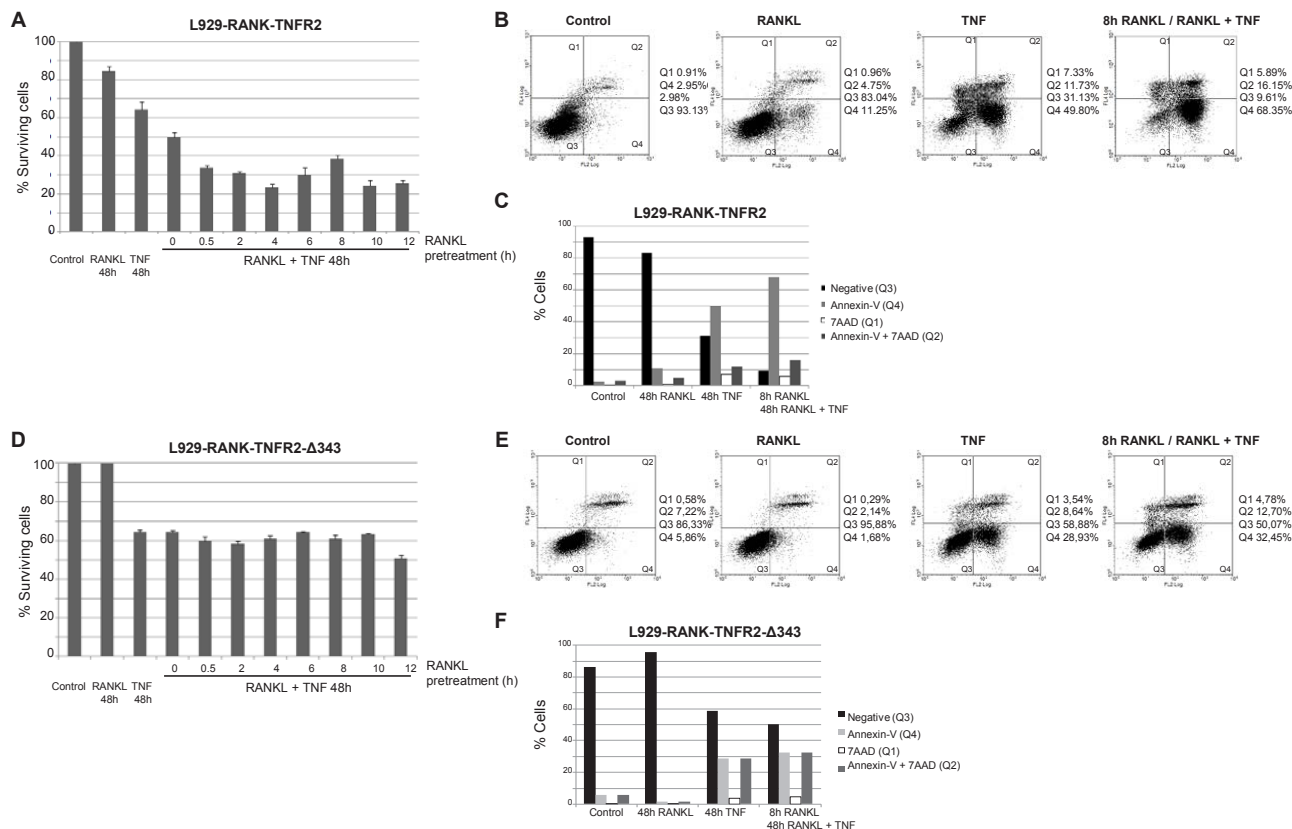


Figure 5: Enhancement of TNFR1-mediated cytotoxicity by activation of RANK-TNFR2 with RANKL. Measurement of cell viability: L929 cells stably expressing the chimeric receptor RANK-TNFR2 (A) or RANK-TNFR2- Δ 343 (D) were treated with soluble TNF to selectively activate TNFR1, pretreated with RANKL for the indicated times to selectively activate RANK-TNFR2 or with both cytokines. After 48 h cell viability was determined by staining with crystal violet and quantified as indicated in Materials and Methods. Data represent the quantification of such experiments carried out in triplicates. The error bars represent the error of the mean. Measurement of cell death markers. L929 cells stably expressing the chimeric receptor RANK-TNFR2 (B and C) or RANK-TNFR2- Δ 343 (E and F)) were treated for 48 h with TNF, RANKL or both (in this case cells were pretreated with RANKL for 8h). Cells were harvested and apoptosis/necrosis markers (AnnexinV or 7-AAD) were quantified by flow cytometry as indicated in Materials and Methods. B and E panels show the flow cytometry analysis and the gating carried out. C and F panels show the quantification of the results.

study the signalling and the crosstalk of ligand-activated TNFR1 and TNFR2. In this system, TNFR1 is activated by sTNF and TNFR2 (RANK-TNFR2) is activated by RANKL. Ligand activated RANK-TNFR2 shows the same properties that were shown above for the transiently expressed receptor (data not shown).

We analyzed cell viability by measuring crystal violet staining when L929-RANK-TNFR2 cells were treated with RANKL, sTNF or both ligands simultaneously. Treatment of cells for 48 h with both sTNF and RANKL induced a significant increase in TNF cytotoxicity compared to that caused by TNF alone. When cells were pre-treated with RANKL for a period of as little as 0.5 h prior to the combined treatment, the increase in cytotoxicity was more pronounced. Thus, pre-treatment with RANKL for 4 h increased TNF cytotoxicity 48 h later from 40% to 80% (Fig 5A). We also analyzed the cell death markers annexin-V and 7 amino actinomycin D (7-AAD). As shown in Fig 5B and 5C, treatment with RANKL did not induce significant changes in either marker. Soluble TNF induced a very significant increase (from 2.95% to 49.8%) in annexin-V positive cells and also a significant increase (from 2.98% to 11.73%) in annexin-V/7-AAD positive cells. More importantly, co-treatment of cells with sTNF and RANKL further increased the percentage of annexin-V and annexin-V/7-AAD positive cells compared to the values obtained with sTNF alone (from 49.8% to 68.35% for annexin-V positive cells and from 11.73% to 16.15% for annexin-V/7-AAD positive cells, Fig 5B and 5C). To further confirm that the cytotoxicity observed after the combined treatment with RANKL and sTNF was due to TRAF2 depletion induced by TNFR2 we generated the L929-derived cell line named L929-RANK-TNFR2- Δ 343. These cells stably express the chimeric receptor RANK-TNFR2- Δ 343 in which the intracellular region has been deleted from amino acid 343, therefore missing residues 343-349 responsible for TRAF2 degradation. Pretreatment of L929-RANK-TNFR2- Δ 343 cells with RANKL did not induce any further increase in toxicity over the one caused by sTNF alone, as determined by crystal violet staining (Fig 5D). Similar results were observed when apoptosis markers were studied. Thus, treatment of L929-RANK-TNFR2- Δ 343 cells with sTNF alone induced a significant increase in annexin-V positive cells (from 5.86% to 28.93%) though it was lower than in L929-RANK-TNFR2 cells (Fig 5E and 5F). Co-treatment of cells with sTNF and RANKL induced a very small increase in annexin-V or annexin-V/7-AAD positive cells compared to the values obtained with sTNF alone (Fig 5E and 5F). Altogether, these results confirm that ligand activation of TNFR1 triggers an apoptotic process that may be enhanced by ligand activation of TNFR2, provided that the signalling pathway leading to TRAF2 depletion prevails over the signalling pathways leading to NF- κ B activation.

DISCUSSION.

Since TNFR1 and TNFR2 were identified [22], the biological functions of TNFR2 have remained elusive because of its restricted expression and also because it is only efficiently activated by membrane bound TNF that also binds and activates TNFR1. TNF binding to TNFR2 forces its trimerization which leads to its direct interaction with TRAF2 and also with TRAF1, TRAF3, cIAP1 and cIAP2 through their binding to TRAF2 [11, 23]. This results in the activation of NF- κ B through both the canonical and the non canonical pathways [15, 16, 24] and JNK [25] which lead to transcriptional activation of genes related to cell proliferation and survival. Thus, TRAF2 acts as a key mediator in TNFR2 signalling [11]. The translocation of this Signalling Complex to the cytoplasm depends on cIAP1 and cIAP2. Several intermediates of the interaction TRAF2-cIAPs have been identified [26] [27]. Also, MEKK1 undergoes an autophosphorylation that activates it, leading to the late phosphorylation and activation of JNK [17].

TNFR2 activation induces changes in the subcellular localization of TRAF2 [28, 29]. Upon TNFR2 stimulation TRAF2 translocates to a new compartment [16, 19, 30, 31] where the adaptor protein is K48-linked, ubiquitinated and finally degraded by the proteasome [18, 29, 32, 33] although it has been also proposed that TRAF2 degradation takes place in the lysosome [34], being cIAP1 identified in both cases as the E3 ligase responsible for TRAF2 degradation. We have shown that NF- κ B is activated with different efficiencies as increasing amounts of TNFR2 are expressed and that the extent of activation correlates with changes in TRAF2 concentration [14]. Amino acids 343-349 of the receptor appear to be responsible for the induction of TRAF2 degradation, which negatively regulates TNFR2-induced NF- κ B activation. This region is constituted of 6 serine residues of which 4 show a high score for being phosphorylation sites, thus pointing to a phosphorylation of the receptor as the origin of TRAF2 depletion. Mutations of these serine residues abolish the ability of TNFR2 to degrade TRAF2 [14]. Interestingly, whereas signal triggering requires TRAF2 binding to the receptor, signal termination (TRAF2 depletion) appears independent of TRAF2 binding. Thus, a TNFR2 receptor unable to bind TRAF2 is still able to induce its degradation. TNF can induce another TRAF2 ubiquitination pattern, implicating K63-linked polyubiquitin chains, a modification not related to degradation but to JNK activation [32]. In this regard TRAF2 interaction with ubiquitin proteases such as USP31 (Ubiquitin Specific Protease) or CYLD (Cylindromatosis) which show specificity for K63-linked polyubiquitin chains is interesting [35, 36]. It is therefore conceivable that TRAF2 is initially modified through K63-linked polyubiquitin chains, converted into an active signal transducer and then, through K48-linked polyubiquitin

chains, tagged for degradation, thus terminating TRAF2-dependent signals.

TNFR2 does not present a DD domain on its intracellular region and it is therefore unexpected of inducing cell death by itself. However, some studies have pointed to the fact that TNFR2 is able to induce cytotoxicity [37, 38]. Several researchers have pointed to the fact that TNFR2 could potentiate TNFR1 cytotoxicity [14, 39, 40]. In one case it has been shown that it does so by the inducing TNF production [41]. Here we show that TRAF2 depletion by TNFR2 is a negative feedback for NF- κ B activation which has an important effect on TNFR1 signalling, resulting in the increased cytotoxicity induced by this receptor. This crosstalk appears to not only affect TNFR1 since the activation of apoptosis by FASL (Fas ligand) has also been reported to be affected by TNFR2 [42]. Thus, the ability of TNFR2 to induce TRAF2 degradation and therefore its depletion results in the inhibition of the antiapoptotic pathways and in the enhancement of the cytotoxicity mediated by TNFR1 when both receptors are coexpressed and activated. For an in depth characterization of the crosstalk between both TNF receptors we have studied the implication of different TNFR2 regions on TNFR1 signalling. It was known that TNFR2 signalling relies on TRAF2 binding to the region 402-SKEE-405 of the receptor [12]. We have shown that TNFR2 presents a second TRAF2 binding site located at the C-terminal region of the receptor. A third site, which is TRAF2 binding independent, is responsible for TNFR2 ability to induce TRAF2 degradation [14]. Here we show that this TNFR2 region involved in TRAF2 degradation is responsible for the increase in TNFR1 cytotoxicity when both receptors are activated. Evidence that this crosstalk relies on TRAF2 depletion comes from our results in which coexpression of TNFR1 and TNFR2 mutants unable to degrade TRAF2 does not affect TNFR1 cytotoxicity (Fig 2 and Fig 3). TRAF2 (as well as the anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2) interaction with TNFR1 inhibits the ability of this receptor to induce cell death [39, 40]. When TNFR1 and TNFR2 are coactivated, TNFR2 induces TRAF2 degradation thus affecting the formation of TNFR1 signalling complex, preventing the binding of cIAP1 and cIAP2 to TNFR1 which finally enhance its apoptotic potential. In this regard it is interesting that TRAF1 together with TRAF2 have been shown to suppress TNFR1 activation of apoptosis [43]. Thus, the balance between the apoptotic and antiapoptotic signals triggered by TNF determines whether the final outcome will be either cell death or cell survival. In other words, by activating the same set of receptors biological effects as diverse as proliferation or cell death can be obtained depending on the quantitative balance between the pro- and anti-apoptotic signals. Thus, it is particularly interesting to study the regulatory aspects of TRAF2 degradation. The coexpression of TNFR1 with TNFR2 mutant receptors unable to either bind or degrade

TRAF2 reinforces the role of the adaptor protein as a key element in receptor crosstalk. Our results show that NF- κ B activation only occurs when TNFR2 is unable to induce TRAF2 depletion (Fig 2). Conversely, the cytotoxic activity of TNFR1 increases when the receptor is expressed together with a TNFR2 receptor that induces TRAF2 degradation.

