



VNIVERSITAT
D^E VALÈNCIA

**INHIBICION DE COMPLEJOS
CDK/CICLINA EN MODELOS
CELULARES DE PATOLOGIA**

**TATIANA GUEVARA ROZO
TESIS DOCTORAL
2012**



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

INHIBICIÓN DE COMPLEJOS CDK/CICLINA EN MODELOS CELULARES DE PATOLOGIA

Tesis presentada por

Yubelly Tatiana Guevara Rozo

para optar al título de Doctora por
la Universitat de València
Programa de Doctorado en Biotecnología

Directores de Tesis

Dr. Enrique Pérez Payá

y

Dra. María del Mar Orzáez Calatayud

2012





Enrique Pérez Payá, Doctor en Ciencias Químicas, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y **María del Mar Orzáez Calatayud**, doctora en Ciencias Biológicas, Investigadora del Centro de Investigación Príncipe Felipe:

CERTIFICAN, que el presente trabajo titulado “INHIBICIÓN DE COMPLEJOS CDK/CICLINA EN MODELOS CELULARES DE PATOLOGIA” ha sido realizado por **Yubelly Tatiana Guevara Rozo**, bajo su dirección, en el centro de Investigación Príncipe Felipe, como proyecto de tesis doctoral, para optar al grado de Doctora por la Universitat de València.

Dr. Enrique Pérez Payá

**María del Mar Orzáez
Calatayud**



“El futuro pertenece a quienes creen en la belleza de sus sueños.”
Eleanor Roosevelt

La caratula de esta tesis representa la paradoja de la capacidad de inducir apoptosis y supervivencia de los inhibidores del complejo de CDK/ciclina, como TAT-NBI1. Lo cual se representa con la caída de hojas en otoño y las flores del árbol de cerezo, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

En estas páginas quiero expresar todas las emociones que me asaltan cuando, finalmente, esta etapa de mi vida va llegando a la meta. Hace 5 años atrás, nunca imagine mi vida lejos de mi amada familia y mi añorada Colombia. Sin embargo, esta oportunidad llego y decidí aceptarla. Es complicado escribir los agradecimientos, y no porque no haya gente a la que agradecer sino todo lo contrario, porque en estos cuatro años son muchas las personas que han estado ahí, ayudándome y enseñándome, compartiendo conmigo buenos y no tan buenos momentos, por lo que resulta inevitable sentir que todas las palabras que aquí pueda dedicar son pocas.

En primer lugar, me gustaría agradecer a Quique por darme la oportunidad de unirme a su grupo de investigación, por la confianza depositada en mí y por todo su apoyo. Llego a mi email: Enhorabuena!! Has conseguido la beca. En este momento comenzó esta gran experiencia en mi vida.

De la misma manera, quiero agradecer a Mar por haber confiado en mí para ser su primera estudiante predoctoral y sobre todo por haberme enseñado tantas y tantas cosas, tanto teóricas como prácticas, de lo que supone trabajar en el mundo de la ciencia, gracias por tu positivismo, sus certeros comentarios y por tener siempre las palabras indicadas en el momento indicado.

En cuanto a mis compañeros del "lab", quiero agradecer a Mareta, Mónica, Andy, Vicente, Guille, Ally, Fede, Cris de la Tower, Ainhoa y Pablo por hacer que el día a día en el lab tan agradable y ameno como lo ha sido, y ni que decir de nuestras cenas y salidas de fiesta, gracias por tantas risas, horas compartidas de cultivos, las gratas horas de almuerzo y comida, por su amistad y por todos los buenos momentos que hemos vivido.

Muchas otras personas han pasado a lo largo de estos 4 años por el I-12, mi gratitud a ellas también por que han contribuido de una u otra forma a la realización de esta tesis, y al buen ambiente que se vive. Entre ellas: Yadira, Laura, Ana, Anna, Rebe, Eliana, Rosa, Christian, Fabian, Rosa, Inma y Susana (espero no dejarme a nadie). Un vacío grande han dejado en sus pollatas, y en todos los que hemos pertenecido al I-12.

Gracias también a Ana Giménez por la síntesis de péptidos, a todo el equipo de proteómica, en especial a Vir por ayudarme con las purificaciones de ciclinas. Gracias a Vicky Moreno (I-44), al I-36 y al <todocipf> porque muchas veces me salvaron la vida prestándome reactivos varios.

Mis agradecimientos también a los laboratorios con los que he colaborado: en el proyecto GAPDH con el laboratorio del Dr. Jean-Erland Ricci, “The Mediterranean Centre for Molecular Medicine”) y en el proyecto de ciclinas con Dr. Eugenio Vázquez, (Universidad de Santiago de Compostela) y al Dr. Alberto Marina, Ph.D, (Instituto de Biomedicina de Valencia-CSIC).

De mi estancia por el laboratorio de Stem Cells and Regenerative Medicine en el Burnham Institute en San Diego, agradezco a Evan Snyder, M.D., Ph.D, por darme la oportunidad de ir a su laboratorio y Gustavo Gutiérrez, Ph.D, por enseñarme a trabajar con células madre. Y muy especialmente a Paola Bignone, Enma Navarro Perán y Tania Valencia por su ayuda y amistad, que hicieron inolvidable mi sueño americano.

Y como durante estos cuatro años no todo ha sido trabajar, me gustaría dar las gracias a las tres amigas con las que me embarque en esta aventura “a por un doctorado en España”, Diana Calderon, Diana Monsalve y Jenny Acosta. Gracias también a varios buenos amigos que he conocido durante este camino, Trini, Caro, Rich Americano, Alejo, Borja y Jaime.

Quiero dar las gracias a TODA mi familia, especialmente a Martha mi madre, primero por soportar mi ausencia, por su esfuerzo, dedicación, amor y sus palabras de ánimo en todo momento. Asimismo, dar las gracias a mi hermano Omar y mis sobrinos Sergio, Sahara y Ana por su amor y apoyo incondicional. Y bueno, de todo lo maravilloso que he conocido en España, lo mejor sin duda fue conocer a Rich England!! Mis últimas palabras son ti... muchísimas gracias por tu amor, tus detalles, por alegrarme el día a día, por tu comprensión y por haberme demostrado paciencia infinita durante la elaboración de esta tesis. Gracias por compartir mi vida y mis logros.

A todos: GRACIAS TOTALES!!!

*“A todos los que la presente vieron y entendieron”
Inicio de las Leyes Orgánicas
Juan Carlos I*

INDICE

ABREVIATURAS	VII
JUSTIFICACION	1
OBJETIVOS	3

CAPITULO 1: Inhibidores sintéticos (farmacológicos) del ciclo celular

1.1 INTRODUCCION AL CICLO CELULAR.....	6
1.1.1. Puntos de control del ciclo celular	11
1.1.1.1. Puntos de control en G1/S	11
1.1.1.2. Puntos de control de daño al DNA en G2/M	13
1.1.2. Regulación de la actividad de los complejos CDK/ciclina.....	18
1.1.2.1. Regulación de la actividad CDK por fosforilación/desfosforilación.....	18
1.1.2.2. Regulación por inhibidores naturales de CDKs (CKIs).....	20
1.1.3. Análisis genético de la función del complejo CDK/ciclina en ratones.....	22
1.1.4. Inhibidores farmacológicos de los complejos CDK/ciclina.....	25
1.1.4.1. Inhibidores competitivos de ATP.....	25
1.1.4.2. Inhibidores no competitivos de ATP.....	27
1.2 RESULTADOS.....	34
1.2.1. Caracterización de NBI1	34
1.2.2. Caracterización del sitio de unión de TAT-NBI1.....	35
1.2.3. TAT-NBI1 induce muerte celular en un panel amplio de líneas celulares.....	41
1.2.4. Internalización de NBI1 mediante liposomas	46
1.3 DISCUSION	48

CAPITULO 2: TAT-NBI1, sensibiliza células tumorales resistentes a erlotinib

2.1. INTRODUCCION.....	54
2.1.1. EGFR.....	54
2.1.1.1. Inhibidores de EGFR.....	55
2.1.1.1.1. Anticuerpos monoclonales inhibidores de EGFR (MAbs).....	57
2.1.1.1.2. Inhibidores de la actividad tirosina quinasa del EGFR.....	58
2.1.2. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR.....	62
2.1.2.1. Apoptosis.....	64
2.1.2.1.1. Vía intrínseca mitocondrial.....	67
2.1.2.1.2. Vía extrínseca.....	68
2.1.2.1.3. Reguladores de la Apoptosis.....	71
2.1.2.2. Otros complejos inductores de muerte celular.....	73
2.1.2.2.1. PIDDosoma.....	73
2.1.2.2.2. Ripoptosoma.....	74
2.1.2.3. Necrosis programada o necroptosis.....	75
2.2. RESULTADOS	80
2.2.1. Análisis de viabilidad celular en tratamientos de combinación NBI1 y erlotinib.....	80
2.2.2. Determinación del tipo de muerte celular inducida por el cotratamiento TAT-NBI1/erl.....	85

2.2.3. Análisis de la distribución del ciclo celular después del cotratamiento de TAT-NBI1/erl.....	87
2.2.4. Análisis de la acumulación de daño en DNA después del tratamiento con TAT-NBI1/erl.....	89
2.2.5. Determinación de la vía de muerte celular inducida tras el cotratamiento TAT-NBI1/erl en células MDA-MB-468.....	91
2.3. DISCUSION	102

CAPITULO 3: Inhibidores de ciclo celular en procesos de regeneración celular

3.1 INTRODUCCION.....	110
3.1.1. Inhibidores CDK en regeneración celular	110
3.1.1.1. CDK5	110
3.1.2. Enfermedad renal crónica.....	114
3.1.2.1. Modelos de isquemia celular	116
3.2. RESULTADOS	120
3.2.1. Determinación de condiciones subletales de TAT-NBI1 y roscovitina en la línea celular LLC-PK1.....	120
3.2.2. Efectos antiapoptóticos de TAT-NBI1 en el modelo de isquemia/ reperfusión.....	121
3.2.3. Incremento en la viabilidad celular mediada por TAT-NBI1 en el modelo de isquemia/reperfusión renal	122
3.2.4. Estudio del mecanismo molecular de recuperación inducido por el tratamiento con TAT-NBI1 en el modelo de isquemia/reperfusión renal	123
3.3. DISCUSION	134

CAPITULO 4: Inhibidores de enzima GAPDH

4.1. INTRODUCCION GAPDH	141
4.2. RESULTADOS	149
4.2.1. Cribado de quimiotecas para la identificación de inhibidores de GAPDH.....	149
4.3. DISCUSION.....	155

CONCLUSIONES..... 159

CAPITULO 5. Materiales y métodos

5.1 Ensayos in vitro.....	163
5.1.1. Materiales	163
5.1.2. Métodos	163
5.1.2.1. Ensayo de Actividad quinasa	163
5.1.2.2. Ensayo de anisotropía de fluorescencia.....	165
5.1.2.3. Dicroísmo circular	166
5.1.2.4. Preparación de las muestras para cristalización	167
5.1.2.5. Obtención de liposomas unilamelares (SUVs).....	168
5.1.2.6. Ensayos de inhibición de GAPDH.....	169
5.1.2.7. Ensayos de inhibición de LDH.....	170

5.2. Técnicas de biología molecular y manipulación de cultivos de <i>Escherichia coli</i>	171
5.2.1. Materiales.....	171
5.2.1.1. Oligonucleótidos	171
5.2.1.2. Plásmidos	171
5.2.1.3. Cepas de <i>E. coli</i>	171
5.2.1.4. Kits.....	171
5.2.2. Métodos	172
5.2.2.1. Clonación y mutagénesis	172
5.2.2.2. Condiciones de cultivo y manipulación de <i>E. coli</i>	173
5.2.2.2.1. Transformación de células DH5 α , BL21 (DE3) y BL21 pLysS (DE3).....	173
5.2.2.3. Purificación de proteínas Recombinantes	173
5.3. Manipulación de células Eucariotas.....	176
5.3.1. Materiales.....	176
5.3.1.1. Líneas celulares y medios.....	176
5.3.1.2. Compuestos	177
5.3.1.3. Reactivos.....	177
5.3.1.4. RNA de interferencia	177
5.3.1.5. Plásmidos.....	178
5.3.1.6. Anticuerpos primarios.....	178
5.3.1.7. Anticuerpos secundarios	179
5.3.1.8. Kits.....	179
5.3.2. Métodos	179
5.3.2.1. Tratamientos celulares.....	179
5.3.2.1.1. Tratamientos con los compuestos.....	179
5.3.2.1.2. Silenciamiento de genes mediante RNA de interferencia y sobreexpresión de proteínas mediante transfección génica	180
5.3.2.1.3. Modelo celular de isquemia/reperfusión.....	181
5.3.2.1.4. Inmunofluorescencia.....	182
5.3.2.2. Ensayos de determinación de viabilidad y muerte celular:	182
5.3.2.2.1. Ensayos de Viabilidad celular.....	182
5.3.2.2.2. Detección de células apoptóticas por tinción con Anexina V/yoduro de propidio	184
5.3.2.2.3. Análisis de ciclo celular	186
5.3.2.2.4. Ensayos de evaluación de liberación de citocromo c al citoplasma	188
5.3.2.2.5. Ensayo Actividad Caspasa -3/-7.....	189
5.3.2.3. Análisis de proteínas en extractos celulares.....	190
5.3.2.3.1. Extractos proteicos totales	190
5.3.2.3.2. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE	190
5.3.2.3.3. Tinción de geles con azul de Coomassie	191
5.3.2.3.4. Inmunodetección de proteínas (Western blot)	191
5.4. Tratamiento estadístico de los resultados.....	192
BIBLIOGRAFIA.....	195