The absence of an exclusive ligand for TNFR2 is the major limiting factor for the study of this receptor. In this study we describe the generation of a functional system to study TNFR2 itself and also to study TNFR1/TNFR2 crosstalk. This meant the stable expression of a chimeric RANK-TNFR2 receptor in a cellular context free of RANK. Thus, cell treatment with RANKL activates TNFR2 whereas sTNF activates TNFR1. We show that cells treated with both RANKL and sTNF are killed more efficiently than those treated with sTNF alone (Fig 5), indicating again that the activation of TNFR2 causing TRAF2 depletion is a biological mechanism to enhance TNFR1 cytotoxicity. In this work we show that aminoacids 343-349 of TNFR2 have a principal role on the signalling pathways triggered by the receptor. Although it is not involved in TRAF2 binding it clearly regulates its intracellular levels, thus modulating NF- κ B activation and, subsequently, TNFR1 cytotoxicity.

In addition to NF- κ B, the JNK pathway is almost invariably activated by TNF receptors. Blocking of the NF- κ B dependent pathway leads to sustained JNK activation and apoptosis and, conversely, the blocking of TNF-induced JNK pathway promotes cell survival [44-46]. JNK induces cell death through mitochondrial events [47, 48]. In most cell types JNK activation by TNF does not imply cell death because TNF induces a transient activation of JNK [25]. Thus, it is likely that TNFR2-TRAF2 interaction leads to a transient activation of JNK that implies the activation of proliferative pathways whereas a further and sustained activation of the kinase could lead to cell death in the context of NF- κ B inhibition. This agrees with the fact that JNK is efficiently activated in the conditions reported in this work (results not shown). Recent data point to the interaction of the adaptor protein AIP1 (ASK1-interacting protein 1, involved in JNK activation) with TNFR2 suggesting a TRAF2-independent JNK activation by TNFR2 [49]. AIP1 also interacts with TNFR1, being involved in JNK activation and apoptosis signalling [50].

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and transfection methodology.

Human embryonic kidney 293 (HEK 293) and murine fibroblastic L929 cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD).

GP2 cell line was purchased from Clontech. HEK293 and GP2 cells were cultured in minimal essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% glutamine, 0.13% bicarbonate and antibiotics (100 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin). L929 cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics (100 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin). For transient transfections, HEK 293 cells (2×10^5 cells/well on 6-well plates) were seeded and transfected with 4.25 μ g polyethylenimine (PEI) pH 7.5 with the indicated plasmids in each case in 200 μ l of DMEM supplemented with 1% of non-essential aminoacids following manufacturer's instructions. For stable transfection of the L929 cells, the packaging cell line GP2 was used. GP2 cells (0.6×10^5 cells/well on 6 well-plates) were seeded and transfected with 3 μ g of pBABE-puro-RANK-TNFR2 and 1 μ g of pVSVg using Fugene and following manufacturer's instructions in 1ml of α MEM medium. Twenty-four hours later, 2 ml of α MEM medium was added to each well and 2 additional ml more 24 hours later. Seventy-two hours after transfection the medium of GP2 cells containing the retroviral particles was collected to infect L929 cells together with 10 μ g/ml of Polibren. After 72 hours, the positive clones were selected by adding 4 μ g/ml of puromycin to the medium.

Plasmids and antibodies.

Expression plasmid encoding human Myc-tagged TRAF2 as well as the plasmids encoding the adaptor proteins TRAF1 and TRAF3 have been previously described [51]. The NF- κ B reporter construct pNF- κ B-luc encodes luciferase from firefly (*Photinus pyralis*) under the control of a promoter with several κ B elements. It was a generous gift from Dr. David S. Ucker, from the University of Illinois at Chicago. The pRL-TK plasmid (Promega) encodes luciferase from *Renilla reniformis* under the control of the Thymidine Kinase promoter from HSV-TK herpes virus. The HA-JNK encodes JNK protein tagged with the HA antigen. It was a generous gift from Dr. Pilar de la Peña, from the University of Oviedo. pEGFP-F expresses a farnesylated version of the green fluorescent protein GFP and was also a generous gift from Dr. David S. Ucker.

Expression plasmids encoding human FLAG-tagged TNFR2 (pCMV1-FLAG-TNFR2) and human TNFR1 (pCDNA3-TNFR1) were a gift from B.B. Aggarwal (MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA). Unless otherwise indicated, TNFR2 constructs used in this work were generated by PCR using standard methods and the primers indicated in Table SI. To generate point mutations by PCR mutagenesis, the Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit of Stratagene was used together with the primers indicated in Table SI. The sequences of all plasmids generated in this work were verified by

automated DNA sequencing

Primary antibodies against TRAF1 (G-20), TRAF2 (C-20), TRAF3 (H-20) and TNFR1 (H-5) were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Anti-FLAG (F3165) and anti- β -actin (A5441) from Sigma. Anti-HA antibody was purchased from Roche and anti-c-Jun-phospho-Ser73 antibody was obtained from Cell Signalling. Secondary antibodies anti-rabbit IgG and anti-mouse IgG tagged with fluorophores were purchased from LICOR-Biosciences.

Western blotting.

Proteins were separated by SDS-PAGE, electroblotted onto PVDF membranes (Immobilone-FL, Millipore), blocked for 1 hour in 5% non-fat milk and incubated with the indicated primary antibodies (at 1:5,000 dilution in TBS-0.1% Tween) and the appropriate secondary antibody (at 1:15,000 dilution in 5% non-fat milk in TBS-0.1% Tween). Membranes were scanned with the Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR biosciences).

Transcriptional activity of NF- κ B.

NF- κ B activity was determined analyzing the expression of luciferase. HEK293 cells were transfected with 0.2 μ g of pNF- κ B-luc, 0.05 μ g of pRL-TK and with the amounts of the plasmids of interest indicated in each case. The activities of both luciferases were determined with the Dual-Luciferase™ Reporter Assay System kit (Promega) following manufacturer's instructions. Basal activity was considered the one obtained in cells transfected with the pCMV1-FLAG vector alone. In all cases the data are represented as activation fold over the control condition, once corrected the value of firefly luciferase activity with the value of Renilla luciferase activity.

Quantification of the hypodiploid cell population.

HEK293 cells were transfected with the plasmids of interest together with 0.2 μ g of pEGFP-F. After 36 hours the cells were collected (including any floating cells in the culture medium), washed twice with PBS and permeabilized with 1 ml of 70% Ethanol at -20°C added drop by drop while vortexed softly. Cells were incubated overnight at -20°C. Next, the samples were washed twice in PBS and resuspended in 400 μ l of 5 μ g/ml PI, 100 μ g/ml RNase in PBS for 15 min in the dark at room temperature. Finally, the cell cycle was analysed by flow cytometry (Cytomics FC500, Beckman Coulter) to quantify variations in the sub G0/G1 population of the transfected cells.

c-Jun phosphorylation.

HEK293 cells were transfected with 1 µg of pHA-JNK and with the plasmids of interest indicated in each case. After 36 hours, cells were harvested and resuspended in 200 µl of lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF) on ice for 5 minutes and centrifugated for 15 minutes at 13,000 rpm at 4 °C. Equivalent amounts of proteins of each sample were incubated with 1 µg of anti-HA for 4 hours in rotation at 4 °C. Next, each sample was incubated with 20 µl of G-protein linked to a Sepharose matrix overnight in rotation at 4 °C. The samples were then washed twice with 500 µl of lysis buffer and also twice with 500 µl of kinase buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM β-glycerophosphate, 2 mM DTT, 0.1 mM sodium orthovanadate, 10 mM MgCl₂) for 2 minutes at 5,000 rpm at 4 °C. The complexes were incubated in 40 µl of kinase buffer supplemented with 200 µM ATP and 1 µg of GST-c-Jun (Cell Signalling). The reaction was incubated at 30 °C for 30 minutes and then stopped with 40 µl of Laemmli buffer (62.5 mM pH 6.8 Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 2.5% β-mercaptoethanol and 0.01% bromophenol blue). The samples were analyzed by Western-Blot using the primary antibody anti-cJun-phospho-Ser73.

Co-immunoprecipitation assay.

HEK 293 cells were cotransfected with 1 µg of the plasmids indicated in each case together with 0.3 µg of the plasmids encoding the TRAF protein of interest. Twenty-four hours after transfection, cells were harvested and lysed in 200 µl of Lysis buffer (20 mM pH 8.0 Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 µg/µl leupeptin, 1 µg/µl aprotinin, 2 mM sodium orthovanadate). Two 20 µl fractions were collected as inputs for the TRAF protein and for the receptor as expression controls. The remaining fraction was incubated with 1 µg of anti-FLAG antibody at 4 °C in rotation for one hour and then with 20 µl of protein G-Sepharose beads in rotation at 4 °C overnight. After three washes with lysis buffer and an additional one with low salt buffer (20 mM pH 8.0 Tris-HCl, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 µg/µl leupeptin, 1 µg/µl aprotinine, 2 mM sodium orthovanadate), the immunoprecipitate was resuspended in SDS-sample buffer and subjected, together with inputs, to SDS-PAGE and Western blot with anti-TRAF1, TRAF2 or TRAF3 and anti-FLAG (anti-receptor).

Analysis of cellular viability.

L929 cells were seeded in 12-well plates (1x10⁵ cells/plate) and treated 24 hours later with 5 ng/ml of RANKL or TNF or with both cytokines at the times indicated. To study the cell viability under each treatment, cells were washed once with PBS and fixed with 500 µl of a buffer containing 30% ethanol and 20% acetic acid during 15 minutes. Next, cells were stained with a 0.4% crystal violet solution in 20% ethanol during 15 minutes and washed once with H₂O. After drying the plates overnight, they were destained during 20 minutes with 500 µl of a buffer containing 40% ethanol and 10% acetic acid. To quantify the amount of dye retained in each condition, the absorbance of each sample at 580 nm was determined.

Analysis of cell death induction.

To study the induction of a cell death process, the percentage of positive cells for AnnexinV and 7-AAD was determined using the AnnexinV PE Apoptosis Detection Kit I from BD Pharmingen following the manufacturer's instructions. Briefly, L929 cells were seeded in 12-well plates (1x10⁵ cells/plate) and 24 hours later treated with 5 ng/ml of RANKL or TNF or with both cytokines at the times indicated. Cells were harvested and washed twice with PBS. The percentage of positive cells for Annexin-V and 7-AAD was then determined by flow cytometry on a Cytomics FC500 (Beckman Coulter) cytometer.

ACKNOWLEDGMENTS.

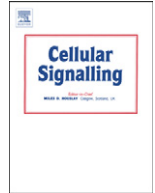
Work at the authors laboratory was supported by Grant SAF2009-07227 from the Spanish Ministry of Science and Technology (MICINN) and by Grant IB09-066 from the Plan Regional de Ciencia y Tecnología del Principado de Asturias (PCTI). LCH was recipient of fellowships from the PCTI. The IUOPA is supported by Obra Social Cajastur. We thank Dr. Kevin P. Dalton for critical reading of the manuscript.

REFERENCES.

1. Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K and Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995; 83(5):793-802.
2. Grell M, Wajant H, Zimmermann G and Scheurich P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(2):570-575.
3. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL and

- Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*. 2000; 288(5475):2351-2354.
4. Cabal-Hierro L and Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal*. 2012; 24:1297-1305.
 5. Micheau O and Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003; 114(2):181-190.
 6. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M and Chan FK. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*. 2009; 137(6):1112-1123.
 7. Vandenaabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T and Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11(10):700-714.
 8. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B and Tschopp J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*. 2000; 1(6):489-495.
 9. Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, Van de Craen M, Declercq W, Fiers W and Vandenaabeele P. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med*. 1998; 188(5):919-930.
 10. Carpentier I, Coornaert B and Beyaert R. Function and regulation of tumor necrosis factor receptor type 2. *Curr Med Chem*. 2004; 11(16):2205-2212.
 11. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM and Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*. 1995; 83(7):1243-1252.
 12. Rothe M, Wong SC, Henzel WJ and Goeddel DV. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1994; 78(4):681-692.
 13. Rothe M, Sarma V, Dixit VM and Goeddel DV. TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science*. 1995; 269(5229):1424-1427.
 14. Rodriguez M, Cabal-Hierro L, Carcedo MT, Iglesias JM, Artime N, Darnay BG and Lazo PS. NF-kappaB signal triggering and termination by tumor necrosis factor receptor 2. *J Biol Chem*. 2011; 286(26):22814-22824.
 15. Hauer J, Puschner S, Ramakrishnan P, Simon U, Bongers M, Federle C and Engelmann H. TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(8):2874-2879.
 16. Rauert H, Wicovsky A, Muller N, Siegmund D, Spindler V, Waschke J, Kneitz C and Wajant H. Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *J Biol Chem*. 2010; 285(10):7394-7404.
 17. Matsuzawa A, Tseng PH, Vallabhapurapu S, Luo JL, Zhang W, Wang H, Vignali DA, Gallagher E and Karin M. Essential cytoplasmic translocation of a cytokine receptor-assembled signaling complex. *Science*. 2008; 321(5889):663-668.
 18. Li X, Yang Y and Ashwell JD. TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature*. 2002; 416(6878):345-347.
 19. Wicovsky A, Henkler F, Salzmann S, Scheurich P, Kneitz C and Wajant H. Tumor necrosis factor receptor-associated factor-1 enhances proinflammatory TNF receptor-2 signaling and modifies TNFR1-TNFR2 cooperation. *Oncogene*. 2009; 28(15):1769-1781.
 20. Chen NJ, Chio, II, Lin WJ, Duncan G, Chau H, Katz D, Huang HL, Pike KA, Hao Z, Su YW, Yamamoto K, de Pooter RF, Zuniga-Pflucker JC, Wakeham A, Yeh WC and Mak TW. Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(34):12429-12434.
 21. Bigda J, Beletsky I, Brakebusch C, Varfolomeev Y, Engelmann H, Holtmann H and Wallach D. Dual role of the p75 tumor necrosis factor (TNF) receptor in TNF cytotoxicity. *J Exp Med*. 1994; 180(2):445-460.
 22. Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, Hunziker W, Lesslauer W and Loetscher H. Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(8):3127-3131.
 23. Bluethmann H, Rothe J, Schultze N, Tkachuk M and Koebel P. Establishment of the role of IL-6 and TNF receptor 1 using gene knockout mice. *J Leukoc Biol*. 1994; 56(5):565-570.
 24. Marchetti L, Klein M, Schlett K, Pfizenmaier K and Eisel UL. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway. *J Biol Chem*. 2004; 279(31):32869-32881.
 25. Franzoso G, Zazzeroni F and Papa S. JNK: a killer on a transcriptional leash. *Cell Death Differ*. 2003; 10(1):13-15.
 26. Choi JW, Kim DG, Park MC, Um JY, Han JM, Park SG, Choi EC and Kim S. AIMP2 promotes TNFalpha-dependent apoptosis via ubiquitin-mediated degradation of TRAF2. *J Cell Sci*. 2009; 122(Pt 15):2710-2715.
 27. Alvarez S, Harikumar K, Hait N, Allegood J, Strub G, Kim E, Maceyka M, Jiang H, Luo C, Kordula T, Milstein S and Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature*. 2010; 465(7301):4.
 28. Arch RH, Gedrich RW and Thompson CB. Translocation of TRAF proteins regulates apoptotic threshold of cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 272(3):936-945.

29. Wu CJ, Conze DB, Li X, Ying SX, Hanover JA and Ashwell JD. TNF-alpha induced c-IAP1/TRAF2 complex translocation to a Ubc6-containing compartment and TRAF2 ubiquitination. *EMBO J.* 2005; 24(10):1886-1898.
30. Feng X, Gaeta ML, Madge LA, Yang JH, Bradley JR and Pober JS. Caveolin-1 associates with TRAF2 to form a complex that is recruited to tumor necrosis factor receptors. *J Biol Chem.* 2001; 276(11):8341-8349.
31. Li Q and Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(10):725-734.
32. Aggarwal BB, Shishodia S, Ashikawa K and Bharti AC. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2002; 1(4):327-341.
33. Chan FK. The pre-ligand binding assembly domain: a potential target of inhibition of tumour necrosis factor receptor function. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59 Suppl 1:i50-53.
34. Vince JE, Chau D, Callus B, Wong WW, Hawkins CJ, Schneider P, McKinlay M, Benetatos CA, Condon SM, Chunduru SK, Yeoh G, Brink R, Vaux DL and Silke J. TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha. *J Cell Biol.* 2008; 182(1):171-184.
35. Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israel A, Wallach D and Courtois G. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature.* 2003; 424(6950):801-805.
36. Tzimas C, Michailidou G, Arsenakis M, Kieff E, Mosialos G and Hatzivassiliou EG. Human ubiquitin specific protease 31 is a deubiquitinating enzyme implicated in activation of nuclear factor-kappaB. *Cell Signal.* 2006; 18(1):83-92.
37. Cusson N, Oikemus S, Kilpatrick ED, Cunningham L and Kelliher M. The death domain kinase RIP protects thymocytes from tumor necrosis factor receptor type 2-induced cell death. *J Exp Med.* 2002; 196(1):15-26.
38. Heller RA, Song K, Fan N and Chang DJ. The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity. *Cell.* 1992; 70(1):47-56.
39. Fotin-Mleczeck M, Henkler F, Samel D, Reichwein M, Hausser A, Parmryd I, Scheurich P, Schmid JA and Wajant H. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. *J Cell Sci.* 2002; 115(Pt 13):2757-2770.
40. Weiss T, Grell M, Hessabi B, Bourteele S, Muller G, Scheurich P and Wajant H. Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80: requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site. *J Immunol.* 1997; 158(5):2398-2404.
41. Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, Chen CM, Grunwald U, Huang DC, Wu Lee YH, Durkop H, Engelmann H, Scheurich P, Wajant H and Strasser A. Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *EMBO J.* 1999; 18(11):3034-3043.
42. Takada Y, Sung B, Sethi G, Chaturvedi MM and Aggarwal BB. Evidence that genetic deletion of the TNF receptor p60 or p80 inhibits Fas mediated apoptosis in macrophages. *Biochem Pharmacol.* 2007; 74(7):1057-1064.
43. Wicovsky A, Salzman S, Roos C, Ehrenschwender M, Rosenthal T, Siegmund D, Henkler F, Gohlke F, Kneitz C and Wajant H. TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling. *Cell Death Differ.* 2009; 16(11):1445-1459.
44. De Smaele E, Zazzeroni F, Papa S, Nguyen DU, Jin R, Jones J, Cong R and Franzoso G. Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature.* 2001; 414(6861):308-313.
45. Javelaud D and Besancon F. NF-kappa B activation results in rapid inactivation of JNK in TNF alpha-treated Ewing sarcoma cells: a mechanism for the anti-apoptotic effect of NF-kappa B. *Oncogene.* 2001; 20(32):4365-4372.
46. Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M and Lin A. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature.* 2001; 414(6861):313-317.
47. Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* 2000; 103(2):239-252.
48. Lei K, Nimmual A, Zong WX, Kennedy NJ, Flavell RA, Thompson CB, Bar-Sagi D and Davis RJ. The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(13):4929-4942.
49. Ji W, Li Y, Wan T, Wang J, Zhang H, Chen H and Min W. Both internalization and AIP1 association are required for tumor necrosis factor receptor 2-mediated JNK signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32(9):2271-2279.
50. Zhang H, Lin Y, Li J, Pober JS and Min W. RIP1-mediated AIP1 phosphorylation at a 14-3-3-binding site is critical for tumor necrosis factor-induced ASK1-JNK/p38 activation. *J Biol Chem.* 2007; 282(20):14788-14796.
51. Darnay BG, Haridas V, Ni J, Moore PA and Aggarwal BB. Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF-kappaB (RANK). Interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem.* 1998; 273(32):20551-20555.



TRAF-mediated modulation of NF- κ B AND JNK Activation by TNFR2

Lucía Cabal-Hierro¹, Montserrat Rodríguez, Noelia Artime, Julián Iglesias, Lorea Ugarte, Miguel A. Prado², Pedro S. Lazo^{*}



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo, 33071 Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 July 2014

Accepted 15 August 2014

Available online 22 August 2014

Keywords:

TNF receptors
Death Receptors
TRAF proteins
Apoptosis
NF- κ B
JNK

ABSTRACT

Tumor Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2) activates transcription factor κ B (NF- κ B) and c-Jun N-terminal kinase (JNK). Most of the biological activities triggered by TNFR2 depend on the recruitment of TNF Receptor-Associated Factor 2 (TRAF2) to the intracellular region of the receptor. The intracellular region of TNFR2 contains five highly conserved amino acid sequences, three of which appear implicated in receptor signaling. In this work we have studied the interaction of TNFR2 with TRAF proteins as well as the functional consequences of this interaction. We show that TRAF1, TRAF2 and TRAF3 bind to the receptor through two different binding sites located at conserved modules IV and V of its intracellular region, respectively. We also show that TRAF1 and TRAF3 have opposite effects to TRAF2 on NF- κ B and JNK activation by TNFR2. Moreover, we show that TNFR2 is able to induce JNK activation in a TRAF2-independent fashion. This new receptor activity relies on a sequence located in the conserved module III. This region is also responsible for the ability of TNFR2 to induce TRAF2 degradation, thus emphasizing the role of conserved module III (amino acids 338–379) on receptor signaling and regulation. We show that only TNFR2 can induce TRAF2 degradation while TRAF1 or TRAF3 is not subjected to this regulatory mechanism and that TRAF1, but not TRAF3, is able to inhibit TRAF2 degradation.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

TNF has been established as a main player in the immune processes of the organism [1,2]. In the last few years, the role of the inflammatory reactions on cancer development [3] has highlighted the role of TNF both in tumor development [4–7] and inhibition [8,9]. The study of TNF structure and functions led to the identification of one of the main families of cytokines, the so-called TNF superfamily which exerts its biological effects through its interaction with transmembrane proteins which constitute the TNFR superfamily of receptors [10–12]. TNFRs trigger their biological responses upon binding of different

adaptor proteins and may lead to final responses as diverse as cell proliferation or cell death. The TRAF proteins were initially identified because of their interaction with different TNFRs, regulating them and acting as transducers for different biological pathways [13]. In mammals, the TRAF family is constituted of 7 different members. All these proteins contain the TRAF domain, involved in their interaction with the TNFRs and with other TRAF proteins [14,15]. Except for TRAF1, all TRAF proteins contain a RING domain in their N-terminal region. The deletion of this domain in TRAF2, TRAF5 or TRAF6 leads to the generation of dominant negative mutants, indicating that it is essential for the biological activity of the protein [16,17]. More recently, several studies have suggested an E3 ligase activity for this RING thus pointing to a role in ubiquitination involved in the regulation of TNFR signaling [18, 19]. Binding of TRAF proteins to TNFRs occurs through highly defined motifs present on the receptors. Two sequence motifs have been suggested to be implicated in TRAF proteins binding. One is constituted by the sequence (P/S/A/T)x(Q/E)E and the other one is represented by the sequence PxQxxD [14].

Both TNF receptors TNFR1 and TNFR2 are transmembrane proteins with high similarity in their extracellular regions although they differ widely in their intracellular domains. TNFR1 contains in its intracellular region a death domain while TNFR2 does not contain a death domain. Instead, it has two different regions implicated in the binding of TRAF proteins [20,21]. Although TNFR1 signaling has been widely characterized and reviewed [22], TNFR2 activity is less well understood. Most of the biological activities triggered by TNFR2 depend on its interaction

Abbreviations: AIP1, ASK1 interacting protein; AP-1, activating protein 1; BKO, binding knock out; CRMA, cytokine response modifier A; cIAP, cellular inhibitor of apoptosis; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; FLAG, FLAG peptide; HA, hemagglutinin; HEK, human embryonic kidney; IKK, I κ B kinase; I κ B, inhibitor of NF- κ B; JNK, N-terminal Jun kinase; NF- κ B, nuclear factor κ B; PEI, polyethylenimine; RANK, receptor activator of NF- κ B; TNF, tumor necrosis factor; TNFR, TNF receptor; TRADD, TNF receptor associated protein with death domain; TRAF, TNF receptor associated factor.