ABREVIATURAS

de sus siglas en inglés

Acetil-CoA	acetil coenzima A	<i>acetyl coenzyme A</i>
ADP	adenosin dinucleótido fosfato	<i>adenosine diphosphate</i>
AIF	factor inductor de apoptosis	<i>apoptosis-inducing factor</i>
Ann V	anexina V	<i>annexin V</i>
ANOVA	análisis de la varianza	<i>analysis of variance</i>
Apaf-1	factor activador de apoptosis-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
APC/C	complejo promotor de la anafase o ciclosoma	<i>anaphase-promoting complex</i>
ATM	ataxia telangiectasia mutado	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	trifosfato de adenosina	<i>adenosine triphosphate</i>
Bad	promotor de muerte asociado a BCL-2	<i>The BCL-2-associated death promoter</i>
BCL-2	célula B del linfoma 2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BH	dominio de homología de las proteínas de la familia BCL-2	<i>domains of homology entitled the BCL-2 homology domains</i>
CAK	quinasa activadora de CDK	<i>CDK activating kinase</i>
CARD	dominio de reclutamiento de caspasas	<i>caspase recruitment domain</i>
Caspasas	cisteinil-aspartato proteasas	<i>cysteine-aspartic proteases</i>
CD	dicroísmo circular	<i>circular dichroism</i>
CDC	ciclo de división celular	<i>cell division cycle</i>
CDK	ciclina dependiente de quinasa	<i>cyclin-dependent kinase</i>
CDKI	inhibidor de CDKs	<i>CDK inhibitor protein</i>
CF	carboxifluoresceína	<i>carboxyfluorescein</i>
Cip/Kip	proteínas inhibidoras de CDKs/proteínas inhibidoras quinazas	<i>CDK inhibitor proteins/kinase inhibitor proteins</i>
CK1	caseína quinasa 1	<i>casein kinase 1</i>
c-MYC	mielocitomatosis celular	<i>cellular myelocytomatosis</i>
CRD	dominio rico en cisteína	<i>cysteine-rich domain</i>
CRM	motivo de incorporación de la ciclina	<i>cyclin recruitment motif</i>
DCA	dicloroacetato	<i>dichloroacetic acid</i>
DD	dominio de muerte	<i>death domain</i>
DED	dominio efector de muerte	<i>death effector domain</i>
DISC	complejo de señalización e inducción de muerte	<i>death inducing signaling complex</i>
DMSO	dimetilsulfóxido	<i>dimethyl sulfoxide</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSBs	formación de roturas en DNA	<i>double strand breaks</i>
DTT	ditiotreitol	<i>dithiothreitol</i>
E2F	factor de transcripción E2F	<i>E2F transcription factors</i>

EDTA	ácido etilén diaminotetraacético	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	factor de crecimiento epidérmico	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK	quinasas activadas por señales extracelulares	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
erl	erlotinib	<i>erlotinib</i>
FADD	dominio de muerte asociado a FAS	<i>FAS-Associated protein with Death Domain</i>
FITC	isotiocianato de fluoresceína	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FLIP/FLICE	proteína inhibidora de FLICE	<i>cellular FLICE-inhibitory protein</i>
GAPDH	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
HB-EGF	factor de crecimiento de unión a la heparina	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HIF	factor inducible por hipoxia	<i>hypoxia-inducible factor</i>
IAPs	proteínas inhibidoras de apoptosis	<i>inhibitor of apoptosis</i>
IGF-1R	factor de crecimiento semejante a la insulina 1	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
INK4	Inhibidores de CKD4	<i>inhibitors of CDK4</i>
IP	yoduro de propidio	<i>propidium iodide</i>
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	<i>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
LB	Luria Bertani	
LDH	lactato deshidrogenasa	<i>lactate dehydrogenase</i>
Mabs	anticuerpos monoclonales	<i>monoclonal antibodies</i>
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MOMP	permeabilización de la membrana mitocondrial externa	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, sal de tetrazolio	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NAD+	dinucleótido de adenina y nicotina	<i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADPH	nicotinamida adenín dinucleótido fosfato	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NF-Kb	factor nuclear del locus kappa de las inmunoglobulinas en células B	<i>nuclear factor kappaB</i>
NLS	secuencia de localización nuclear	<i>nuclear localization sequence</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
NSCLC	cáncer avanzado de pulmón no microcítico	<i>non-small cell lung cancer</i>
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa-1	<i>poly (ADP-ribose) polymerase</i>

PBS	tampón fosfato salino	<i>phosphate buffered saline</i>
PCD	muerte celular programada	<i>programmed cell death</i>
PCNA	antígeno nuclear de proliferación celular	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PDH	piruvato deshidrogenasa	<i>pyruvate dehydrogenase</i>
PDK	piruvato quinasa deshidrogenasa	<i>pyruvate dehydrogenase kinase</i>
PI3K	fosfatidil inositol 3 quinasa	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PKC	proteína quinasa C	<i>protein kinase C</i>
pRb	proteína del retinoblastoma	<i>retinoblastoma protein</i>
PS	fosfatidil serina	<i>phosphatidylserine</i>
R	punto de restricción	<i>restriction point</i>
RAIDD	proteína homóloga asociada a RIP con dominio de muerte	<i>RIP-associated protein with a death domain</i>
Rc	roscovitina	<i>roscovitine</i>
RIP	proteína de interacción con receptor	<i>receptor-interacting protein kinase</i>
RNA	ácido ribonucleico	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	sustancias reactivas del oxígeno	<i>reactive oxygen species</i>
SAC	punto de control del ensamblaje del huso	<i>spindle Assembly Checkpoint</i>
SDS	dodecil sulfato sódico	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SFB	SFB	<i>phosphate buffered saline</i>
SMAC/DIABLO	segundo activador de caspasa derivado de mitocondria/proteína de unión directa a IAPs	<i>second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein</i>
TBS	solución de Tris-HCl	<i>tris-buffered saline</i>
TGF-α	factor de crecimiento transformante alfa	<i>transforming growth factor alpha</i>
TGF-β	factor de crecimiento transformante beta	<i>transforming growth factor beta</i>
TKD	dominio intracelular catalítico tirosina quinasa	<i>tyrosine Kinase Domain</i>
TKI	inhibidores de la actividad tirosina quinasa	<i>tyrosine-kinase inhibitor</i>
TNF	factor de necrosis tumoral	<i>tumor necrosis factors</i>
TNF-R	receptor del factor de necrosis tumoral	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
TRADD	proteína con dominio de muerte asociada a TNF-R	<i>TNF receptor-associated death domain</i>
TRAIL	ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular	<i>vascular endothelial growth factor</i>

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

JUSTIFICACION

La proliferación celular descontrolada es el resultado de diversos mecanismos que conducen a un proceso patológico. Uno de ellos, es el desarrollo de aberraciones en cualquier punto de la maquinaria molecular que gobierna el ciclo celular (Golias *et al.*, 2004). La desregulación de los complejos CDK/ciclina se ha visto asociada a la aparición de patologías de diversa índole. Las alteraciones en los puntos de control del ciclo celular, la inactivación de genes supresores de tumores, la sobreexpresión de algunas CDKs, así como la supresión de inhibidores de CDKs endógenos, permiten que el ciclo celular progrese en presencia de daños, favoreciendo así la aparición de tumores (Malumbres y Barbacid, 2009). Otro de los mecanismos de proliferación celular descontrolada es la desregulación de la maquinaria de transducción de señales. En concreto, la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), provoca una cascada de señales que activan genes e inducen respuestas celulares que señalizan la progresión del ciclo celular o diferenciación. La activación aberrante de esta vía de señales, críticamente regulada, contribuye a la proliferación celular aumentada, migración, evasión de la apoptosis, carcinogénesis, invasión tumoral y metástasis.

Los tratamientos tumorales convencionales han mejorado sin duda durante las últimas décadas, pero sigue siendo necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas. El desarrollo de nuevos métodos de tratamiento para el cáncer es, por lo tanto, abrumadoramente importante para el control del cáncer. Los inhibidores de CDK han surgido como fármacos potencialmente viables para el tratamiento del cáncer. Otros agentes, tales

como agentes proapoptóticos, agentes disruptores vasculares, inhibidores de la angiogénesis, así como estrategias de DNA antisentido, terapias inmunológicas, etc, que pueden ser dirigidos selectivamente a las células tumorales también están siendo explorados. Además, las nuevas terapias están dirigiéndose hacia tratamientos combinados lo que implica la inhibición de varias vías de señalización simultáneamente.

Por otra parte la inhibición de CDKs puede encontrar aplicación en determinados estados patológicos en los que existe un exceso, no deseado de muerte celular. En estos casos la administración de inhibidores de CDKs puede permitir la parada del ciclo celular y facilitar así la reparación del daño acumulado evitando la muerte celular no deseada.

En este trabajo presentamos los estudios realizados, utilizando un inhibidor ATP-no competitivo de complejos CDK/ciclina (TAT-NBI1), para el tratamiento de dos procesos patológicos en los que el papel de los inhibidores CDK/ciclina puede ser relevante. En primer lugar, caracterizamos su acción y estudiamos el uso de este inhibidor en combinación con inhibidores de EGFR para el tratamiento de líneas tumorales de mama resistentes y en segundo lugar estudiamos su papel en el tratamiento del daño asociado a procesos de isquemia renal.

OBJETIVOS

- ♣ Caracterizar el mecanismo de acción de TAT-NBI1 en ensayos *in vitro*.
- ♣ Estudiar la capacidad de TAT-NBI1 de internalizarse en la célula e inducir muerte en diferentes líneas celulares.
- ♣ Determinar el efecto de la combinación de un EFGR-TKI (erlotinib) con el inhibidor de los complejos CDK/ciclina TAT-NBI1 en diferentes líneas tumorales resistentes a erlotinib. Caracterizar el mecanismo de acción de la combinación de ambos fármacos.
- ♣ Estudiar el papel de TAT-NBI1 en los procesos de recuperación tisular en un modelo isquemia/reperfusión renal y comprender el mecanismo molecular de acción del compuesto.
- ♣ Identificar inhibidores de GAPDH, como diana antitumoral, a partir de un cribado de quimiotecas.

CAPITULO 1

Inhibidores sintéticos
(farmacológicos) del ciclo celular

1.1 INTRODUCCION AL CICLO CELULAR

El estudio de la regulación del ciclo de división celular comenzó con el descubrimiento de Masui y Markert (1971) (Fig. 1.1) (revisado en (Murray, 2004; Nurse, 2000) del factor promotor de la maduración (MPF), capaz de inducir el proceso de división celular en oocitos de *Xenopus*. En el año 2001, Paul Nurse, Leland Hartwell y Timothy Hunt recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por sus descubrimientos relativos al papel de las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) en el ciclo celular. Quedó así establecido que la maquinaria básica que regula el ciclo celular se compone de complejos CDK/ciclina y que estos complejos se encuentran conservados a lo largo de la evolución.

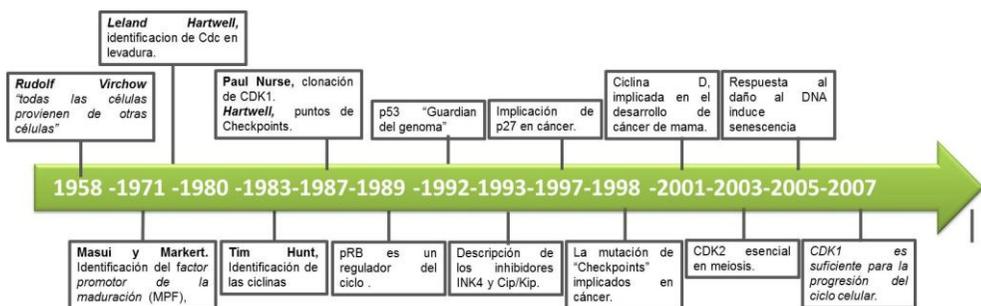


Figura 1.1. Principales descubrimientos del ciclo celular. Resumen cronológico de descubrimientos relevantes para la comprensión del ciclo celular: Leland Hartwell, aisló una colección de mutantes del proceso de división celular en *Saccharomyces cerevisiae* e identificó así más de 50 genes, CDC (cell division cycle), implicados en este proceso. En 1975, Paul Nurse, encontró el gen CDC2 regulador del ciclo celular en *Schizosaccharomyces pombe* y homólogo al CDC28 identificado por Hartwell. Nurse logró demostrar que ambos genes codificaban para quinasas (posteriormente denominados CDKs) que controlaban el ciclo celular a través de la fosforilación de distintos sustratos. Su principal hallazgo ocurrió en 1987, cuando insertando segmentos de DNA humano en levaduras mutantes de CDC2 indujo su entrada en mitosis. Estos experimentos le permitieron la identificación del homólogo humano de CDC2, CDK1 (Nurse, 2000). Tim Hunt, en 1983, descubrió las proteínas denominadas ciclinas, proteínas que se sintetizan y se degradan en cada ciclo celular y regulan la actividad de las CDC (Hunt, 1991) (adaptado de (Malumbres y Barbacid, 2009)).