^{*} Corresponding author at: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular and Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo, Campus de El Cristo, 33071 Oviedo, Spain. Tel.: +34 98 510 4213; fax: +34 98 510 3157.

E-mail address: pslazo@uniovi.es (P.S. Lazo).

¹ Present address: Abramson Cancer Center, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA.

² Present address: Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

with TRAF2 which leads to the activation of both NF- κ B and AP-1 [23]. Here, we have focused on characterizing the interaction of TNFR2 with TRAF proteins and studied the functional consequences of this interaction. We show that TRAF1, TRAF2 and TRAF3 bind to the receptor through different regions of its intracellular region and that TRAF1 and TRAF3 binding have opposite effects to that of TRAF2 binding on NF- κ B and JNK activation. Moreover, we show for the first time that TNFR2 is able to induce c-Jun phosphorylation in a TRAF2-independent fashion. This new receptor activity relies on a region of the receptor in which our studies have also localized the ability of TNFR2 to induce TRAF2 degradation [20], thus emphasizing the role of module III (amino acids 338–379) on receptor signaling and its regulation.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines and transfection reagents

HEK293 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) and cultured in minimal essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% glutamine, 0.13% bicarbonate and antibiotics (100 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin). For transient transfections, HEK293 cells (2×10^5 cells/well on 6-well plates) were seeded and transfected with 4.25 μ g PEI pH 7.5 with the indicated plasmids in each case in 200 μ l of DMEM supplemented with 1% of non-essential amino acids following the manufacturer's instructions. Cells were harvested 36 h after transfection.

2.2. Plasmids and antibodies

Expression plasmid encoding human Myc-tagged TRAF2 as well as the plasmids encoding the adaptor proteins TRAF1 and TRAF3 have been described elsewhere [24]. Expression plasmids pCR3-FLAG encoding the adaptor proteins TRAF1, TRAF2, TRAF3 and TRAF6 as well as the plasmid pCRK-myc-TRAF5 were kindly provided by Dr. Bryant G. Darnay, from the M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX. The NF- κ B reporter construct pNF- κ B-luc encodes the luciferase protein from firefly (*Photinus pyralis*) under the control of a promoter with several B elements. It was a generous gift from Dr. David S. Ucker, from the University of Illinois, Chicago. The pRL-TK plasmid (Promega) encodes the luciferase protein from *Renilla reniformis* under the control of the thymidine kinase promoter from HSV-TK herpes virus. The HA-JNK encodes the JNK protein tagged with the HA antigen and was a generous gift from Dr. Pilar de la Peña, from the University of Oviedo. Expression plasmids encoding human FLAG-tagged TNFR2 (pCMV1-FLAG-TNFR2) and human TNFR1 (pCDNA3-TNFR1) were a gift from B.B. Aggarwal (M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA). Expression plasmids for the GST fusion protein pGEX-KG and those encoding the intracellular region of RANK and TNFR2 receptors (pGEX-KG-RANK and pGEX-KG-TNFR2 respectively) were also kindly provided by Dr. Bryant G. Darnay, from the M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX. Unless otherwise indicated, TNFR2 constructs and GST-TNFR2 deletions used in this work were generated by PCR using standard methods and the primers indicated in Table S1. To generate point mutations by PCR mutagenesis, the Stratagene Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit was used together with the primers indicated in Table S1. The sequences of all plasmids generated in this work were verified by automated DNA sequencing. Primary antibodies against TRAF1 (G-20), TRAF2 (C-20), TRAF3 (H-20) and TNFR1 (H-5) were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA) and anti-FLAG peptide (F3165) and anti- β -actin (A5441) from Sigma. Anti-HA antibody was purchased from Roche and anti-c-Jun-phospho-Ser73 antibody was obtained from Cell Signaling. Secondary antibodies anti-rabbit IgG and anti-mouse IgG tagged with fluorophores were purchased from LI-COR Biosciences.

2.3. Western-blot analysis

Proteins were separated by SDS-PAGE, electroblotted onto PVDF membranes (Immobilone-FL, Millipore), blocked for 1 h in 5% non-fat milk and incubated with the indicated primary antibodies (at 1:5000 dilution in TBS-0.1% Tween) and the appropriate secondary antibody (at 1:15,000 dilution in 5% non-fat milk in TBS-0.1% Tween). Finally, the membranes were scanned with the Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

2.4. Co-immunoprecipitation assay

HEK293 cells were cotransfected with 1 μ g of the plasmids indicated in each case together with 0.3 μ g of the plasmids encoding the TRAF protein of interest. Twenty-four hours after transfection, cells were harvested and lysed in 200 μ l Lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 μ g/ μ l leupeptin, 1 μ g/ μ l aprotinin, 2 mM sodium orthovanadate). Two 20 μ l fractions were collected as inputs for the TRAF protein and for the receptor as expression controls. The remaining 160 μ l fraction was incubated with 1 μ g anti-FLAG antibody at 4 °C in rotation for one hour and then with 20 μ l protein G-Sepharose beads in rotation at 4 °C overnight. After three washes with lysis buffer and an additional one with low salt buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 μ g/ μ l leupeptin, 1 μ g/ μ l aprotinin, 2 mM sodium orthovanadate), the immunoprecipitate was resuspended in SDS-sample buffer and subjected, together with inputs, to SDS-PAGE and Western blot analysis was performed with anti-TRAF1, anti-TRAF2 or anti-TRAF3 and anti-FLAG (anti-receptor) antibodies.

2.5. GST-TNFR2 fusion protein affinity binding assay

Equivalent amounts of each GST-TNFR2 fusion protein attached to 20 ml glutathione-agarose beads were mixed with lysates from HEK293 cells transiently transfected with the plasmid encoding the TRAF protein of interest in binding buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 250 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate, 2 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin, 25 mM β -glycerophosphate) and allowed to rotate for 1 h at 4 °C. The beads were collected by centrifugation, washed three times in binding buffer and then washed once in low-salt buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 25 mM NaCl, 1 mM DTT). Bound proteins were eluted with addition of SDS sample buffer and boiled. The eluted proteins were subjected to 7.5% SDS-PAGE and Western blot analysis was performed with either anti-Myc (TRAF5) or anti-FLAG (TRAF1, TRAF2, TRAF3 and TRAF6).

2.6. NF- κ B activation

NF- κ B activity was determined by an analysis of luciferase activity. HEK293 cells were transfected with 0.2 μ g pNF- κ B-luc, 0.05 μ g pRL-TK and with the amounts of the plasmids of interest indicated in each case. Measurements of both luciferases were determined with the Dual-Luciferase™ Reporter Assay System kit (Promega) following the manufacturer's instructions. On the graphic representations of the data the control condition (cells transfected with the pCMV1-FLAG vector alone) is considered the basal activation that obtained with. In all other conditions, the data are represented as activation fold over the control condition.

2.7. c-Jun phosphorylation

HEK293 cells were transfected with 1 μ g of pHA-JNK and with the plasmids of interest indicated in each case. After 36 h, cells were harvested and resuspended in 200 μ l of lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate,

1 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF) on ice for 5 min and centrifuged for 15 min at 13,000 rpm at 4 °C. Equivalent amounts of proteins of each sample were incubated with 1 µg anti-HA for 4 h in rotation at 4 °C. Next, each sample was incubated with 20 µl G-protein linked to a Sepharose matrix overnight in rotation at 4 °C. The samples were then washed twice with 500 µl lysis buffer and also twice with 500 µl kinase buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM β-glycerophosphate, 2 mM DTT, 0.1 mM sodium orthovanadate, 10 mM MgCl₂) for 2 min at 5000 rpm at 4 °C. The complexes were incubated in 40 µl of kinase buffer supplemented with 200 µM ATP and 1 µg GST-c-Jun (Cell Signaling). The reaction was incubated at 30 °C for 30 min and then stopped with 40 µl Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 2.5% β-mercaptoethanol and 0.01% bromophenol blue). The samples were analyzed by Western blot using the primary antibody anti-cjun-phospho-Ser73.

3. Results

3.1. TNFR2 interacts with TRAF1, TRAF2 and TRAF3

TNFR2, which has no death domain in its intracellular region, relies on the binding of TRAF proteins to trigger different signaling pathways. In fact, most of its biological activity has been described as relying on its interaction with TRAF2 [25] although TRAF1 and TRAF3 may also play a role in receptor signaling. However, studies regarding TNFR2 signaling and TRAF proteins other than TRAF2 are limited and often contradictory [26,27]. Alignment of amino acid sequences of TNFR2 from various species shows up to five highly conserved sequences within the intracellular region. These conserved sequences include module III (amino acids 338–379) which includes the amino acids responsible for inducing TRAF2 degradation, module IV (comprising amino acids 393–405) which contains one TRAF2 binding site (residues 402–405) and module V (comprising amino acids 425–439) which contains a second TRAF2 binding site (Fig. 1). The first functional studies on TNFR2 showed that amino acids 402-SKEE-405 of the receptor are directly involved in the

interaction with TRAF2. These residues appeared to be required for TRAF1 and TRAF3 binding as well [28,29]. More recent studies including our own have identified a second TRAF2 binding site on the receptor [20,30,31]. We have shown that the last 15 amino acids of the intracellular region of TNFR2 are also involved in TRAF2 binding and that mutation of amino acids 425-KPL-427 blocks the interaction of this region with TRAF2.

To address the role of TRAF proteins on TNFR2 signaling we have first analyzed the ability of the receptor to interact with different TRAF proteins. We have studied the interaction of TNFR2 with TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 and TRAF6. TRAF4 and TRAF7 were excluded because an increasing number of studies have characterized them as members of this protein family but not directly involved in TNFR signaling [32,33]. We first performed pull down assays of the above mentioned TRAF proteins using GST-TNFR2 fusion proteins and also GST-RANK (which has been shown to be able to bind all TRAF proteins [24]) as a positive control. Our results indicate that of the TRAF proteins assayed, only TRAF1, TRAF2 and TRAF3 were able to bind to the TNFR2 fusion protein while no binding of TRAF5 or TRAF6 was observed (not shown). We then performed immunoprecipitation assays using cell extracts from cells in which TNFR2 or mutant receptors derived from it (all tagged with the FLAG peptide) were coexpressed with TRAF proteins. Twenty-four hours after transfection, the cells were harvested, the receptors immunoprecipitated with antiFLAG antibodies and the immunoprecipitate analyzed by Western blot for the presence of TRAF proteins using specific antibodies. The results shown in Fig. 2B confirm that only TRAF1, TRAF2 and TRAF 3 were able to bind to TNFR2. We therefore aimed to identify which region of the receptor might be involved in the binding to the other TRAF proteins. For that purpose we carried out immunoprecipitation assays as described above to measure TRAF1, TRAF2 or TRAF3 binding to TNFR2 mutant receptors containing different deletions in the intracellular region. As expected, TRAF2 binding was obliterated in receptors in which both TRAF binding sites were deleted (IPs with receptors TNFR2-Δ379 and TNFR2-Δ343) (Fig. 2B). TRAF2 bound to receptors containing either one of the two binding

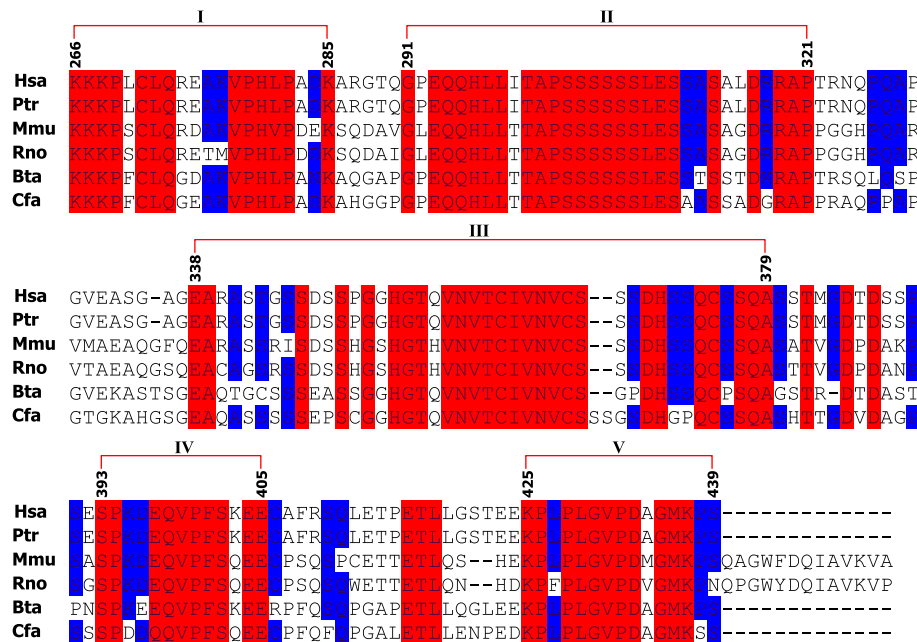


Fig. 1. Alignment of amino acid sequences of TNFR2 intracellular regions from various species. Sequences presented are that of *Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus* and *Canis familiaris*. Human TNFR2 is a transmembrane protein of 439 amino acids of which the first 235 amino acids form the extracellular region and the last 174 amino acids constitute the intracellular region. All the other receptors are smaller proteins although they present a high degree of identity within the intracellular region with the human receptor. Thus, amino acids in red boxes represent 100% identity and amino acids in blue boxes represent 80% identity. All receptors show five highly conserved regions. Conserved modules I (amino acids 266–285) and II (amino acids 291–321) are of unknown function. Conserved module III (amino acids 338–379) includes the amino acids responsible for inducing TRAF2 degradation. Conserved module IV (amino acids 393–405) includes the first known TRAF binding site (comprising amino acids 402–405). Finally, conserved module V (amino acids 425–439) includes the most carboxy terminal TRAF binding site comprising amino acids 425–427. Numbers refer to amino acid residues in the human sequence.

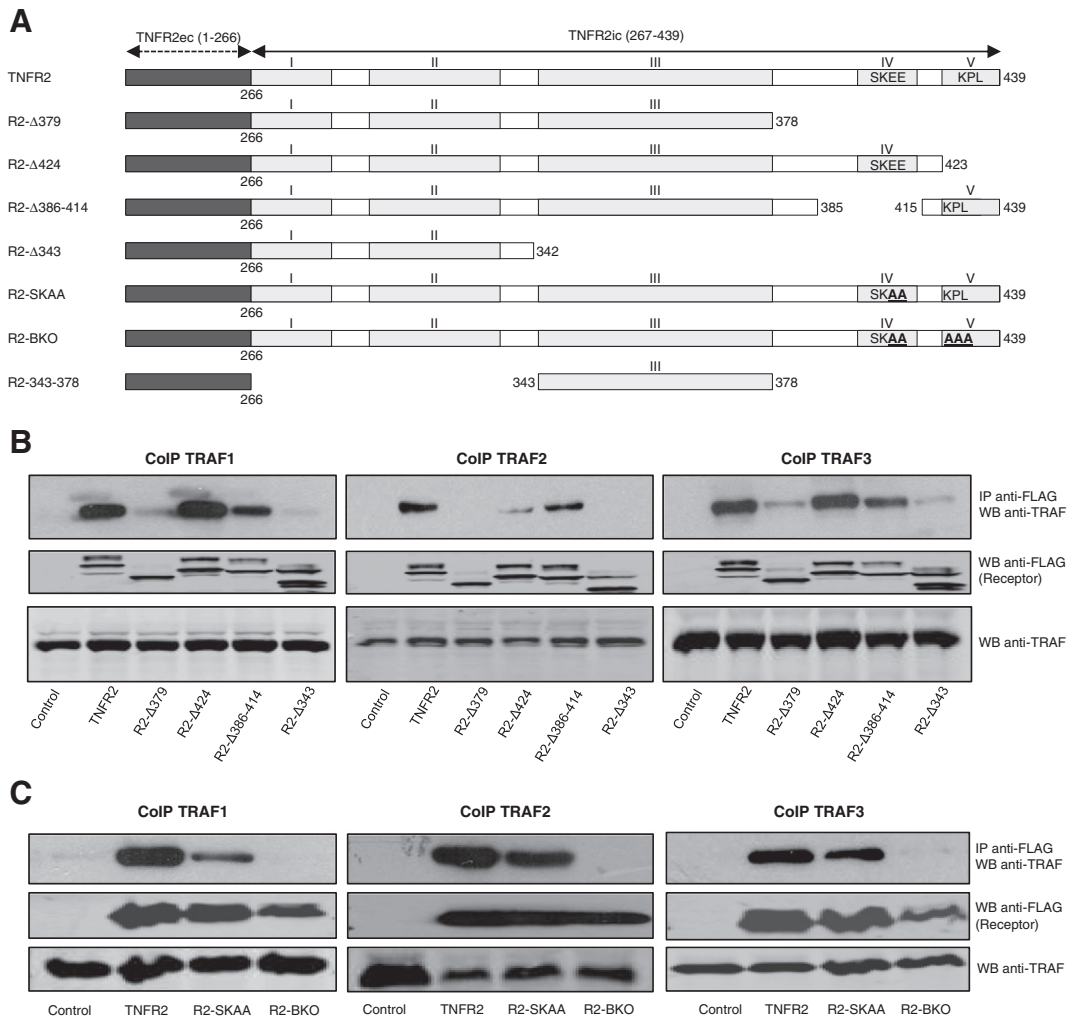


Fig. 2. Interaction of TNFR2 with TRAF1, TRAF2 and TRAF3. A) Schematic representation of TNFR2 and its deletions or mutations used in the present work. Extracellular and transmembrane regions of each receptor are presented in black while the intracellular regions are shown as light gray boxes. Both TRAF2 binding sites (amino acids 402–405 and 425–427) and the region involved in TRAF2 degradation (amino acids 338–379) are shown. Numbers indicate the amino acid position in the full-length human receptor. In mutant receptors, the most C-terminal residues are indicated. Underlined bold letters indicate mutated amino acids. B–C) Coimmunoprecipitation assay of wild type TNFR2 or mutant receptors together with TRAF1, TRAF2 or TRAF3. HEK293 cells were transfected with 1 μg of the plasmids encoding for the different receptors indicated, together with 0.5 μg of pTRAF1 (left panels), pTRAF2 (center panels) or pTRAF3 (right panels). Twenty-four hours after transfection, cells were harvested and the cell extract immunoprecipitated with anti-FLAG (anti-receptor) antibody followed by a Western blot assay using anti-TRAF1, anti-TRAF2 or anti-TRAF3 antibodies as indicated. In all cases the expression of the receptors and the adaptor proteins were also analyzed.

sites described (IPs with receptors TNFR2-Δ386-414 or TNFR2-Δ424). As for TRAF1 and TRAF3, the binding of both was also obliterated in receptors in which both TRAF binding sites were deleted. Similar to what occurs with TRAF2, TRAF1 and TRAF3 bound to receptors containing one of the two binding sites (Fig. 2B). To further test this function we also analyzed mutant receptors containing point mutations in one or both of the binding sites. For this purpose we transfected HEK293 cells with plasmids encoding TNFR2, TNFR2-SKAA (receptor in which the canonical TRAF binding site has been mutated) or TNFR2-BKO (receptor with both TRAF2 binding sites mutated) together with plasmids encoding for TRAF1, TRAF2 or TRAF3. Immunoprecipitation assays revealed that mutation of amino acids 425–KPL-427 and 402-SKEE-405 (immunoprecipitation with receptor TNFR2-BKO), completely blocks TRAF2 interaction with the receptor (Fig. 2C). As shown in Fig. 2C mutation of residues 402-SKEE-405 only (immunoprecipitation with receptor TNFR2-SKAA) does not block TNFR2 interaction with TRAF1, TRAF2 or TRAF3, something that is only achieved when amino acids 425–KPL-427 are also mutated. These results show that TRAF1, TRAF2 and TRAF3 interact with TNFR2 through the two above mentioned regions of the receptor. Thus, interaction of TNFR2 with TRAF1, TRAF2 and TRAF3 involves the same amino acids of the receptor.

3.2. TRAF2 is a positive regulator and TRAF1 and TRAF3 are negative regulators of TNFR2-triggered NF-κB activation

Once the ability of TRAF1, TRAF2 and TRAF3 to interact with TNFR2 through the same two binding sites on the intracellular region of the receptor was shown, we focused on the study of the effect of these adaptor proteins on TNFR2 signaling. We have specifically investigated NF-κB and JNK activation. To study the effect of TRAF proteins on NF-κB activation, we first transfected HEK293 cells with expression plasmids coding for TNFR2 or TNFR1 (as a positive control) together with the plasmids encoding for TRAF1, TRAF2 or TRAF3. Cells transfected with pTNFR1 were also transfected with pCRMA to inhibit cell death induced by the receptor. The results in Fig. 3A show that TRAF1 and TRAF3 expression have an inhibitory effect on TNFR2-dependent NF-κB activation while TRAF2 has a positive effect (right panel). No significant effect of TRAF proteins was observed on TNFR1-dependent NF-κB activation (left panel). It is interesting that TRAF2 overexpression in the absence of ectopic receptor activates NF-κB to a certain extent. TRAF1 and TRAF3 expressions by themselves have no effect on NF-κB activation. When TRAF protein expression was analyzed it was confirmed that TNFR2 induces TRAF2 degradation, indicating that the signal termination mechanism

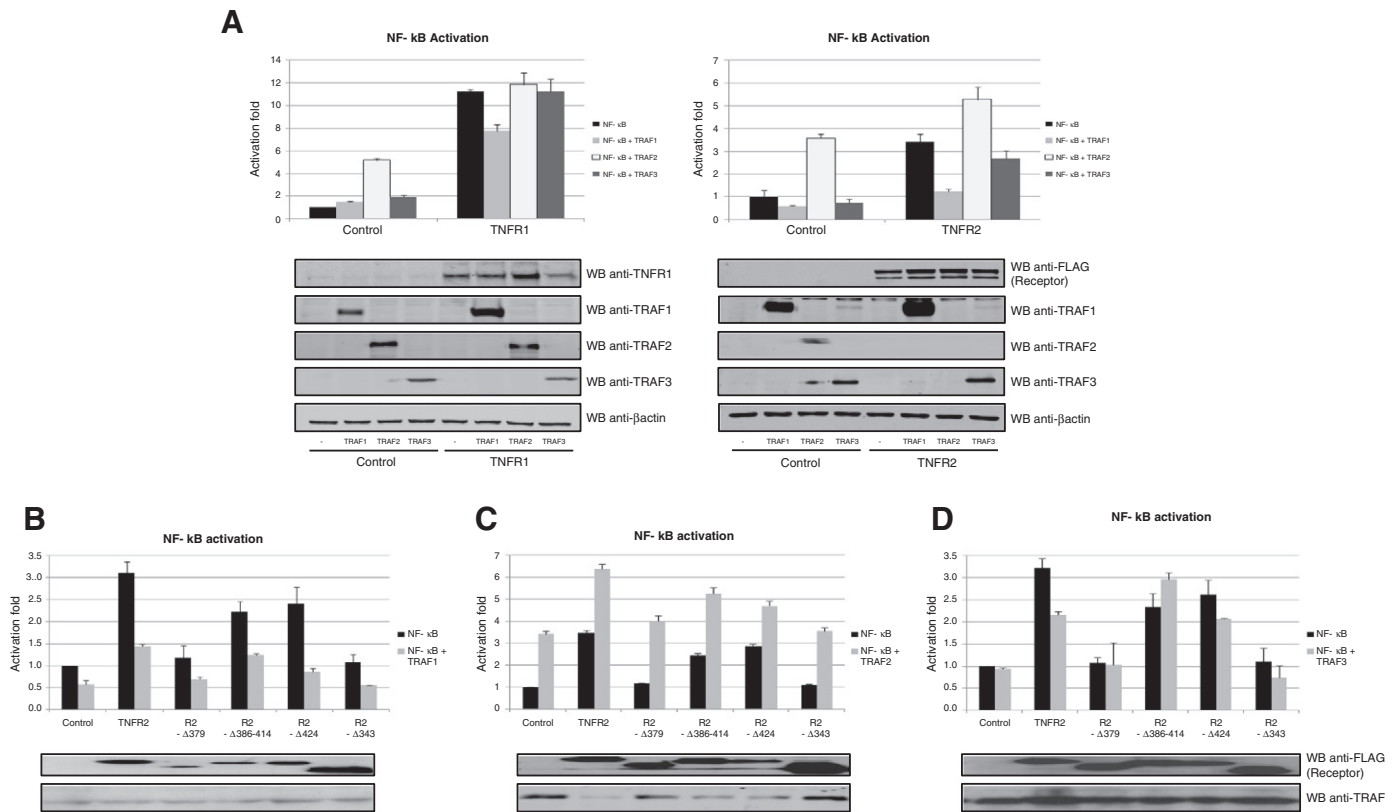


Fig. 3. Effect of TRAF1, TRAF2 and TRAF3 on NF-κB activation by TNFR2 or its mutants. A) Analysis of TNFR1 and TNFR2 activation of NF-κB in the presence of TRAF1, TRAF2 or TRAF3. HEK293 cells were transfected with 1 μg of the expression plasmids encoding for TNFR1 or TNFR2 and with 0.5 μg of pTRAF1, pTRAF2 or pTRAF3 together with 0.5 μg of pNF-κB-luc and 0.5 μg of pRL-TK. Forty-eight hours later both luciferase activities were determined as described in [Materials and methods](#). Expressions of the receptors (anti-FLAG) and the adaptor proteins (anti-TRAF1, anti-TRAF2 or anti-TRAF3) were also determined by Western blot. B–D) Analysis of NF-κB activation by different TNFR2 mutants in the presence of TRAF1 (B), TRAF2 (C) or TRAF3 (D). HEK293 cells were transfected and NF-κB activity was determined as in A.