En mamíferos hasta el momento se conocen 21 CDKs (CDK 1-20) (Malumbres et al., 2009), y 5 proteínas, conocidas como quinasas “CDK like (CDKL)” de las que no se ha encontrado su asociación a ciclinas (Fig. 1.2A). En cuanto a las ciclinas, que regulan la actividad de estas CDKs, se conocen hasta el momento 29 ciclinas diferentes (Fig. 1.2B) (Malumbres, 2011; Malumbres y Barbacid, 2005). Los complejos CDK/ciclina están implicados en la regulación de diversos procesos celulares. Mientras CDK1/ciclina A/B; CDK2/ciclina E/A, CDK4/6/ciclina D, CDK3/ciclina C se asocian al control del ciclo celular, el grupo constituido por CDK7/ciclina H, CDK8/ciclina C, CDK9/ciclina T, están involucrados en la regulación de la transcripción. CDK7/ciclina H posee una función adicional en la activación de algunas CDKs del ciclo celular (Kaldis, 1999). CDK5 asociado con p35, p25 o ciclina I regula numerosas funciones en el sistema nervioso central como la transmisión y la plasticidad sináptica así como procesos de supervivencia y muerte neuronal (Cheung et al., 2006) (Fig. 1.2C).

El ciclo celular consiste en una serie de eventos ordenados y controlados que culminan con el crecimiento de la célula y su división, dando lugar a dos células hijas. El ciclo celular eucariótico se compone de cuatro fases, G1 (fase “GAP1”), S (fase de síntesis), G2 (fase “GAP2”) y M (fase de mitosis). Al conjunto de las fases G1, S y G2 se le denomina interfase (Murray, 2004). El tránsito a través de las diferentes etapas que componen el ciclo celular está regulado por las CDKs. Estas proteínas poseen actividad serina/treonina quinasa (Malumbres, 2005) y su actividad se regula por asociación a diferentes ciclinas. Los niveles celulares de CDKs en la célula son constantes mientras que niveles de las diferentes ciclinas fluctúan a lo largo del ciclo estableciéndose así un punto clave de control de progresión (Fig.1.3). Existen diferentes complejos CDK/ciclina que controlan el paso a través de las diferentes etapas del ciclo (Malumbres y Barbacid, 2005)

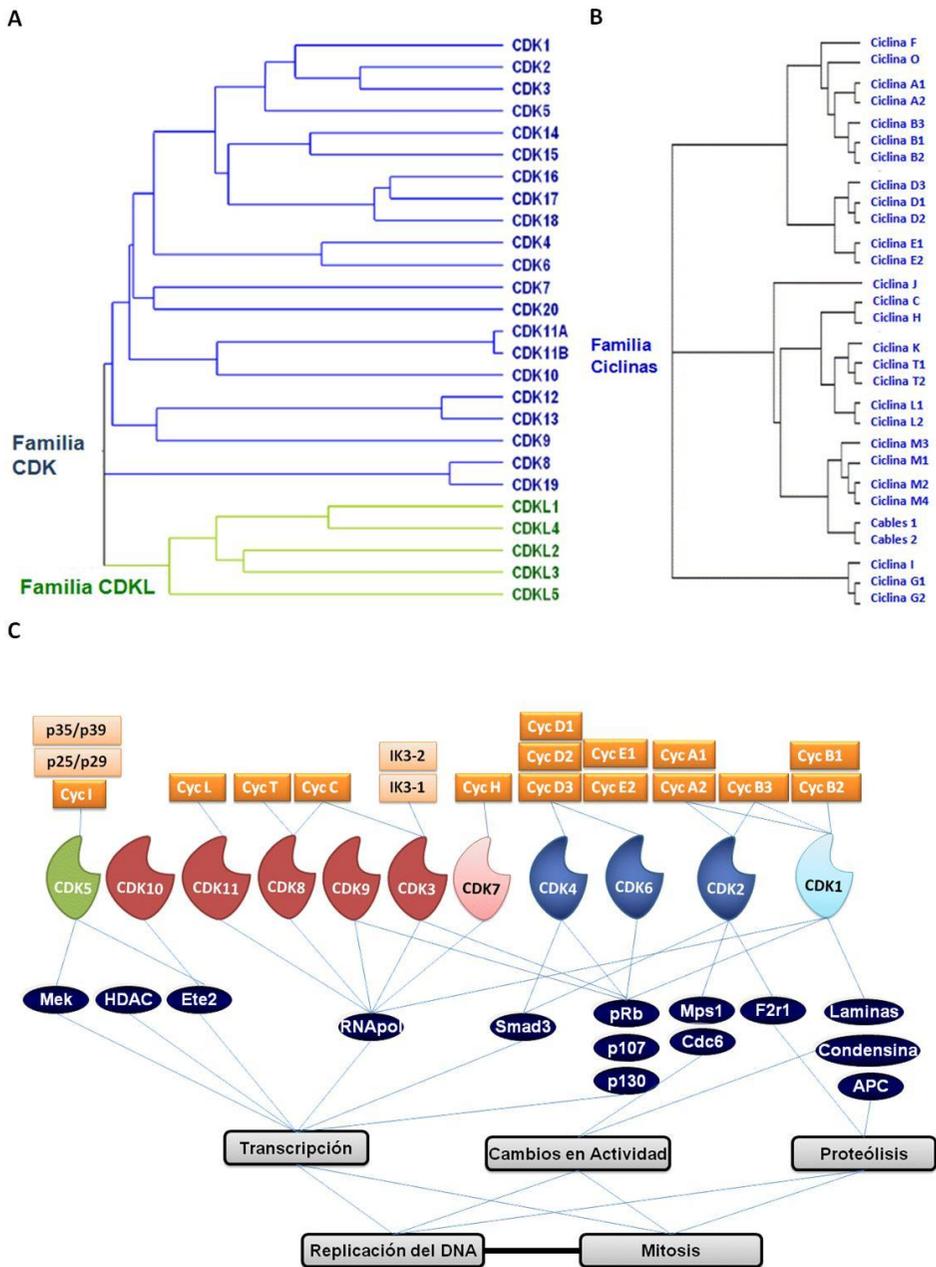


Figura 1.2. Complejos CDK/ciclina. Árbol filogenético de A. La Familia de las CDKs; Nomenclatura para las CDKs (azul) y la familia de CDKL (verde); B. Familia de las ciclinas (Cyc) (adaptado de (Malumbres y Barbacid, 2005; Malumbres *et al.*, 2009)). C. Implicación de los complejos CDK/ciclina en el ciclo celular, la subfamilia de CDK (CDK1-11) junto con las proteínas activadoras y algunos de sus sustratos. (adaptado de (Malumbres, 2005)).

La fase G1 es el periodo del ciclo celular que abarca desde el término de la fase M hasta el inicio de la fase S. En esta primera fase de crecimiento, la célula que acaba de dividirse tiene una intensa actividad metabólica, aumentando su tamaño, el número de microtúbulos y generando nuevos orgánulos (mitocondrias, ribosomas y estructuras membranosas). Durante G1, la célula decide si replicar su DNA o salir del ciclo celular, pasando a un estado quiescente denominado G0 (Ren y Rollins, 2004). Células en G0 pueden retornar a la fase G1 en un proceso regulado por la unión de CDK3 a ciclina C (Ren y Rollins, 2004). El complejo CDK3/ciclina C es el primero en fosforilar parcialmente la proteína de retinoblastoma (pRb). La pRb es una proteína supresora de tumores, la cual en condiciones hipofosforiladas, mantiene secuestrado al factor de transcripción E2F. El factor de transcripción E2F, juega un papel crucial en el control de la transcripción de diferentes proteínas del ciclo celular. Su secuestro por pRb inhibe la transcripción y la progresión del ciclo. De este modo, la fosforilación de pRb produce la liberación de E2F y permite la transcripción de los genes necesarios para iniciar la fase G1.

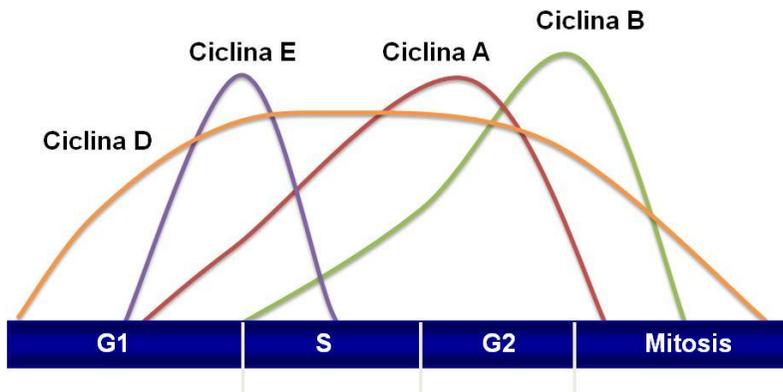


Figura 1.3 Fluctuación de las ciclinas en las diferentes fases del ciclo celular.

Durante G1 se puede distinguir una fase inicial dependiente de mitógeno y una segunda fase en la que el ciclo progresará independiente de los nutrientes disponibles. El punto a partir del cual la célula puede proliferar en ausencia de

estímulos mitogénicos se conoce como punto de restricción (R). R es un punto de no retorno: una vez alcanzado, la célula debe completar una ronda de división celular (Coller, 2007). En la fase G1 también se sintetizan diferentes isoformas de la ciclina D (D1, D2, D3) que interaccionan con CDK4 y CDK6. Los complejos formados hiperfosforilan a pRb, liberando E2F (Ren y Rollins, 2004). La activación de E2F inicia la transcripción de una serie de genes que inducen la entrada de la célula en fase S, así como la expresión de ciclina E, que se asocia con CDK2. El complejo CDK2/ciclina E es necesario para la transición de G1 a S, debido a que mantiene hiperfosforilada a pRb y por lo tanto favorece la acumulación de E2F.

En la fase S, tiene lugar la duplicación del DNA y la síntesis de histonas. Una vez completada, cada cromosoma queda duplicado y formado por dos cromátidas idénticas. En esta fase se inicia la replicación de los centríolos, la cual no se completará hasta el inicio de la mitosis (Malumbres y Barbacid, 2009). Al igual que otros complejos, CDK2/ciclina E fosforila la histona H1 que participa en la reorganización de la cromatina durante la replicación del genoma. Al final de esta fase la ciclina A empieza a sintetizarse regulada también por el factor E2F (Johnson y Walker, 1999). Al entrar en fase S, los complejos CDK2/ciclina A y CDK2/ciclina E permanecen en el núcleo, mientras que CDK4, 6/ciclina D salen al citoplasma y son degradados por el proteasoma.

En la fase G2, o segunda fase de crecimiento, continúa la síntesis de RNA y proteínas necesarias para la mitosis. El final de esta fase se establece cuando los cromosomas empiezan a condensarse iniciando así la mitosis. En la transición de G2/M, ciclina A interacciona con CDK1 en el núcleo hasta su degradación durante la fase M, que ocurre por proteólisis dependiente de ubiquitina (Besson *et al.*, 2008). En la fase G2 ciclinas de tipo B (B1, B2 y B3), forman complejos con CDK1 (Gallant y Nigg, 1994; Nguyen *et al.*, 2002). Los complejos CDK1/ciclina B regulan diversos eventos en la transición G2/M, mediante fosforilación de sustratos que permitirán la ruptura de la envoltura

nuclear, la separación de los centrosomas, la reorganización de los microtúbulos en el huso mitótico, la condensación de la cromatina para formar los cromosomas y la fragmentación del aparato de Golgi. Finalmente, la inactivación de CDK1/ciclina B mediante la degradación de la ciclina B por proteólisis permite la correcta salida de M (Satyanarayana y Kaldis, 2009b). En este punto, ocurre una defosforilación de pRb, recuperando ésta la capacidad represora de proliferación, que es necesaria para comenzar un nuevo ciclo. En esta fase ocurre la división del núcleo (cariocinesis) y sincronizadamente la división celular (citocinesis). La citocinesis comienza generalmente durante la anafase y termina en un punto después de la finalización de la mitosis. Al culminar esta fase los cromosomas duplicados se distribuyen de manera idéntica en cada una de las células hijas (Orzaez *et al.*, 2009) (Fig. 1.4).

1.1.1. Puntos de control del ciclo celular

A finales de los ochenta, Hartwell descubrió la existencia de mecanismos de vigilancia de la división celular a los que llamó “*checkpoints*” que permiten reconocer errores en diferentes etapas del ciclo celular y proceder a su corrección (Hartwell y Kastan, 1994). La activación de estos puntos de control provoca la parada del ciclo celular (arresto), mediante la modulación de las CDKs y permite la reparación de los daños. Si la reparación no es posible, las células deben ser dirigidas a un proceso de senescencia o muerte celular por apoptosis (Besson *et al.*, 2008).