[20] was operating. As shown above, TNFR2 interacts with TRAF1, TRAF2 and TRAF3 through two well defined regions on the receptor. We therefore aimed at studying the effect of the adaptor proteins on NF-κB activation when binding to each of the two sites occurs independently. For this purpose, we studied the ability of different TNFR2 mutants to activate NF-κB in the presence of TRAF1, TRAF2 or TRAF3 (Fig. 3B, C and D). As expected, mutant receptors lacking the two binding sites (TNFR2-Δ379 and TNFR2-Δ343) have lost their ability to activate NF-κB. Receptors containing either of the two TRAF binding sites (TNFR2-Δ386–414 or TNFR2-Δ424) are still able to activate NF-κB although to a lesser extent than wild type TNFR2. TRAF1 expression maintained its inhibitory role on NF-κB activation regardless of which TRAF binding site was operative (Fig. 3B). As for TRAF2, its expression increased NF-κB activation by wild type TNFR2 and also by receptors containing either one of the two TRAF binding sites (Fig. 3C). Once again, analysis of the intracellular levels of TRAF proteins showed that as long as the receptor contains residues 343–349 within module III, TRAF2 protein is eventually degraded and that this mechanism to terminate signaling does not affect TRAF1 or TRAF3. As for the effect of TRAF3, its expression inhibits the ability of TNFR2 to activate NF-κB. The inhibition also occurs when TRAF3 was co-expressed with the receptor lacking the most carboxy terminal TRAF binding site (TNFR2-Δ424). However, TRAF3 did not affect TNFR2-Δ386–414 (a receptor lacking the canonical TRAF binding site 402-SKEE-405 but maintaining the most C-terminal TRAF binding site) (Fig. 3D).

3.3. JNK activation is positively regulated by TRAF2 and negatively regulated by TRAF1 and TRAF3

It is known that TNFR2 has the ability to induce the activation of the transcription factor AP-1 [23], a process which is mediated by JNK and

has been suggested to be TRAF2-dependent. Since the results on NF-κB activation indicated different roles for TRAF proteins we aimed at studying their role on JNK activation. For this purpose we analyzed c-Jun phosphorylation by cell extracts obtained from cells expressing TNFR2 together with TRAF proteins. HEK293 cells were transfected with expression plasmids encoding for TNFR2 together with plasmids encoding for TRAF1, TRAF2 or TRAF3 and the plasmid pHA-JNK which encodes HA tagged JNK. As shown in Fig. 4, both TRAF1 and TRAF3 inhibit TNFR2-dependent JNK activation. On the other hand, TRAF2 co-expression with the receptor potentiates this activity. As is the case for NF-κB activation (see above) TRAF2 over-expression in the absence of an ectopic also activates JNK. TRAF1 and TRAF3 expressions by themselves have no significant effect on JNK activation. Once again, when TRAF proteins were analyzed it was shown that TRAF2 was eventually degraded, indicating that JNK activation took place before the transducing protein was degraded or else that there is an additional mechanism for JNK activation that is TRAF2 independent.

3.4. JNK activation by TNFR2 may also occur in a TRAF2 independent fashion

TNFR2 is known to be able to induce NF-κB and JNK activation in a TRAF2-dependent fashion. Our previous studies have identified two receptor regions related to TRAF2 in TNFR2: i) a new TRAF binding site and ii) a region within module III (amino acids 338–379) which is responsible for inducing TRAF2 degradation [20]. We have therefore explored if these regions could also be modulating the ability of the receptor to activate JNK. We first analyzed JNK activation as a function of receptor concentration. For this purpose, HEK293 cells were transfected with increasing amounts of pTNFR2 together with pHA-JNK and c-Jun

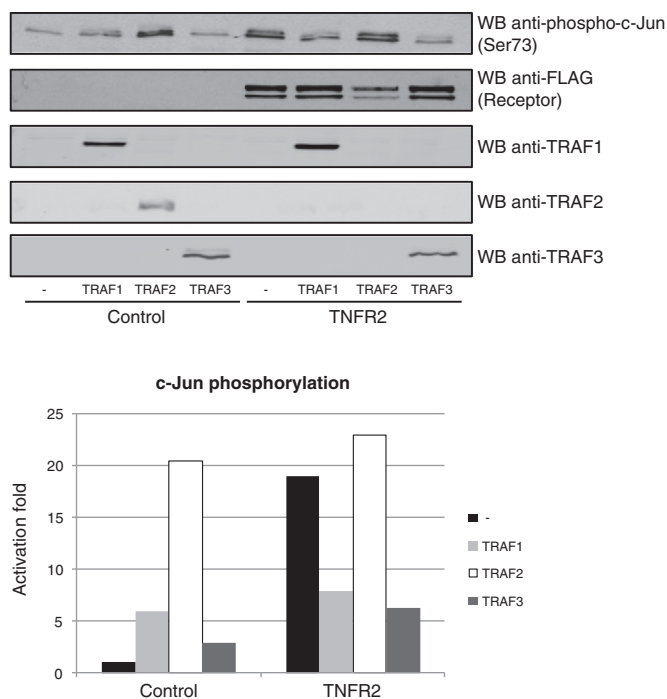


Fig. 4. Effect of TRAF1, TRAF2 and TRAF3 on JNK activation by TNFR2. HEK293 cells were transfected with 1 μ g of the expression plasmid encoding for TNFR2 and with 0.5 μ g of pTRAF1, pTRAF2 or pTRAF3 together with 1 μ g of the plasmid pHA-JNK. After 48 h, cells were harvested, JNK was immunoprecipitated and an *in vitro* c-Jun phosphorylation assay was performed as described in *Materials and methods*. The amount of phospho c-Jun was determined using an anti-phospho-c-Jun (Ser 73) antibody (upper panel) and quantified by densitometry (lower panel). The expressions of the receptor and the adaptor proteins were also analyzed by Western blot.

phosphorylation was assayed. As shown in Fig. 5A, c-Jun phosphorylation increases with the amount of the expressed receptor. This is opposite to what happens when NF- κ B activation is assayed, in which case a biphasic activation is observed. This biphasic activation has been shown to be dependent on TRAF2 intracellular levels which decrease at high TNFR2 concentrations [20] and suggests that JNK activation may take place independently of TRAF2. To further test this hypothesis, we analyzed JNK activation in HEK293 cells expressing TNFR2-BKO, a TNFR2 mutant unable to bind TRAF2. As shown in Fig. 5B, this mutant receptor retains its ability to activate JNK although to a lesser extent than the wild type receptor. Similar results were obtained when expressing the mutant receptor TNFR2-343–378, a receptor in which the intracellular region only comprises amino acids 343–378 which includes the region responsible for the induction of TRAF2 degradation and that does not contain any of the two TRAF binding sites. This receptor is still able to induce a partial JNK activation (Fig. 5C), indicating that this region 343–378 is implicated in JNK activation by TNFR2 and that this activity does not require TRAF2 binding to the receptor. We next focused on the possible identification of residues in region 343–378 which may be responsible of this activity. We have extensively studied this because this region is responsible for inducing TRAF2 degradation [20,34]. The region contains 11 serine residues with a high score for phosphorylation susceptibility. Of these residues, 345-SS-346 and 348-SS-349 appear essential for inducing TRAF2 degradation [20]. Mutant receptors TNFR2-BKO-AAD, TNFR2 BKO-DAA and TNFR2-BKO-AAQ which are unable to bind TRAF2 and in which serine residues 345–346, 348–349 and 376–377 respectively have been mutated were all able to induce JNK activation, therefore in a TRAF2-binding independent fashion (Fig. 5D). These results indicate that the conserved module 338–379 is implicated in both TRAF2 degradation and in JNK activation and that point mutations in this module do not significantly affect the ability of the receptor to activate JNK.

3.5. Only TRAF2 is efficiently degraded by TNFR2. TNFR1 has no effect on TRAF proteins degradation

TRAF2 depletion induced by TNFR2 plays an important role in the regulation of the receptor signaling [20,34,35]. The results shown above indicate that both TRAF1 and TRAF3 play a role in TNFR2 signaling and we therefore wondered if TNFR2 activation could affect the intracellular concentrations of these two adaptor proteins as well. To test this, we transfected HEK293 cells with the plasmid encoding for either TRAF1 or TRAF3 together with increasing amounts of the plasmids encoding for TNFR2 or TNFR1 to compare the effect of each TNF receptor on the intracellular levels of these adaptor proteins. As a control, we checked the effect of TNFR1 and TNFR2 on TRAF2 intracellular concentration knowing that TNFR2 but not TNFR1 induced TRAF2 degradation (Fig. 6A).

When analyzing the intracellular concentrations of TRAF1 in the presence of increasing amounts of TNFR1 or TNFR2 it was observed that neither receptor induced the degradation of this adaptor protein (Fig. 6B). When analyzing the levels of TRAF3 in the presence of increasing amounts of receptors it was observed that TNFR1 did not affect TRAF3 levels (Fig. 6C, upper panel) while only the highest TNFR2 concentration induced a slight degradation (Fig. 6C, lower panel). Thus, TNFR1 does not affect the intracellular levels of TRAF1, TRAF2 or TRAF3 while TNFR2 induces degradation of TRAF2 and to a lesser extent of TRAF3.

3.6. TRAF1 inhibits TNFR2-induced TRAF2 degradation

TRAF proteins are known for their ability to interact with each other, leading to the formation of homo- or heterotrimeric complexes [29,36]. Thus, we aimed at studying the possible effect of TRAF1 or TRAF3 on TRAF2 degradation because of this interaction. To test this, HEK293 cells were transfected with plasmids encoding for TRAF2 and TNFR2 together with increasing amounts of plasmids encoding for TRAF1 or TRAF3. We observed that TRAF1 overexpression blocks the ability of TNFR2 to induce TRAF2 degradation (Fig. 7A) while TRAF3 overexpression does not affect this TNFR2 activity (Fig. 7B). We next aimed to determine the role of TRAF1 interaction with TNFR2 on the inhibition of TRAF2 degradation. To test this, HEK293 cells were transfected with a plasmid encoding for TRAF2 together with a plasmid encoding for a mutant TNFR2 receptor in which both TRAF binding sites have been mutated (TNFR2-BKO), together with increasing amounts of a plasmid encoding for TRAF1 and the intracellular levels of TRAF2 were analyzed. As shown in Fig. 7C, TRAF1 overexpression still blocks TRAF2 degradation by TNFR2-BKO, even though there is no binding of the adaptor protein to this receptor. These results indicate that TRAF1 does not require interaction with TNFR2 to block the ability of the receptor to induce TRAF2 degradation, suggesting that there is a receptor-independent event in which the two transducing proteins are involved.

4. Discussion

Since TNFR1 and TNFR2 were identified [28], multiple studies have been carried out on their functional and structural characterization. While TNFR1 has been extensively characterized, the biological functions of TNFR2 have remained elusive. TNFR2 was originally found to induce antiapoptotic reactions. However, several studies have shown its ability to increase TNFR1 cytotoxicity due to its ability to induce TRAF2 degradation [20,35]. It has been considered that the biological role of TNFR2 relies on its interaction with TRAF2 [37], although other adaptor proteins such as TRAF1, TRAF3, cIAP1 and cIAP2 have also been implicated in its signaling. The precise role of TRAF proteins on TNFR2 signaling has been quite controversial. Thus, we aimed to better characterize the interaction of TRAF proteins with TNFR2 and their functional consequences.