1.1.1.1. Puntos de control en G1/S

El primer punto de control se establece al final de la fase G1 donde se verifica la presencia de factores de crecimiento y el tamaño celular. Cuando todas las condiciones son apropiadas, la célula está lista para pasar a la fase S e iniciar la replicación del DNA (Malumbres y Barbacid, 2009). En células que deben entrar en quiescencia y en células que son sometidas a carencia de nutrientes,

la proteína p16 se une a CDK4/6, desplazando a ciclina D e impidiendo la fosforilación de pRb. Por el contrario, si existe una señal externa de proliferación, aumenta la expresión de ciclina D, la cual compite con p16 por la unión con CDK4/6, regulando positivamente la actividad quinasa del complejo y facilitando la progresión del ciclo (Bartkova *et al.*, 1996; Sherr y Roberts, 1999). En respuesta a daño a DNA, en esta etapa, el control del ciclo lo asumen las quinasas denominadas ATM (“*Ataxia-telangiectasia mutated*”) y ATR (ATM y Rad-3 *related*) que activan 2 vías de control. La primera fosforila a proteínas serina/treonina quinasas llamadas CHK1 y CHK2 y la segunda a la proteína p53 (Bartek y Lukas, 2001; Xiao *et al.*, 2003). CHK1 y CHK2 inician el proceso de degradación proteosomal de la fosfatasa CDC25, mediante fosforilación. Esta fosfatasa es la encargada de desfosforilar CDK2, permitiendo así la actividad enzimática del complejo CDK2/ciclina E. Al disminuir los niveles de CDC25 por activación del eje ATM/ATR-CHK2/CHK1, CDK2 se mantiene fosforilada, impidiendo así la activación de los genes de fase S, y las células retrasan su progresión, acumulándose en el final de la fase G1. Estos eventos constituyen la primera respuesta celular a las lesiones en el DNA, iniciándose entre veinte y treinta minutos después de producirse el daño y se conoce como arresto temprano (Xiao *et al.*, 2003). No obstante, el mantenimiento prolongado de las células en fase G1 se consigue mediante el arresto tardío, que se inicia simultáneamente al arresto temprano, pero los efectores podrán ejercer su función biológica al cabo de varias horas. El arresto tardío involucra, ATM y ATR, que fosforilan directamente la proteína p53, reduciendo su capacidad para unirse a MDM2 (“*murine double minute 2*”). MDM2 es una ubiquitina ligasa necesaria para la degradación de p53, lo que se traduce en la acumulación y estabilización de p53 y posterior activación de p21. p21 inhibe el complejo CDK2/ciclina E, provocando la detención del ciclo celular en la fase G1/S (Hirao *et al.*, 2000). En caso de no repararse el daño en el DNA, p53 es la encargada, además, de inducir la eliminación de la célula mediante muerte por apoptosis (Bartek y Lukas, 2001).

1.1.1.2. Puntos de control de daño al DNA en G2/M

El siguiente punto de control tiene lugar en la fase G2 y previene la entrada en mitosis si en la célula existen daños en el DNA. En concreto, ATR fosforila a la proteína CHK1 que inhibe a la fosfatasa CDC25C, evitando así la activación de CDK1 y por tanto impidiendo la formación del complejo CDK1/ciclina B.

En la fase de mitosis existe un tercer punto de control que asegura la correcta segregación cromosómica en mitosis, denominado punto de control del ensamblaje del huso (SAC, "*Spindle Assembly Checkpoint*"). La activación de SAC, provoca la parada del ciclo celular y retrasa el inicio de anafase hasta que todos los cinetocoros se unen al huso de forma bipolar. El complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C) es quien promueve la transición de anafase y la salida de mitosis. Durante la prometafase, APC/C está unido al coactivador Cdc20, pero bajo la inhibición de proteínas del checkpoint de huso mitótico, las cuales bloquean su capacidad de reclutamiento de sustratos. Sin embargo, esta forma de APC/C-Cdc20 mantiene la capacidad de ubiquitinar algunas de sus dianas tales como ciclina A (Geley *et al.*, 2001). Cuando la última pareja de cromátidas hermanas se ancla al huso mitótico y se inactiva el checkpoint de huso mitótico, APC/C-Cdc20 se activa por completo, siendo capaz de ubiquitinar un nuevo grupo de proteínas en metafase, incluyendo ciclina (Musacchio y Salmon, 2007). Esta destrucción de ciclina B conlleva la inactivación progresiva de la actividad CDK, lo que permite la desfosforilación del otro coactivador de APC/C: CDH1, el cual permanecía inactivo en su forma fosforilada. Una vez desfosforilado, CDH1 activa a APC/C, otorgándole una especificidad de sustratos que incluyen CDC20, PLK1 y las quinasas Aurora (A y B), que se destruyen en este orden en anafase y telofase (Lindon y Pines, 2004). De este modo, la actividad de APC/C desencadena la progresión de la mitosis (Musacchio y Salmon, 2007; Sullivan y Morgan, 2007).

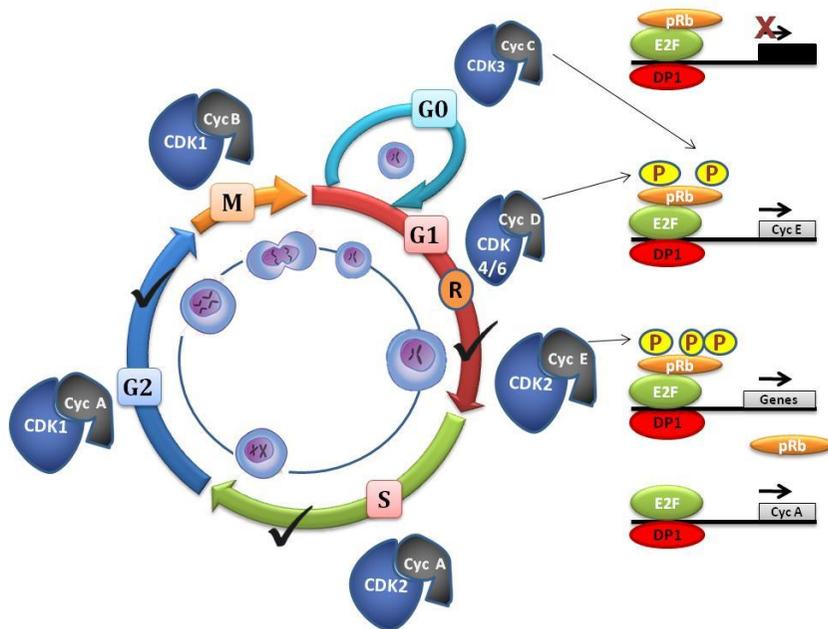


Figura 1.4. Esquema general del ciclo celular y su regulación. El ciclo celular consta de 2 fases: la interfase (G1, S, G2) y Mitosis (M). A lo largo del ciclo fluctúa la actividad de los distintos complejos CDK-ciclina. pRb es hiperfosforilada, liberando E2F, necesaria para la transcripción. ® punto de restricción en donde las células pueden abandonar el ciclo para entrar en G0, fase de quiescencia. (✓) punto de control del ciclo celular.

Las CDKs son similares entre sí, en términos de secuencia y estructura. De las distintas CDKs la más estudiada desde el punto de vista estructural es CDK2. CDK2 posee un lóbulo N-terminal en forma de lámina beta (residuos 1-79; Fig. 1.5, en magenta), con un bucle rico en glicinas y la hélice PSTAIRE (residuos 42-57; Fig. 1.5, en celeste) que contiene en el sitio catalítico un ácido glutámico en posición 51 (Glu51), conservado entre las diferentes proteína quinasas eucariotas. Además posee un lóbulo C-terminal (residuos 86-297; Fig. 1.5, en amarillo) en estructura helicoidal que contiene el segmento de activación por fosforilación denominado “T-loop” (residuos 145-172; Fig. 1.5, en rojo). Entre el lóbulo N-terminal y el C-terminal hay una región denominada bisagra (residuos 80-85) (Heitz *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 2002). El segmento de activación es importante en la unión del sustrato y contiene un residuo de

treonina (Thr160, Fig. 1.5, en azul), que es fosforilado para que se produzca la activación de la CDK. En la CDK inactiva, los dos lóbulos tienen conformación abierta (Johnson *et al.*, 2002).

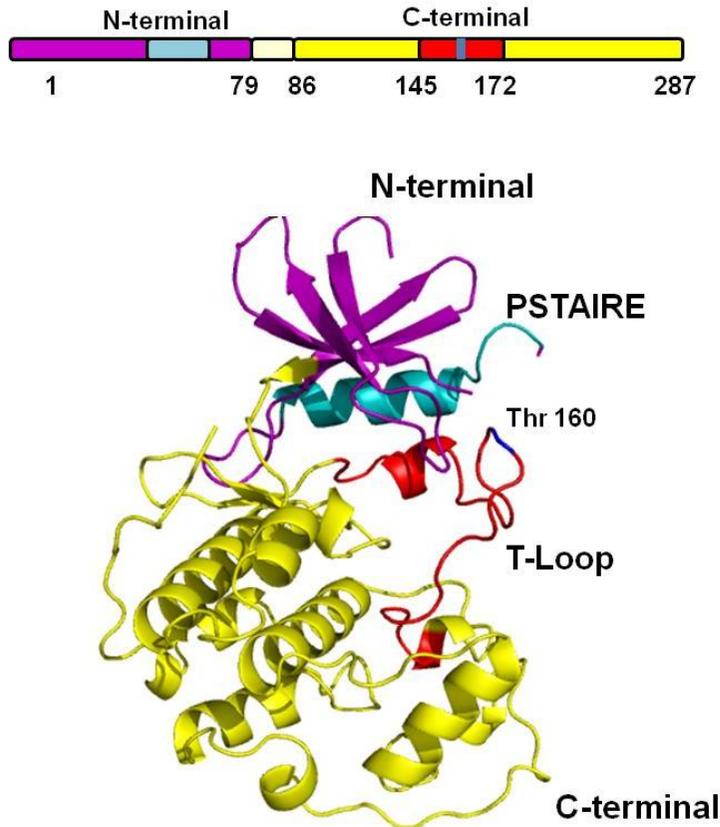


Figura 1.5. Estructura de CDK2. Estructura por difracción de rayos X a 1.9 Å de resolución de ICDK2 humana (las coordenadas fueron extraídas del "Protein Data Bank" (PDB) código 1HCK) (Schulze-Gahmen *et al.*, 1996). . El N terminal en magenta; la hélice PSTAIRES en celeste, el lóbulo C-terminal en amarillo; el "T loop" en rojo y el sitio de activación por CAK (Thr160) en azul.

Por otra parte, la estructura primaria de las ciclinas tiene en común la presencia de una o dos regiones conservadas de 150 aminoácidos conocidas como "cyclin box". En concreto, ciclina A, posee dos "cyclin box" (residuos 209-310 (Fig. 1.6, en verde), 311-399 (Fig. 1.6, en azul)), formadas por 5 regiones

helicoidales, que se encuentran asociadas con dos hélices adicionales en el extremo N-terminal (residuos 1-200; Fig. 1.6, en verde claro) y en el C-terminal (residuos 302-432, Fig. 1.6, en azul oscuro). En la región N-terminal existe un sitio conservado denominado surco de unión del substrato CRM (“*cyclin recruitment motif*”; residuos 109-160) (Malumbres y Barbacid, 2005; Noble *et al.*, 1997). En el CRM, se produce la unión de un gran número de substratos como el factor de transcripción E2F, pRb y p53 previamente a su fosforilación por la CDK correspondiente.

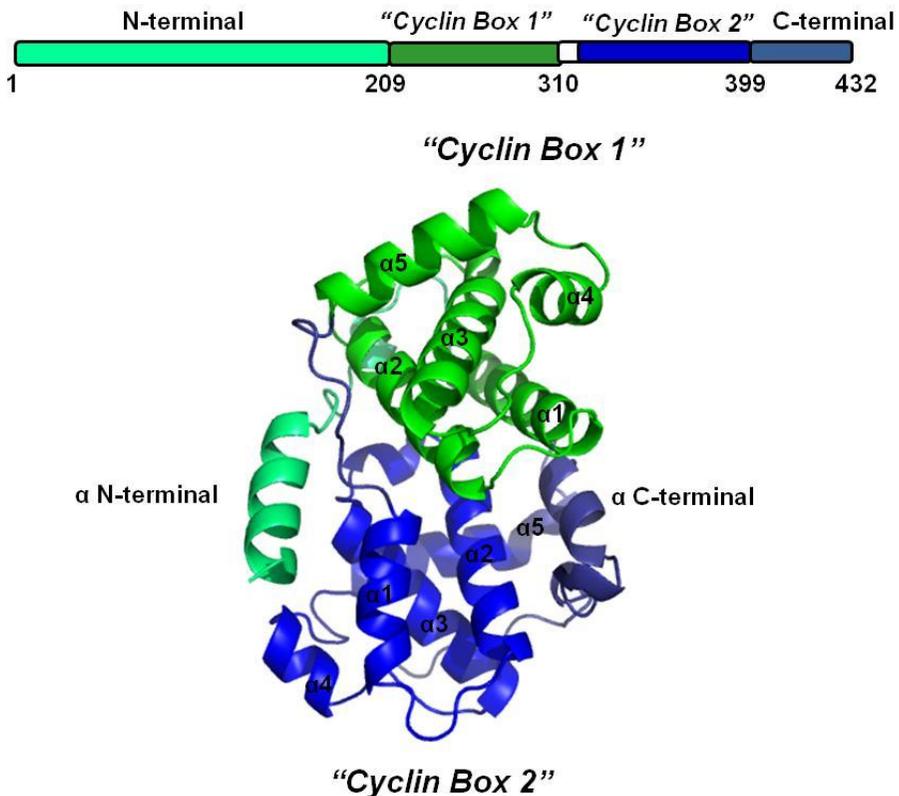


Figura 1.6. Estructura de Ciclina A. Estructura por difracción de rayos X a 2 Å de resolución de ciclina A bovina (las coordenadas fueron extraídas del PDB código 1VIN) (Brown *et al.*, 1995). Representación esquemática de la ciclina A, donde muestra el N-terminal en verde claro, “Cyclin Box 1” en verde, “Cyclin Box 2” en azul y el C-terminal en azul oscuro.