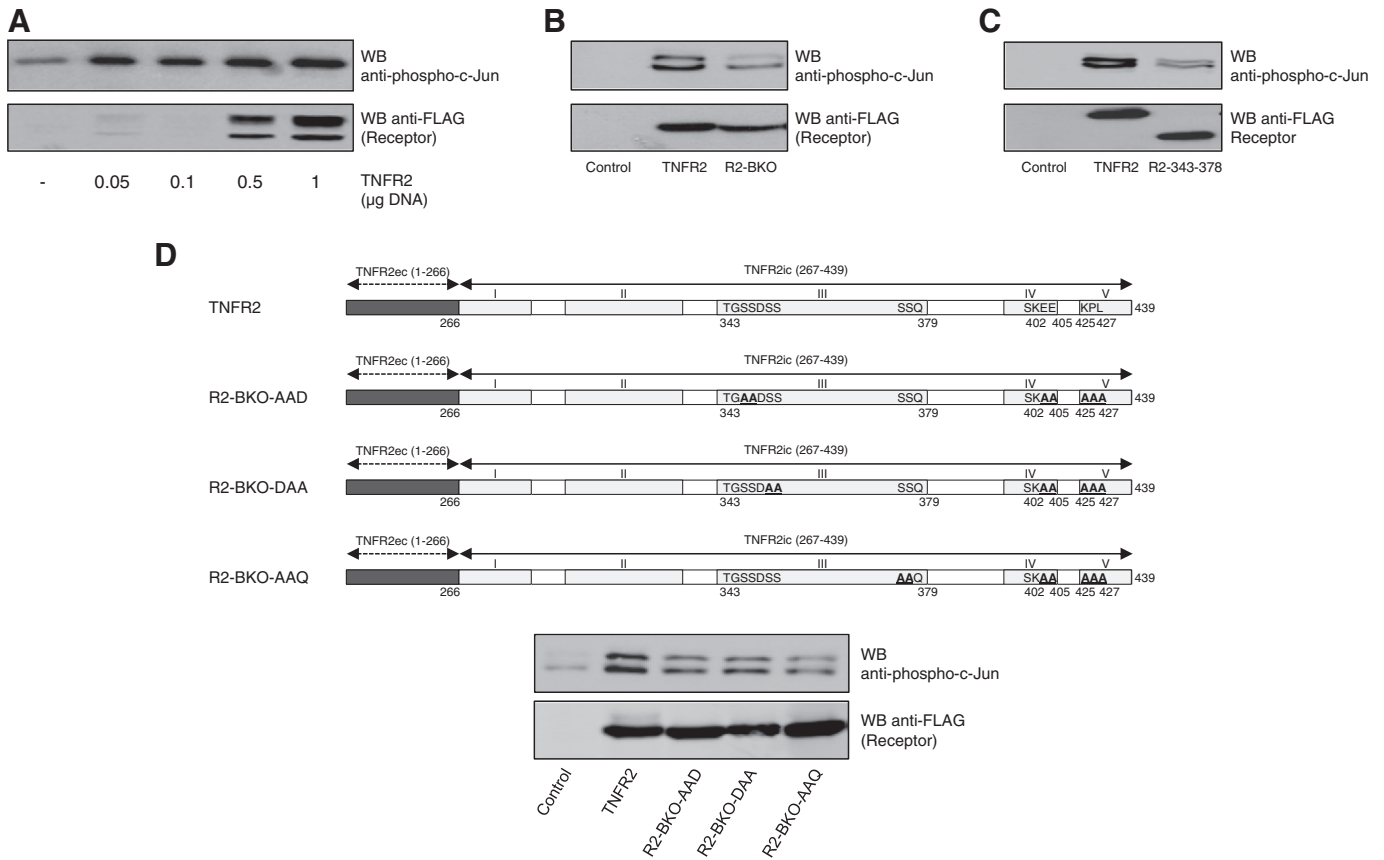


Fig. 5. JNK activation by wild type TNFR2 or its mutants. A) Analysis of c-Jun phosphorylation by TNFR2. HEK293 cells were transfected with the indicated amounts of the expression plasmid coding for TNFR2 and with 1 µg of the plasmid pHA-JNK. After 48 h, c-Jun phosphorylation was determined as in Fig. 4. The expression of the receptor was also analyzed by Western blot. B–C) Analysis of JNK activation by TNFR2 receptors unable to bind TRAF2. HEK293 cells were transfected with 1 µg of the expression plasmid coding for TNFR2, TNFR2-BKO (B) or TNFR2-343–378 (C) and with 1 µg of pHA-JNK. c-Jun phosphorylation was determined as in A. D) JNK activation by TNFR2 receptors with point mutations in regions III, IV and V. Receptors used in this assay are depicted in the upper panel. The presentation of the receptors is as described in Fig. 2A. HEK293 cells were transfected with 1 µg of the expression plasmids coding for the indicated receptors and with 1 µg of pHA-JNK. c-Jun phosphorylation was determined as in A.

Both immunoprecipitation and pull down assays (Fig. 2) show that TNFR2 interacts with TRAF1, TRAF2 and TRAF3. It was first shown that TRAF2 binding to TNFR2 occurs through amino acids 402-SKEE-405 of the receptor. Recently, we have shown that TNFR2 also binds TRAF2 through a second site located at a conserved sequence in the C-terminal

region of the receptor [20]. We therefore studied whether TRAF1 and TRAF3 were also able to bind to the new binding site. The results shown in Fig. 2 demonstrate that both binding sites are functional and that both binding sites interact with TRAF1, TRAF2 and TRAF3. As for the canonical TRAF binding site, it appears that TRAF2 binds directly to

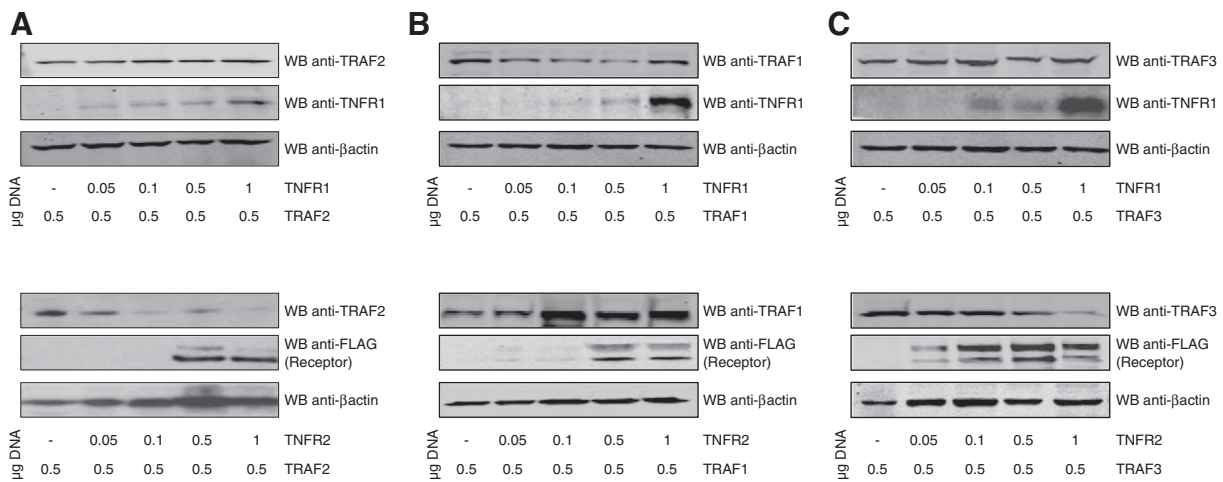


Fig. 6. Degradation of TRAF proteins by TNF receptors. HEK293 cells were transfected with the indicated amounts of the plasmids coding for TNFR1 (upper panels) or TNFR2 (lower panels) and with 0.5 µg of pTRAF2 (A), pTRAF1 (B) or pTRAF3 (C). Forty-eight hours later cells were harvested and the intracellular level of the adaptor proteins was determined by Western-blot assays with anti TRAF1, anti TRAF2 or anti TRAF3 antibodies as indicated. The expression of the receptors was also analyzed by Western blot.

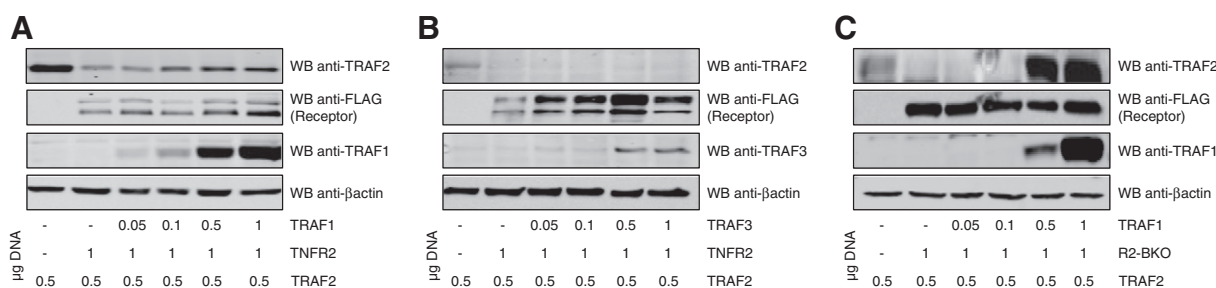


Fig. 7. Inhibition of TNFR2-induced TRAF2 degradation by TRAF1. HEK293 cells were transfected with 1 μ g of the plasmid coding for TNFR2 together with 0.5 μ g of pTRAF2 and with increasing amounts of the plasmids pTRAF1 (A) or pTRAF3 (B) as indicated. Forty-eight hours later, cells were harvested and the intracellular level of TRAF2 was determined by Western blot. The expression of the receptor and that of the adaptor proteins was also analyzed by Western blot. C) The inhibition of TRAF2 degradation by TRAF1 does not require binding to the receptor. HEK293 cells were transfected with 1 μ g of the plasmid coding for TNFR2-BKO together with 0.5 μ g of pTRAF2 and with increasing amounts of the plasmid pTRAF1 as indicated. Forty-eight hours later, cells were harvested and the intracellular level of TRAF2 was determined by Western blot. The expression of the receptor and that of TRAF1 were also analyzed by Western blot.

the receptor while TRAF1 binds both directly or through TRAF2 [37]. TRAF3 appears to bind only through TRAF2 [29]. Our results suggest that the second binding site binds directly TRAF1, TRAF2 and TRAF3 (Fig. 2) although we cannot rule out that a small amount of endogenous TRAF2 could act as a binding intermediary for TRAF1 and TRAF3 binding.

The role of TRAF2 in NF- κ B activation by TNFR1 and TNFR2 [20,38] and in apoptosis inhibition [39] is well known. The role of TRAF1 and TRAF3 in TNFR2 signaling is not so well known. In this study we show that both TRAF1 and TRAF3 inhibit TNFR2 signaling while TRAF2 is a positive regulator. The inhibitory role of TRAF1 may be due to its ability to form heterotrimers with TRAF2 [36,37]. This could result in the inhibition of the classical NF- κ B activation pathway [40] and, therefore, in apoptosis activation [26,27,41]. However, it has also been suggested that TRAF1 may have a stimulatory role in NF- κ B activation [26]. These contrary roles may be explained because of the ability of TRAF1 to interact with IKK β and also because TRAF1 is a target gene of NF- κ B [42]. Thus, it is conceivable that at low TRAF1 concentrations NF- κ B activity is potentiated. Under these conditions TRAF1 would interact preferentially with TRAF2. At high TRAF1 concentrations (as happens in our experimental conditions) TRAF1 would interact with IKK β to limit NF- κ B activation [43]. This would occur regardless of the binding site involved. Also, it should be taken into account that TRAF1 inhibits TRAF2 degradation (Fig. 7), an activity that may also influence the apoptosis–antiapoptosis equilibrium [34]. A different scenario appears in relation to TRAF3. TRAF3 has been suggested to act as an inhibitor of TRAF2/5 mediated NF- κ B activation by CD40 [44]. In our hands, however, when TRAF3 was overexpressed with receptor TNFR2- Δ 424 (which only presents the canonical TRAF binding site) an inhibition of NF- κ B activity was observed. On the other hand, when TRAF3 was overexpressed with receptor TNFR2- Δ 386–414 (which only contains the most C-terminal TRAF binding site) a lack of inhibition, or even a small activation, of NF- κ B activity was observed (Fig. 3). This suggests that the interaction of TRAF3 with TNFR2 may have different biological consequences depending on the binding site involved. TRAF3 appears to have no regulatory role on TRAF2 degradation indicating that its regulatory role relies only on NF- κ B activation. The complexity of these biological responses may also be related to the fact that TNFR2 has been shown to activate both the classic [45] and the alternative pathways of NF- κ B activation [31]. We have tested the ability of TNFR2 to induce degradation of TRAF proteins. Of the three TRAF proteins tested only TRAF2 is efficiently degraded. TRAF3 is partially degraded only at high concentration of the receptor (Fig. 6). It is interesting that TRAF1, but not TRAF3, appears to have a regulatory role in TNFR2-induced TRAF2 degradation and that this activity of TRAF1 appears to be independent of its binding to the receptor (Fig. 7). Since TRAF1 and TRAF2 may form heterotrimers and also form a complex with the ubiquitin ligases cIAP1 and cIAP2, it could be possible that TRAF1 expression blocks the E3 ligase activity of the cIAPs thus inhibiting TRAF2 degradation.

It was considered that TRAF2 interaction with TNFR2 is the first essential step in the biological signaling triggered by the receptor. However, the functional analysis of the receptors TNFR2-BKO and TNFR2-343–378 (which are unable to bind TRAF2) has shown that these receptors are still able to induce c-Jun phosphorylation (Fig. 5), suggesting that an additional, TRAF2-independent, mechanism operates for JNK activation. This finding confirms that of Ji et al. [46] who found that deletion of TRAF2 binding sites diminished TNFR2-mediated NF- κ B but not JNK activation. We have found that conserved module III (amino acids 338–379) is responsible for this activation since the receptor TNFR2-343–378 (a receptor whose intracellular region comprises only amino acids 343 to 378) is still able to induce c-Jun phosphorylation in spite of the fact that it contains no TRAF2 binding sites. This module III also contains the amino acids responsible for the induction of TRAF2 degradation by the receptor. Opposite to what occurs for the induction of TRAF2 degradation in which serine residues 345–346 or 348–349 appear essential [20], point mutations of serine pairs have no effect on JNK activation (Fig. 5). Interestingly, amino acids 338–355 within this region have been shown to be involved in the interaction with ASK1 interacting protein 1 (AIP1), an adaptor molecule mediating JNK but not NF- κ B activation [46].

In most cell types, JNK activation by TNF takes place with no significant induction of cell death, as TNF is only able to induce a transient activation of the kinase as compared to that induced by UV light [47]. Thus, in order to induce cell death JNK is required to be activated continuously, as may happen after NF- κ B inhibition. It seems that a close link between NF- κ B and JNK takes place through HSP70 and TRAF2 to induce apoptosis [48]. In fact, when NF- κ B is functionally activated, JNK activation exerts a proliferative effect [1]. After ASK1 inactivation, NF- κ B inhibits reactive oxygen species (ROS) accumulation [49], ROS being involved in cell death induction by TNF [50]. The activation of JNK by TNFRs is biphasic, with a transient activation controlled by TRAF2 followed by a permanent activation which is TRAF2 independent but related to ROS levels. Thus, it is likely that the initial interaction of TRAF2 with TNFR2 after receptor trimerization results in both NF- κ B and JNK activation leading to proliferation signals. Then, TNFR2 induces TRAF2 degradation leading to NF- κ B inhibition of and also limiting TRAF2 dependent JNK activation. Since TNFR2 is also able to activate JNK in a TRAF2 independent fashion, this signal will remain after TRAF2 depletion, which in the context of NF- κ B inhibition leads to cell death mediated by caspases and ROS in a cell type-specific manner [51]. The induction of cell death after prolonged JNK activation may be crucial for TNFR1-independent cell death induction mediated by TNFR2 in some cell types [52] which is enhanced after inhibition of caspases [53].

In conclusion, our results point to a key role for TRAF proteins in TNFR2 signaling but they also show the ability of the receptor to activate other TRAF-independent pathways in which the conserved module 338–379 has a principal function.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.08.011>.

Conflict of interest statement

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

Work at the authors' laboratory was supported by Grant SAF2009-07227 from the Spanish Ministry of Science and Technology (MICINN) and by Grant IB09-066 from the Plan Regional de Ciencia y Tecnología del Principado de Asturias (PCTI). LCH, NA, JI, LU and MAP were recipients of fellowships from the PCTI. The IUOPA is supported by Obra Social Cajastur. We thank Dr. Kevin P. Dalton for critical reading of the manuscript.

References

- [1] B.B. Aggarwal, S. Shishodia, K. Ashikawa, A.C. Bharti, *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 1 (2002) 327–341.
- [2] R.M. Locksley, N. Killeen, M.J. Lenardo, *Cell* 104 (2001) 487–501.
- [3] D. Hanahan, R.A. Weinberg, *Cell* 144 (2011) 646–674.
- [4] X. Lu, C.N. Qian, Y.G. Mu, N.W. Li, S. Li, H.B. Zhang, S.W. Li, F.L. Wang, X. Guo, Y.Q. Xiang, *Eur. J. Cancer* 47 (2011) 339–346.
- [5] R. Montesano, P. Soulie, J.A. Eble, F. Carrozzino, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 3487–3500.
- [6] L.B. Nabors, E. Suswam, Y. Huang, X. Yang, M.J. Johnson, P.H. King, *Cancer Res.* 63 (2003) 4181–4187.
- [7] L. Wang, M. Chopp, H. Teng, M. Bolz, M.A. Francisco, D.M. Aluigi, X. Li Wang, R.L. Zhang, S. Christensen, T.N. Sager, A. Szalad, Z.G. Zhang, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31 (2011) 640–647.
- [8] A.M. Eggermont, J.H. de Wilt, T.L. ten Hagen, *Lancet Oncol.* 4 (2003) 429–437.
- [9] D.J. Grunhagen, J.H. de Wilt, W.J. Graveland, A.N. van Geel, A.M. Eggermont, *Cancer* 106 (2006) 156–162.
- [10] J.L. Bodmer, P. Schneider, J. Tschopp, *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 19–26.
- [11] P.W. Dempsey, S.E. Doyle, J.Q. He, G. Cheng, *Cytokine Growth Factor Rev.* 14 (2003) 193–209.
- [12] G.D. Wiens, G.W. Glenney, *Dev. Comp. Immunol.* 35 (2011) 1324–1335.
- [13] J.R. Bradley, J.S. Pober, *Oncogene* 20 (2001) 6482–6491.
- [14] J.Y. Chung, Y.C. Park, H. Ye, H. Wu, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 679–688.
- [15] P. Xie, *J. Mol. Signal.* 8 (2013) 7.
- [16] H. Hsu, J. Xiong, D.V. Goeddel, *Cell* 81 (1995) 495–504.
- [17] G. Natoli, A. Costanzo, A. Ianni, D.J. Templeton, J.R. Woodgett, C. Balsano, M. Levrero, *Science* 275 (1997) 200–203.
- [18] H. Ha, D. Han, Y. Choi, *Curr. Protoc. Immunol.* (2009) (Chapter 11: Unit11 19D).
- [19] H. Hacker, P.H. Tseng, M. Karin, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 457–468.
- [20] M. Rodriguez, L. Cabal-Hierro, M.T. Carcedo, J.M. Iglesias, N. Artime, B.G. Darnay, P.S. Lazo, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 22814–22824.
- [21] Y.C. Park, V. Burkitt, A.R. Villa, L. Tong, H. Wu, *Nature* 398 (1999) 533–538.
- [22] H. Walczak, *Immunol. Rev.* 244 (2011) 9–28.
- [23] L. Cabal-Hierro, P.S. Lazo, *Cell. Signal.* 24 (2012) 1297–1305.
- [24] B.G. Darnay, V. Haridas, J. Ni, P.A. Moore, B.B. Aggarwal, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 20551–20555.
- [25] M. Rothe, V. Sarma, V.M. Dixit, D.V. Goeddel, *Science* 269 (1995) 1424–1427.
- [26] J.R. Arron, Y. Pewzner-Jung, M.C. Walsh, T. Kobayashi, Y. Choi, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 923–934.
- [27] I. Carpentier, R. Beyaert, *FEBS Lett.* 460 (1999) 246–250.
- [28] M. Brockhaus, H.J. Schoenfeld, E.J. Schlaeger, W. Hunziker, W. Lesslauer, H. Loetscher, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 3127–3131.
- [29] L. He, A.C. Grammer, X. Wu, P.E. Lipsky, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 55855–55865.
- [30] A.P. Grech, S. Gardam, T. Chan, R. Quinn, R. Gonzales, A. Basten, R. Brink, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 31572–31581.
- [31] H. Rauer, A. Wicovsky, N. Muller, D. Siegmund, V. Spindler, J. Waschke, C. Kneitz, H. Wajant, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 7394–7404.
- [32] V. Kedinger, M.C. Rio, *Adv. Exp. Med. Biol.* 597 (2007) 60–71.
- [33] T. Zotti, P. Vito, R. Stilo, *J. Cell. Physiol.* 227 (2012) 1280–1284.
- [34] L. Cabal-Hierro, N. Artime, J. Iglesias, M.A. Prado, L. Ugarte-Gil, P. Casado, B. Fernandez-Garcia, B.G. Darnay, P.S. Lazo, *Oncotarget* 5 (2014) 224–236.
- [35] M. Fotin-Mlecsek, F. Henkler, D. Samel, M. Reichwein, A. Hausser, I. Parmryd, P. Scheurich, J.A. Schmid, H. Wajant, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 2757–2770.
- [36] C. Zheng, V. Kabaleeswaran, Y. Wang, G. Cheng, H. Wu, *Mol. Cell* 38 (2010) 101–113.
- [37] M. Rothe, S.C. Wong, W.J. Henzel, D.V. Goeddel, *Cell* 78 (1994) 681–692.
- [38] J.E. Vince, D. Pantaki, R. Feltham, P.D. Mace, S.M. Cordier, A.C. Schmukle, A.J. Davidson, B.A. Callus, W.W. Wong, I.E. Gentle, H. Carter, E.F. Lee, H. Walczak, C.L. Day, D.L. Vaux, J. Silke, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 35906–35915.
- [39] F. Gonzalez, D. Lawrence, B. Yang, S. Yee, R. Pitti, S. Marsters, V.C. Pham, J.P. Stephan, J. Lill, A. Ashkenazi, *Mol. Cell* 48 (2012) 888–899.
- [40] A.J. McPherson, L.M. Snell, T.W. Mak, T.H. Watts, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 23010–23019.
- [41] E. Leo, Q.L. Deveraux, C. Buchholtz, K. Welsh, S. Matsuzawa, H.R. Stennicke, G.S. Salvesen, J.C. Reed, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 8087–8093.
- [42] C.Y. Wang, M.W. Mayo, R.G. Korneluk, D.V. Goeddel, A.S. Baldwin Jr., *Science* 281 (1998) 1680–1683.
- [43] K. Sughra, A. Birbach, R. de Martin, J.A. Schmid, *PLoS ONE* 5 (2010) e12683.
- [44] J. Hauer, S. Puschner, P. Ramakrishnan, U. Simon, M. Bongers, C. Federle, H. Engelmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 2874–2879.
- [45] V.F. Shih, R. Tsui, A. Caldwell, A. Hoffmann, *Cell Res.* 21 (2011) 86–102.
- [46] W. Ji, Y. Li, T. Wan, J. Wang, H. Zhang, H. Chen, W. Min, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (2012) 2271–2279.
- [47] G. Franzoso, F. Zazzeroni, S. Papa, *Cell Death Differ.* 10 (2003) 13–15.
- [48] S. Dai, L. Jiang, G. Wang, X. Zhou, X. Wei, H. Cheng, Z. Wu, D. Wei, *J. Cell. Mol. Med.* 14 (2010) 710–725.
- [49] A. Matsuzawa, H. Nishitoh, K. Tobiume, K. Takeda, H. Ichijo, *Antioxid. Redox Signal.* 4 (2002) 415–425.
- [50] S. Sakon, X. Xue, M. Takekawa, T. Sasazuki, T. Okazaki, Y. Kojima, J.H. Piao, H. Yagita, K. Okumura, T. Doi, H. Nakano, *EMBO J.* 22 (2003) 3898–3909.
- [51] A. Wicovsky, N. Muller, N. Daryab, R. Marienfeld, C. Kneitz, S. Kavuri, M. Leverkus, B. Baumann, H. Wajant, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 2174–2183.
- [52] B. Depuydt, G. van Loo, P. Vandenaabeele, W. Declercq, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 497–504.
- [53] A. Biragyn, M. Coscia, K. Nagashima, M. Sanford, H.A. Young, P. Olkhanud, *J. Leukoc. Biol.* 83 (2008) 998–1008.