En los últimos años, se han descrito la estructura tridimensional de diferentes complejos CDK/ciclina, entre otros CDK2/ciclina A (Jeffrey *et al.*, 1995), CDK2/ciclina E (Honda *et al.*, 2005), CDK4/ciclina D (Day *et al.*, 2009), CDK2/ciclina B (Brown *et al.*, 2007), CDK9/ciclina T/ciclina C (Baumli *et al.*, 2008), CDK7/ciclina H (Lolli *et al.*, 2004) (Andersen *et al.*, 1997), y CDK5/p25 (Tarricone *et al.*, 2001).

Tomando como referencia el complejo CDK2/ciclina A, la asociación entre ambas proteínas se produce a través de la interacción de la hélice PSTAIRE de la CDK (Fig. 1.7 en violeta) y las hélices 3 y 5 de ciclina. Esta interacción es responsable de la rotación de la hélice PSTAIRE que permite el correcto posicionamiento del Glu51 en el surco catalítico induciendo la reorganización del sitio de unión del ATP (Gondeau *et al.*, 2005). En un segundo paso del proceso de activación del complejo, se produce una interacción entre el C-terminal y el “*T loop*” (Fig. 1.7 en rojo) de la CDK, con la hélice N-terminal de ciclina (Fig. 1.7 en verde claro). En este paso se expone el “*T loop*” que es fosforilado por la quinasa activadora de CDKs, CAK (“*CDK activating kinase*”) (un complejo formado por CDK7, ciclina H, y MAT-1) dejando accesible el sitio de unión al sustrato y quedando el complejo en su forma activa (Morris *et al.*, 2002).

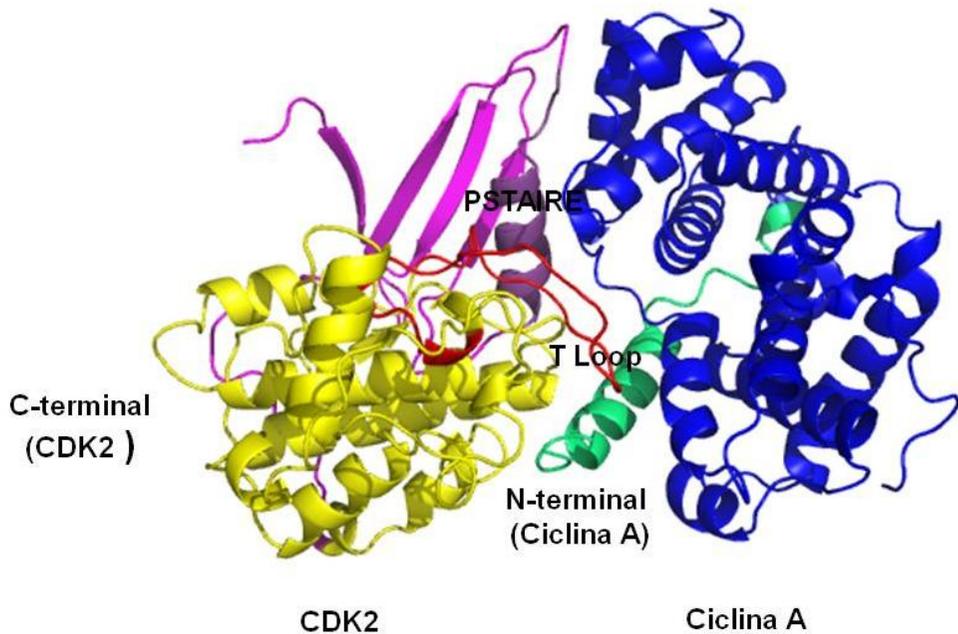


Figura 1.7. Estructura del complejo CDK2/ciclina A. Estructura por difracción de rayos X a 2,3 Å de resolución del complejo CDK2/ciclina A humanas (las coordenadas fueron extraídas del PDB código 1JSU)(Russo *et al.*, 1996). Se muestra la interacción de CDK2 con ciclina A. c-terminal en amarillo, el T loop en rojo, el N-terminal en magenta y la hélice (PSTAIRE) en violeta de CDK2. La ciclina A se muestra en azul, y el N-terminal en verde claro.

1.1.2. Regulación de la actividad de los complejos CDK/ciclina

La actividad de los complejos CDK/ciclina está regulada tanto por procesos de fosforilación/desfosforilación como por su asociación a miembros de las familias de inhibidores de CDKs (CKIs).

1.1.2.1. Regulación de la actividad CDK por fosforilación/desfosforilación.

Como hemos descrito previamente, para su completa activación, además de la unión con las respectivas ciclinas, las CDKs deben ser fosforiladas en un residuo

conservado de treonina (Thr172 en CDK4 y Thr160 en CDK2) que provoca la exposición del sitio catalítico (Brown *et al.*, 1999) (Fig. 1.8). La actividad de todas las CDKs se regula negativamente por la fosforilación de un residuo en el extremo amino terminal (Thr14 y Tyr15) por las quinasas WEE1 y MYT1. Estas fosforilaciones no inducen grandes cambios conformacionales en la estructura, pero si reducen la afinidad de la CDK por su sustrato (Niida y Nakanishi, 2006) (Fig. 1.8). Otro mecanismo de regulación lo llevan a cabo la familia de fosfatasas CDC25 (CDC25A, CDC25B Y CDC25C)(Echalier *et al.*, 2010; Malumbres y Barbacid, 2009; Satyanarayana y Kaldis, 2009a) que desfosforilan las CDKs (en los residuos Thr14, Tyr15), para regular las transiciones entre las diferentes etapas del ciclo celular (Fig. 1.8). Por ejemplo, en presencia de daño en el DNA durante la progresión de la fase S, CHK1 fosforila CDC25A provocando su ubiquitinación y degradación. La disminución de CDC25A conduce a la acumulación de CDK2 fosforilada y arresto mitótico. Al final de la fase G2, la familia CDC25 activa el complejo CDK1/ciclina B (Aressy y Ducommun, 2008; Xiao *et al.*, 2003).

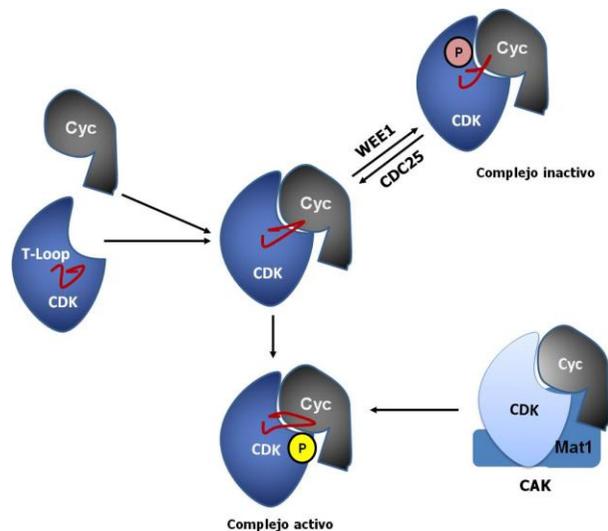


Figura 1.8. Mecanismo de activación del complejo CDK/ciclina. Las CDKs requieren unirse a ciclina para tener actividad quinasa. Una vez formado el complejo debe ser activado por fosforilación en el “T-loop” por CAK. El complejo, es regulado negativamente por WEE1. Acción que es revertida por la fosfatasa CDC25.

1.1.2.2. Regulación por inhibidores naturales de CDKs (CKIs).

Dependiendo de la estructura molecular y afinidad por las CDKs, los inhibidores naturales se agrupan en dos grandes familias: INK4 (*"Inhibitors of CDK4"*) y Cip/Kip (*"CDK inhibitor proteins/kinase inhibitor proteins"*). Los inhibidores INK4 (INK4A (p16), INK4B (p15), INK4C (p18) y INK4D (p19)) se unen específicamente a CDK4 y CDK6 en la fase G1 del ciclo celular, interfiriendo en su interacción con ciclina D. Las proteínas INK4 se unen a regiones cercanas al sitio de unión de ATP del surco catalítico y opuesto al sitio de unión de la ciclina D, interaccionando con el N- y C-terminal. Esta unión induce un cambio conformacional en la región catalítica y altera alostéricamente el sitio de unión de la ciclina D, favoreciendo su disociación (Jeffrey *et al.*, 2000).

La familia CIP/KIP (p21 (CIP1/WAF1), p27 (KIP1) y p57 (KIP2)) interacciona a través de su dominio N-terminal con el CRM de ciclina E o ciclina A. De este modo, la unión de p21 o p27 al CRM impide el acceso de los substratos al centro activo e inhibe así su fosforilación (Abukhdeir y Park, 2008; Orzaez *et al.*, 2009). La proteína p21 está involucrada en senescencia y en diferenciación celular y es diana transcripcional de p53 mediando el arresto en las fases G1 y G2 inducido por daño al DNA. p21 inhibe la replicación del DNA en fase S por la unión con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), que es una proteína nuclear sintetizada en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular. Esta proteína se localiza en el núcleo y favorece la síntesis de DNA, ya que es un cofactor de la DNA polimerasa. Cuando existen daños en el DNA, la proteína PCNA se reubica y participa en la vía de reparación del DNA (Abbas y Dutta, 2009). La proteína p27 es importante para la salida del ciclo celular cuando las células están en la fase G0. Su expresión disminuye rápidamente cuando las células se reincorporan al ciclo celular (Abukhdeir y Park, 2008; Chu *et al.*, 2008). La interacción de p27, con CDK4,6/ciclina D, promueve la translocación del complejo, al citoplasma durante la fase G1. El aumento en los niveles de expresión de p27 está asociado a parada en mitosis. La proteína p57 parece

tener un papel importante durante el desarrollo embrionario (Starostina y Kipreos, 2011). Las proteínas CIP/KIP están reguladas por fosforilación, la cual determina su localización celular (Ullah *et al.*, 2009). Por ejemplo, la fosforilación de p21 en Thr145 y Ser153, por la proteína quinasa B (PKB)/AKT y la proteína quinasa C (PKC), respectivamente, promueve la retención citoplasmática de p21. La primera fosforilación se localiza en un residuo próximo a la secuencia de localización nuclear (NLS) de p21 y evita su interacción con la importina nuclear, y el segundo bloquea el importe nuclear mediado por calmodulina (Child y Mann, 2006).

Tres sitios de fosforilación de p27 la mantienen en el citoplasma. La primera es una fosforilación en Ser10, hace que p27 sea exportada desde el núcleo en la fase G1. La segunda y tercera es en Thr157 y Thr198 por PKB/AKT, que impiden su interacción con importinas (Fujita *et al.*, 2003; Ishida *et al.*, 2002). La fosforilación de p27 en Thr187 por CDK2/ciclina E, conduce directamente a una disminución de las concentraciones de p27. Esta disminución permite su reconocimiento por ubiquitina ligasa SCF (SKP2) lo que conlleva a la degradación de p27 (Swanton, 2004).

La importancia de la familia de proteínas CIP/KIP se pone de manifiesto observando el fenotipo de los ratones que carecen de dichas proteínas. El ratón nulo ("*knock out*") para p27, presenta un tamaño superior al normal e hiperplasia en órganos (Gao *et al.*, 2004). En el "*knock out*" para p21 las células son incapaces de sufrir arresto inducido por daño en el DNA. Los ratones que carecen de p57 también muestran hiperplasia en muchos órganos y alteraciones en rutas como Notch, MyoD y BMP-2/6, lo cual induce un retraso en la diferenciación (Abukhdeir y Park, 2008; Zhang *et al.*, 1997).

Aunque en general el papel de estos inhibidores se asocia a la habilidad de bloquear el ciclo celular y en este sentido se consideran genes supresores de tumores, en los últimos años se ha estudiado su implicación en el control de

otros procesos celulares tales como la apoptosis, transcripción y migración. De este modo, su inhibición puede resultar en oncogénesis (Besson *et al.*, 2008). Se ha establecido también la importancia que tiene su localización celular. Así cuando se encuentran en el núcleo ejercen como supresores tumorales, por el contrario una localización en citosol está más relacionada con su actividad oncogénica (Coqueret, 2003). Así, la pérdida, sobreexpresión o localización citoplasmática de p21 y p27 es un marcador de mal pronóstico y está asociado con un aumento en la agresividad del tumor en cáncer de páncreas, mama, próstata, ovario, pulmón, cuello uterino, cerebro, estómago y en los glioblastomas (Besson *et al.*, 2004; Biankin *et al.*, 2001).

1.1.3. Análisis genético de la función del complejo CDK/ciclina en ratones.

Con el fin de conocer a fondo los mecanismos que gobiernan el ciclo celular y la importancia que las diferentes CDKs tienen en la inducción de diferentes patologías se han generado múltiples modelos murinos con alteraciones en ciclinas y CDK. En la Tabla 1.1, se resumen las características más relevantes de los diferentes “*knock out*” de ciclinas y CDKs. Respecto a los ratones “*knock out*” de CDKs hay que destacar que la única CDK indispensable para la viabilidad es la CDK mitótica CDK1, cuya eliminación no permite que el embrión progrese. Esto indica que la ausencia de CDK1 no puede compensarse con otras CDKs. Sin embargo, CDK1 puede ejecutar todos los eventos que se requieren para impulsar la división celular y el desarrollo embrionario (Santamaria *et al.*, 2007). En cambio, las denominadas CDKs de interfase (CDK2, 4 y 6) no son esenciales y su eliminación provoca defectos principalmente en células especializadas (Malumbres y Barbacid, 2009).

En los ratones “*knock out*” CDK5 se puso de manifiesto que esta quinasa es esencial para el correcto desarrollo del sistema nervioso central, presentando

letalidad embrionaria y la alteración de las estructuras laminares corticales debido a la alteración de la migración neuronal (Hirasawa *et al.*, 2004).

En cuanto a las ciclinas, cabe destacar el papel de ciclina A2 (Liu *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 1997) y B1 (Brandeis *et al.*, 1998), puesto que su supresión, resulta en letalidad embrionaria temprana. Ambas ciclinas son esenciales para la embriogénesis y ninguna de las otras ciclinas son capaces de compensar su pérdida.

Tabla 1.1. Modelos murinos “Knock out” de CDKs y ciclinas implicadas en ciclo celular

"Knock-out "	Fenotipo	Alteraciones que desarrolla	Referencia
CDK4 ^{-/-}	Son viables, de tamaño pequeño y estériles.	Desarrollo de diabetes, defectos en células endocrinas, tales como las células β pancreáticas o células pituitarias.	Rane, Dubus <i>et al.</i> 1999
CDK6 ^{-/-}	Son viables, con una disminución en el tamaño del timo, las hembras tienen un tamaño menor y son estériles.	Alteraciones en hematopoyesis.	Malumbres, Sotillo <i>et al.</i> 2004
CDK4 ^{-/-} ;CDK6 ^{-/-}	Son letales, los embriones mueren durante las últimas etapas del desarrollo embrionario, muestran una proliferación celular normal.	Alteración de la maduración de los diferentes linajes hematopoyéticos, lo que se traduce en una anemia severa y la muerte	Tsutsui, Hesabi <i>et al.</i> 1999
CDK2 ^{-/-}	Son viables y el desarrollo embrionario es normal, aunque los animales son de menor tamaño .	Alteraciones en las células germinales	Berthet, Aleem <i>et al.</i> 2003
CDK2 ^{-/-} ; CDK4 ^{-/-}	Completan el desarrollo embrionario y nacen, pero mueren al poco tiempo.	Dismunución en los cardiomiocitos	Barriere, Santamaria <i>et al.</i> 2007
CDK2 ^{-/-} ;CDK6 ^{-/-}	Son viables, los ratones son de bajo peso y estériles, con una vida media de 1,5 años sin desarrollar ninguna anomalía.	Defectos en la hematopoyesis, espermatogénesis y ovogénesis.	Malumbres, Sotillo <i>et al.</i> 2004
CDK1 ^{-/-}	Son letales, mortalidad embrionaria desde las primeras divisiones celulares.		Santamaria, Barriere <i>et al.</i> 2007
CDK5 ^{-/-}	Letalidad embrionaria y alteración de las estructuras laminares corticales debido a que se afecta la migración neuronal.		Hirasawa, Ohshima <i>et al.</i> 2004

"Knock-out "	Fenotipo	Alteraciones que desarrolla	Referencia
Ciclina D1 ^{-/-}	Son viables, con una disminución en el tamaño de los ratones.	Tienen anomalías neurológicas, hipoplasia en retinas y glándulas mamarias.	Sicinski, Donaher <i>et al.</i> 1995
Ciclina D2 ^{-/-}	Son viables, las hembras son estériles y los machos tienen testículos hipoplásicos.	Anormalidades del cerebelo, anomalías en la proliferación de los linfocitos B e hipoplasia de las células beta del páncreas.	Sicinski, Donaher <i>et al.</i> 1996; Huard, Forster <i>et al.</i> 1999
Ciclina D3 ^{-/-}	Son viables	<i>Defectos en el desarrollo de los linfocitos T</i>	Sicinska, Aifantis <i>et al.</i> 2003
Ciclina D1 ^{-/-} ; D2 ^{-/-} ; D3 ^{-/-}	Los ratones se desarrollan y la final de la gestación mueren.	Anormalidades del corazón, combinado con una anemia severa	Kozar, Ciemerych <i>et al.</i> 2004
Ciclina E1 ^{-/-}	Son viables y el desarrollo embrionario es normal.		Geng, Yu <i>et al.</i> 2003; Parisi, Beck <i>et al.</i> 2003
Ciclina E2 ^{-/-}	Son viables y el desarrollo embrionario es normal.		Geng, Yu <i>et al.</i> 2003; Parisi, Beck <i>et al.</i> 2003
Ciclina E1 ^{-/-} ; E2 ^{-/-}	Letalidad embrionaria.		Geng, Yu <i>et al.</i> 2003; Parisi, Beck <i>et al.</i> 2003
Ciclina A1 ^{-/-}	Son viables y el desarrollo embrionario es normal.		Murphy, Stinnakre <i>et al.</i> 1997; Liu, Matzuk <i>et al.</i> 1998
Ciclina A2 ^{-/-}	Letalidad embrionaria temprana.		Murphy, Stinnakre <i>et al.</i> 1997; Liu, Matzuk <i>et al.</i> 1998
Ciclina B1 ^{-/-}	Letalidad embrionaria.		Brandeis, Rosewell <i>et al.</i> 1998
Ciclina B2 ^{-/-}	Son viables y el desarrollo embrionario es normal.		Brandeis, Rosewell <i>et al.</i> 1998

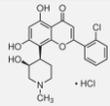
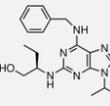
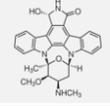
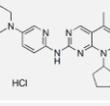
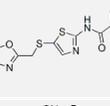
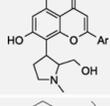
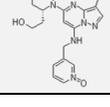
1.1.4. Inhibidores farmacológicos de los complejos CDK/ciclina.

El papel fundamental de las CDKs en el control del ciclo celular y las relaciones establecidas entre diversas patologías y la desregulación de los complejos CDK/ciclina ha fomentado el desarrollo de inhibidores de estos complejos con fines terapéuticos. Se pueden distinguir dos grandes grupos de inhibidores de los complejos CDK/ciclina; los inhibidores cuyo mecanismo de acción se puede considerar como competitivo por ATP y los no competitivos. A continuación describiremos los miembros más representativos de ambas familias de inhibidores.

1.1.4.1. Inhibidores competitivos de ATP.

Los inhibidores de CDK/ciclinas ATP-competitivos compiten, como su nombre indica, por el sitio de unión de ATP de la CDK. Actualmente se han desarrollado dos generaciones de este tipo de inhibidores. La primera generación de inhibidores donde se incluyen las estaurosporinas, la olomoucina o isopentanyladina presentan baja especificidad y afectan por tanto a un gran número de quinasas. Esto dificulta su aplicación clínica debido al gran número de efectos secundarios que se derivan de su aplicación. La segunda generación presenta una especificidad mejorada e incluye inhibidores como alvocidib (flavopiridol, Sanofi Aventis) (Dickson y Schwartz, 2009), seliciclib (R-roscovitina, CYC202 Cyclacel) (McClue *et al.*, 2002), PD-0332991 (Pfizer) (Flaherty *et al.*), SNS032 (BMS) (Wu *et al.*, 2012); alguno de ellos se encuentran actualmente en distintas fases de desarrollo clínico (Meijer y Raymond, 2003; Sharma *et al.*, 2008) (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Inhibidores ATP competitivos

Compuesto	Estructura	Mecanismo de Acción	Fase Clínica	Efectos adversos	Farmacéutica
Alvocidib (flavopiridol, HMR 1275)		Inhibidor de CDK1, 2, 4, 6 y 9	Fase I y II en tumores sólidos y neoplasias hematológicas.	Neutropenia, trombocitopenia, náuseas, vómitos, y anomalías en los electrolitos.	Sanofi Aventis
Seliciclib (1, R-Roscovitina, CYC202)		Inhibidor de CDK1, 2, 4, 6, 5, 7 y 9	Fase I y II en combinación con quimioterapia para neoplasias de células B, carcinoma nasofaríngeo y en cáncer de pulmón.	Náuseas, vómitos, astenia y aumentos transitorios de creatinina sérica y disfunciones hepáticas	Cyclacel Pharmaceuticals Inc.
UCN-01 (7-Hydroxystaurosporine)		Inhibidor de CDK1 y 2	Fase I en tumores sólidos y en síndromes mielodisplásicos y en fase II en melanoma metastásico.	Dolores de cabeza, náuseas, vómitos, hipoxemia y la hiperglucemia.	Drug Synthesis and Chemistry Branch. Development Therapeutic
PD-0332991		Inhibidor de CDK4 y 6	Fase I y II en tumores sólidos y pacientes con cáncer avanzado.	Mielosupresión	Pfizer
SNS-032 (BMS-387032)		Inhibidor de CDK 2, 7 y 9	Fase I en tumores sólidos y leucemia.	Mielosupresión	Sunesis Pharmaceuticals
P276-00		Inhibidor de CDK 2, 7 y 9	Fase I y II en cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello avanzado, y otras neoplasias avanzadas.	Hiperglucemia, fatiga, diarrea, elevación de la creatinina elevación y anemia.	Piramal Healthcare Limited
Dinaciclib (SCH 727965)		Inhibidor de CDK1, 2, 5 y 9	Fase I y II en tumores sólidos y neoplasias hematológicas y en fase III para leucemia linfocítica crónica.		Schering-Plough

Alvocidib, (flavopiridol) es una flavona sintética (N-methylpiperidinyl chlorophenyl) que inhibe principalmente CDK9, por lo que tiene efecto sobre la transcripción provocando la disminución en RNA polimerasa II, ciclinas (ciclina D), reguladores del ciclo celular (p21) y otras CDKs (CDK 2, 4, y 6), así como aquellas proteínas que median la respuesta antiapoptótica como MCL-1 y XIAP. Todas estas alteraciones provocan la detención del ciclo celular, en la transición G1/S y en G2/M, lo que desencadena la apoptosis de células tumorales tras el tratamiento. Hay varios estudios con este compuesto que se encuentran actualmente en fase I y II en tumores sólidos y neoplasias hematológicas (Bose *et al.*, 2012; Dickson y Schwartz, 2009). Flavopiridol ha sido estudiado solo y en combinación con otros fármacos. Por ejemplo, se ha estudiado su sinergismo con Vorinostat (un inhibidor de las histona desacetilasas) (Dickson

et al., 2011); en combinación con oxaliplatino (agente alquilante) y fluorouracilo (interviene en la síntesis de DNA) y también con docetaxel (inhibidor de la división celular) (Carvajal *et al.*, 2009). Sin embargo, se han descrito reacciones secundarias a los tratamientos (Rathkopf *et al.*, 2009).

Seliciclib (CYC202 o R-roscovitina), inhibe los complejos CDK3/ciclina C, CDK2/ciclina E, CDK2/ciclina A, CDK1/ciclina A y CDK2/ciclina B; bloqueando la proliferación celular en G₀, G₁, S, G₂ y M y el complejo CDK7/ciclina (CAK) evitando la fosforilación que activa las diversas CDK. La interacción directa de roscovitina con CDK7/ciclina H y CDK9/ciclina T conduce a la inhibición de la RNA polimerasa II (por falta de fosforilación en Ser2 y Ser5 del dominio C terminal, respectivamente). En consecuencia, se reduce la transcripción y en particular la de factores de supervivencia como MCL-1, survivina y XIAP (Kim *et al.*, 2004), se inhibe la expresión MDM2 y por lo tanto la degradación de p53 (Lu *et al.*, 2001; Malumbres y Barbacid, 2009). Además, roscovitina inhibe las MAP-quinasas ERK1 y ERK2, y los miembros de la familia de la caseína quinasa 1 (CK1), lo que contribuye a sus efectos antiproliferativos (Meijer *et al.*, 1997). Roscovitina, se encuentra actualmente en ensayos clínicos en fase I y II en combinación con quimioterapia para neoplasias de células B, carcinoma nasofaríngeo y en cáncer de pulmón. El fármaco es de administración oral (Hsieh *et al.*, 2009) y entre los efectos secundarios más comunes se encuentran náuseas, vómitos, astenia y aumentos transitorios de creatinina sérica y disfunciones hepáticas (Le Tourneau *et al.*, 2010).

1.1.4.2. Inhibidores no competitivos de ATP.

El sitio de unión al ATP se encuentra altamente conservado a través de toda la familia de las proteínas quinasas por lo que es difícil desarrollar inhibidores competitivos de ATP específicos para una determinada familia de quinasas. Teniendo en cuenta que en la célula existen más de 500 proteínas quinasas, esto desencadena numerosos efectos secundarios no deseados que han

enlentecido, en algún caso, los programas de desarrollo preclínico. Además, se ha descrito que las dosis tolerables en los pacientes, son generalmente bajas (Leitch *et al.*, 2009) y se ha propuesto que la mejora de la especificidad podría ayudar a resolver estos problemas (Huwe *et al.*, 2003; Sawyers, 2003). Como alternativa, en los últimos años se han desarrollado programas dirigidos a la identificación de inhibidores de CDK/ciclina que no compitan con el sitio de unión de ATP (Tabla 1.3).

Tabla 1.3. Inhibidores ATP no Competitivos

Compuesto	Estructura	Mecanismo de Acción
Cip	YFTLQIRGERFEMFRELNE	CDK
NBI1	rwimyf-NH ₂	Ciclina A
PSTAIRE	TYTKKQVLRMEHLVLKVLTFDL	CDK
Spa310	TSPTTLYDRYSSPPASTTR	CDK 2
Peptido 1	PVKRRLLFG	Inhibe el CRM de ciclina A

Se han descrito péptidos sintéticos que interfieren en la unión de complejos CDK/ciclina con sus sustratos. Así, por ejemplo, se identificó un péptido de ocho aminoácidos (PVKRRLDL) derivado de la secuencia de E2F1 (sustrato de CDK2) y presente también en p21, que inhibe el complejo CDK2/ciclina A/ciclina E (Adams *et al.*, 1996; Kontopidis *et al.*, 2005; Lowe *et al.*, 2002). Estos estudios dieron lugar a la definición de un motivo de unión conservado (RXL) que se encuentra en diferentes sustratos de CDK2/ciclina A y es reconocido por el CRM de la ciclina (Chen *et al.*, 1999).

El sitio de unión CDK2/ciclina A con los inhibidores naturales de la familia CIP/KIP, ha sido también identificado y se han utilizado péptidos sintéticos derivados de estas secuencias que inducen una inhibición dosis dependiente de la actividad enzimática del complejo CDK (McInnes *et al.*, 2003).

Dentro de los inhibidores ATP no competitivos destaca también el péptido denominado C4 derivado de la hélice $\alpha 5$ de ciclina A (285-TYTKKQVLRMEHLVVKVLTFDL-306). C4 interacciona específicamente con el complejo CDK2/ciclina A dando lugar la inactivación del complejo, arresto celular y disminución de la proliferación tumoral en diferentes líneas tumorales (Gondeau *et al.*, 2005).

En nuestro grupo se desarrolló, mediante química combinatoria, un programa de identificación de inhibidores del complejo CDK2/ciclina A, no dirigidos al sitio de unión del ATP identificándose un hexapéptido inhibidor (rwimyf-NH₂ - NBI1). NBI1 inhibió la actividad catalítica de los complejos CDK2/ciclina A (IC₅₀: 1.1 μ m), CDK1/ciclina B1 (IC₅₀: 2.9 μ m), y CDK6/ciclina D3 (IC₅₀: 6.4 μ m) y se demostró que no se une al CRM y no compite con el sitio de unión de ATP (Canela *et al.*, 2006). Mediante modelado molecular se propuso que NBI1 se une a ciclina en una región altamente conservada entre los aminoácidos 257 y 345, que comprende las hélices $\alpha 3$, $\alpha 4$, y $\alpha 5$. La presencia de NBI1 impediría la correcta interacción entre la ciclina y CDK (Fig. 1.9). Además, se diseñó un derivado con capacidad de permear células, mediante la fusión de NBI1 al péptido TAT (YGRKKRRQRRRG - residuos 48-57 derivados de la proteína “*trans-activating transcriptional activator*” del virus de la inmunodeficiencia humana-1) (Canela *et al.*, 2006; Wadia *et al.*, 2004). TAT-NBI1 induce arresto del ciclo celular, principalmente en la fase S, acompañado por un aumento en la población sub-G1 en células tumorales que se puede correlacionar con la inhibición de la actividad CDK2-ciclina (Canela *et al.*, 2006; Kirkland y McInnes, 2009; Orzaez *et al.*, 2009).

El primer objetivo de este trabajo consistió en completar la caracterización del mecanismo de acción de NBI-1 y TAT-NBI-1 tanto en estudios *in vitro* como en sistemas celulares.

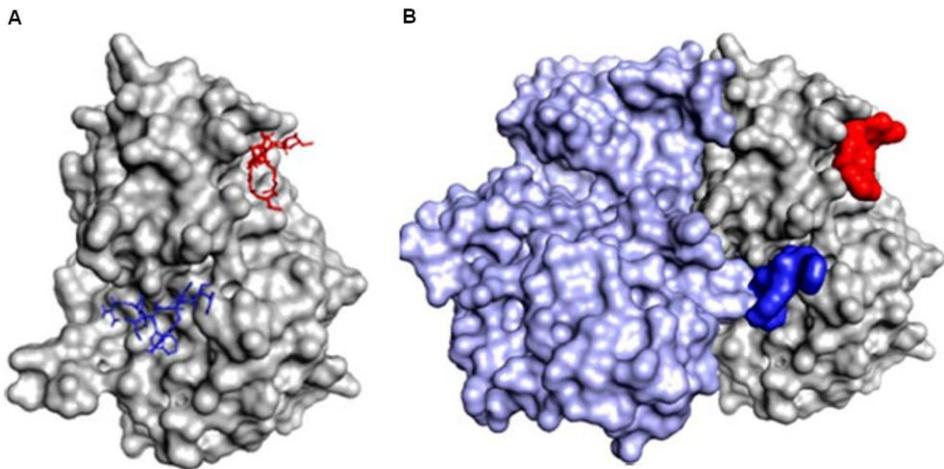


Figura 1.9. Interacción de NBI1 con el complejo CDK/ciclina A. A. Representa la estructura de ciclina A en gris, el CRM en rojo y el sitio de unión de TAT-NBI1 en azul. B, Representación del complejo CDK2(violeta)/ciclina A (gris) y su interacción con TAT-NBI1 (figura tomada de (Canela *et al.*, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSION

Inhibidores sintéticos
(farmacológicos) del ciclo celular

CAPITULO 1

1.2 RESULTADOS

1.2.1. Caracterización de NBI1

La capacidad de inhibición de complejos CDK/ciclina del péptido TAT-NBI1, había sido previamente caracterizada mostrando capacidad de inhibir los complejos CDK2/ciclina A, CDK1/ciclina B, el complejo CDK6/ciclina D3 en menor medida y mostrando valores de inhibición muy limitados frente al complejo CDK2/ciclina E (Canela *et al.*, 2006). En este estudio se amplió la caracterización del inhibidor TAT-NBI1, incluyendo nuevos complejos CDK/ciclina en el panel de quinasas estudiadas frente a este péptido. Se analizó así la capacidad de TAT-NBI1 de inhibir los complejos CDK5/p35; CDK7/ciclina H y CDK9/ciclina T1 (Tabla 1.4). Para ello se realizó un ensayo quinasas en los servicios de la casa comercial CEREP. Este ensayo consistió en el uso de un péptido modificado con una sonda de emisión (Uligth-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-amide) como sustrato para la caracterización de la actividad quinasas de los complejos CDK/ciclina objeto de estudio. El inhibidor TAT-NBI1 es adicionado a diferentes concentraciones e incubado con un anticuerpo antifosfopéptido conjugado al fluoróforo europium. La intensidad de fluorescencia emitida por la sonda peptídica es proporcional al nivel de sustrato fosforilado (ver apartado 5.1.2.1 de materiales y métodos). Los resultados mostraron que TAT-NBI1 fue capaz de inhibir con IC50s de orden micromolar los complejos CDK5/p35 y CDK7/ciclina H, mientras que la actividad frente al complejo CDK9/ciclina T1 fue muy limitada (Tabla 1.4). La diferente capacidad de unión a los distintos complejos CDK/ciclina fue probablemente debida a la diferente estructura que poseen las ciclinas en la región de unión el péptido, como ocurrió en el caso de ciclina E en la que se describió que la ausencia del bolsillo hidrofóbico

responsable de la unión del péptido dificulta su interacción (Canela *et al.*, 2006).

Tabla 1.4. TAT-NBI1 inhibe diferentes complejos CDK/ciclina

Complejo	IC50 (μ M)
CDK2/ciclina A	1
CDK1/ciclina B1	2
CDK5/ p35	7
CDK6/ciclina D3	6
CDK7/ciclina H	1
CDK9/ciclina T1	50
CDK2/ciclina E	51

1.2.2. Caracterización del sitio de unión de TAT-NBI1

En estudios previos de modelado molecular, se había propuesto la existencia de 2 cavidades en la estructura de ciclina A que podrían estar implicadas en la interacción con TAT-NBI1. En dichas cavidades se identificaron como residuos importantes los siguientes: Gln228, Asn229 (hélice α 3); Asn312, Gln313 (hélice α 6); Met334 (hélice α 7) y Lys417 (en el extremo COOH-terminal) (Brown *et al.*, 1995). Para confirmar la intervención de estos residuos, en el sitio de unión de NBI1, se procedió a realizar mutagénesis dirigida de estas posiciones en la proteína. Se realizaron para ello 2 mutantes triples de ciclina A2 humana en las que los residuos clave para esta interacción fueron sustituidos por alanina. En el primer mutante denominado NQM se sustituyeron la Asn312, la Gln313 y la Met334 por alanina y en el segundo mutante QNT se sustituyeron la Gln228, la Asn229 y la Thr316 por alanina (Fig. 1.10).

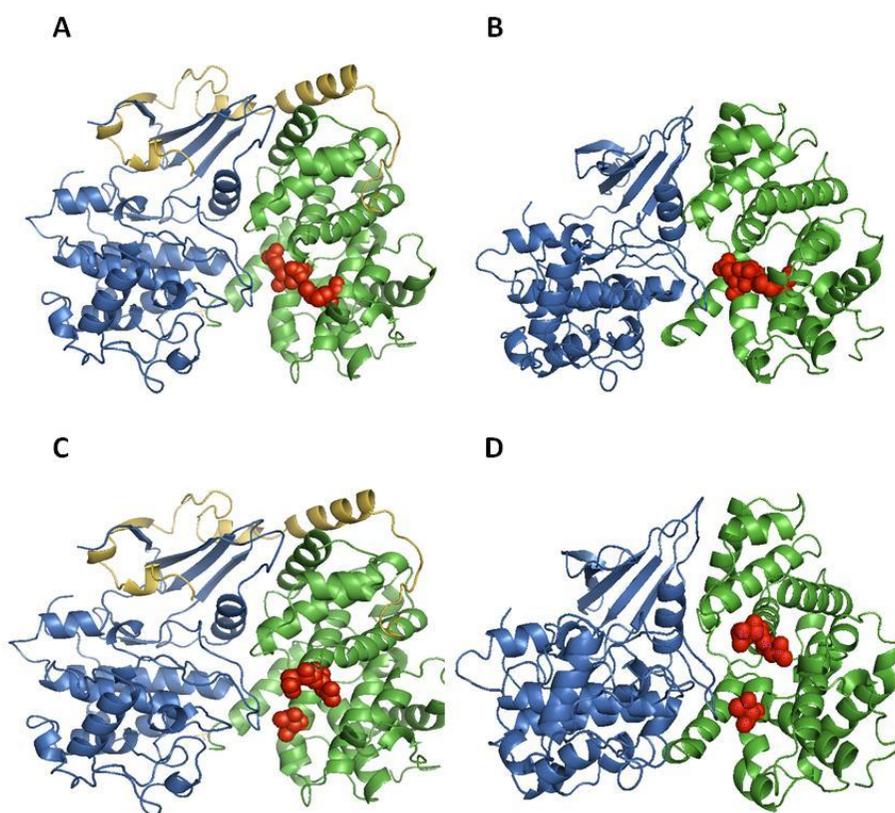


Figura 1.10. Mutagénesis dirigida de ciclina A2 humana. Estructura del complejo CDK2/ciclina A en el que se resaltan en color rojo los aminoácidos que han sido en cada caso mutados a alanina. A –B. Mutante NQM. C-D. Mutante QNT. En A y C, el complejo CDK2/ciclina A en presencia del inhibidor p27. En B y D, la estructura del complejo CDK2/ciclina A en ausencia de su inhibidor natural. En azul se presenta CDK2, en verde ciclina A, en marrón p27.

Se procedió a la expresión y purificación de ciclina A2 humana (Fig. 1.11 A y B) y de sus mutantes en *Escherichia coli* (*E. coli*). Sin embargo, el mutante QNT no se consiguió purificar a pesar de probar diferentes cepas de *E. coli*, diferentes tiempos y temperaturas de inducción. Por el contrario, el mutante NQM se expresó y purificó (Fig. 1.11C y D) mediante cromatografía de afinidad de Ni-agarosa gracias a la presencia de una cola de 6 Histidinas en la construcción original.

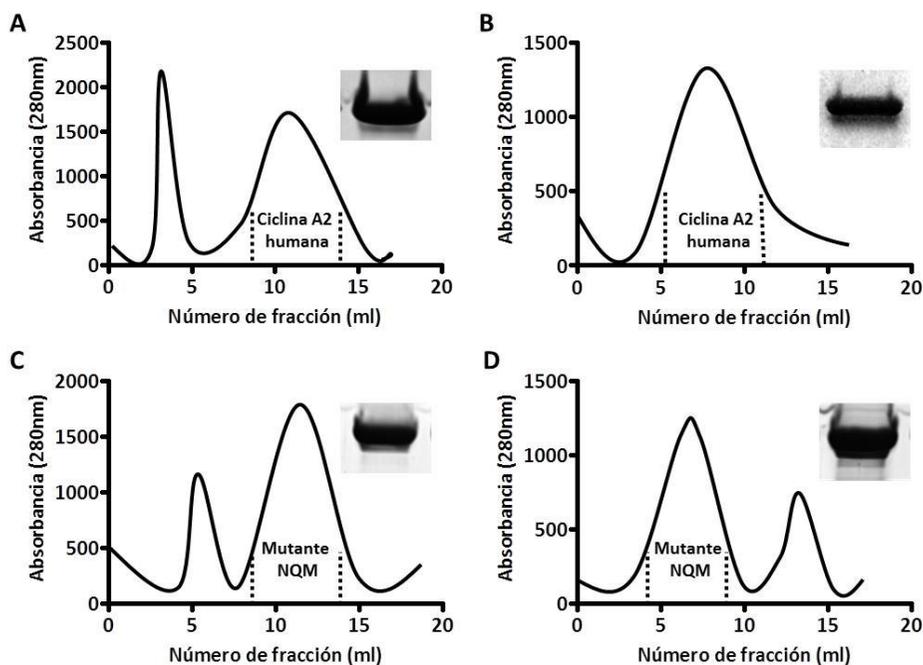


Figura 1.11. Expresión y purificación de ciclina A. A. Purificación por afinidad en columna de Ni-agarosa de: A. ciclina A2 humana, C. Mutante NQM. Purificación por intercambio aniónico. B. Ciclina A2 humana, D. Mutante NQM. En parte superior de cada gráfica, se presenta un SDS-PAGE de la proteína tras su purificación por esta cromatografía.

Para determinar el correcto plegamiento tanto de ciclina A2 humana, como del mutante NQM, se utilizó dicroísmo circular (DC). Esta técnica espectroscópica, provee información acerca de la estructura proteica secundaria, diferenciando entre α -hélices, hojas β , giros β y estructuras desordenadas ("random coil"). Así pues, las proteínas fueron analizadas por DC. La preparación de las muestras y los parámetros utilizados se detallan en el apartado 5.1.2.3 de materiales y métodos. Los resultados de los espectros de DC, mostraron la existencia de un doble mínimo a 222 nm y 208 nm, indicativo del plegamiento proteico en α -hélice. El análisis cuantitativo de estos datos utilizando el programa K2D3 de predicción de estructura secundaria a partir de datos generados mediante DC corroboró estos resultados (Louis-Jeune *et al.*, 2011) (Fig. 1.12A). Sin embargo

la ciclina A2 humana y la ciclina mutante NQM, difieren ligeramente en su espectro de dicroísmo lo que nos indicó que la triple mutación NQM podría afectar al plegamiento global de la proteína.

Con el objetivo de determinar si los residuos mutados de la construcción NQM eran relevantes para la interacción de ciclina A con TAT-NBI1, se diseñaron experimentos de anisotropía de fluorescencia. Esta técnica permite estudiar los movimientos rotacionales de las moléculas. Dado que los tiempos de correlación rotacional dependen del tamaño molecular se pueden estudiar interacciones entre moléculas, ya que el tiempo de correlación rotacional aumenta cuando hay una interacción o formación de complejos. Para llevar a cabo estos experimentos, se sintetizó un derivado fluorescente de TAT-NBI1 (CF-TAT-NBI1), que posee una unión covalente entre el extremo N-terminal del péptido y el fluoróforo 5-carboxifluoresceína. De este modo, se realizó un ensayo de polarización de fluorescencia para analizar la capacidad de interaccionar de dicho péptido con ciclina A2 humana y con su triple mutante NQM. Para ello se incubó CF-TAT-NBI1 (60nM) con concentraciones crecientes de las proteínas y se analizó la anisotropía de fluorescencia para cada uno de las muestras según se detalla en el apartado 5.1.2.2 de materiales y métodos. Las curvas de unión a CF-TAT-NBI1 muestran la interacción diferencial del péptido con ambas proteínas. Así, se observa que mientras que la IC₅₀ del péptido en la unión a ciclina A2 humana es de 0.16 μ M, la IC₅₀ observada para el mutante NQM es de 8 μ M (Fig. 1.12B). Este resultado, apoyaría los resultados del modelado molecular que sitúan el sitio de unión del péptido a ciclina A en esta región. Sin embargo, no podemos obviar el hecho de que ambas proteínas presentan diferencias de partida en su estructura secundaria, que pueden estar interfiriendo en los resultados de polarización.

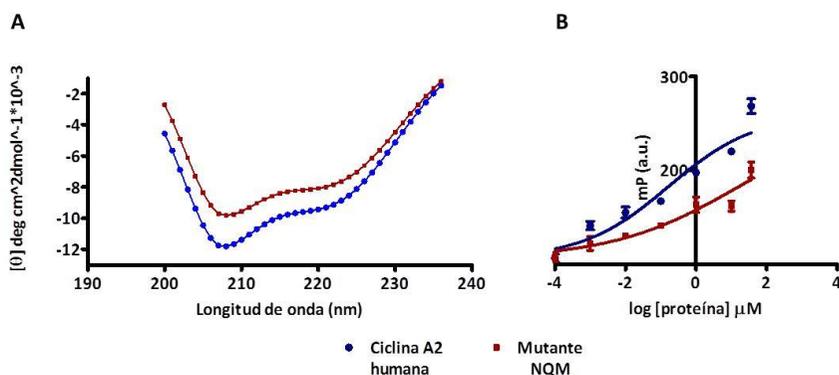


Figura 1.12. Caracterización de la ciclina A2 humana y del mutante NQM de ciclina A2 humana. A. Determinación de la estructura secundaria de las proteínas por DC (3 μM de cada proteína en 20 mM tampón fosfato a 25°C). Los datos se muestran como (media \pm s.d. ; n=3). B. Capacidad de unión de CF-TAT-NBI1 a ciclina A. CF-TAT-NBI1 (60nM) fue incubado a 30°C durante 15 min con concentraciones crecientes de ciclina A2 humana, o del triple mutante NQM. Los cambios en anisotropía de fluorescencia se monitorizaron en un espectrofluorímetro Victor 2 (máximo de absorción a 380 nm y un máximo de emisión a 580 nm).

Para tratar de obtener resultados que de forma inequívoca nos situaran al péptido en la superficie de ciclina A se intentó cristalizar ciclina A2 humana (en colaboración con el Dr Alberto Marina del IBV-CSIC) en presencia y ausencia de NBI1. Para ello, en primer lugar se trató de realizar la incubación directa de ciclina A2 humana con NBI1 con la intención de purificar el complejo mediante cromatografía y proceder a su cristalización. Sin embargo, esta unión indujo agregación de la proteína. Para tratar de solucionar este problema de agregación se trató de adicionar un fragmento de la proteína inhibidora p21 (Ac-FYHSKRRLIFS-NH2 (Atkinson *et al.*, 2002)) que proporciona estabilidad a ciclina A2. Así pues, se incubó la proteína con ambos péptidos en relación molar 1:2.5:2.5 ciclina A2 humana, NBI1 y p21, respectivamente. Para llevar a cabo la purificación del complejo, se utilizó una columna de cromatografía de exclusión molecular superdex 200. Se obtuvo de esta forma un complejo soluble entre ciclina A humana, NBI1 y p21, que fueron identificados en el mismo pico cromatográfico mediante espectrometría de masas (Fig. 1.14A).

Dicho complejo fue sometido a procesos de cristalización en tampón 20 mM de Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 3 mM KCl y 5% de glicerol. Sin embargo, no se consiguieron cristales estables del complejo que permitieran realizar los estudios de difracción de rayos X.

La comparación de la estructura de la ciclina A2 humana en el complejo CDK2/ciclina A2 (Jeffrey *et al.*, 1995), con la estructura cristalina de ciclina A3 bovina (Brown *et al.*, 1995), revela que no hay cambios estructurales significativos entre las formas libre y unida a CDK2 de ciclina A. Se ha descrito que la ciclina A3 bovina es más estable que ciclina A2 en ausencia de CDKs. Se procedió a intentar la cristalización de ciclina A3 en presencia y ausencia de NBI1. Para la cristalización de ciclina A3 bovina se utilizó la región de aminoácidos 171-432, eliminando el N-terminal de la ciclina en donde se sitúa la caja de destrucción, la cual es requerida para degradación mediada por la ubiquitinación. Se ha descrito que con esta construcción se evita la proteólisis de la muestra y por tanto se favorece la formación de cristales (Brown *et al.*, 1995). Para ello, se expresó ciclina A3 bovina en *E. coli* como se describe en el apartado 5.2.2.1(c) de materiales y métodos y se purificó mediante cromatografía de afinidad de Ni-agarosa e intercambio iónico (Fig. 1.13).

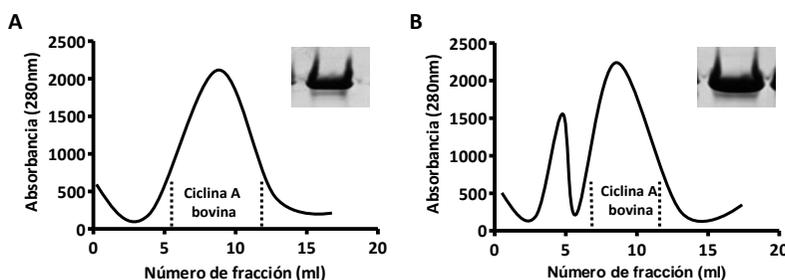


Figura 1.13. Expresión y purificación de ciclina A3 bovina. A Purificación de ciclina A3 bovina por A. Cromatografía de afinidad en columna de Ni-agarosa. B. Purificación por cromatografía de intercambio aniónico. En la parte superior de cada gráfica, se presenta un SDS-PAGE de la proteína tras su purificación por esta cromatografía.

El primer objetivo fue cristalizar ciclina según el método descrito por Brown y colaboradores (Brown *et al.*, 1995) y proceder a incubar el cristal con NBI1, sin embargo no se consiguió la obtención de cristales estables. Por ello, el segundo objetivo consistió en la purificación del complejo ciclina A3 bovina/NBI1 y su posterior cristalización. Tras incubar ciclina A3 bovina (160 μM) en presencia de péptido liofilizado en relación molar 1:1 durante 30 minutos a 37°C se purificó el complejo ciclina A3/NBI1 mediante una columna de cromatografía de exclusión molecular superdex 200. Por espectrometría de masas se detectó la presencia del péptido NBI1 en el pico de exclusión correspondiente a ciclina A3 (Fig. 1.14B), indicando que el complejo se había formado. Sin embargo, no se consiguió cristalizar.

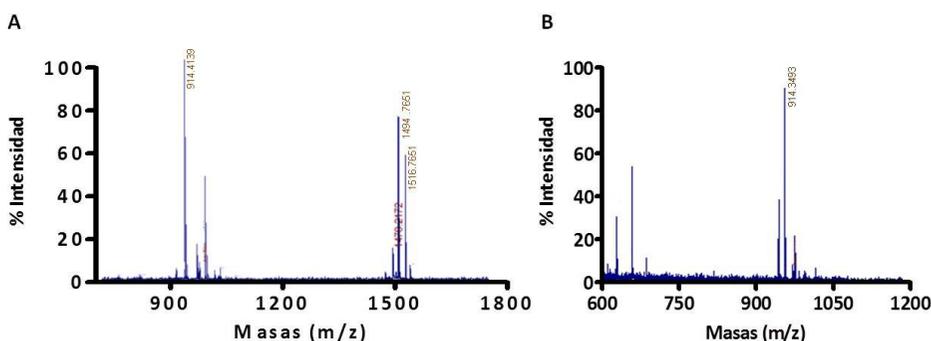


Figura 1.14. Caracterización del complejo ciclina y NBI1. Espectrometría de masas del complejo formado por A. ciclina A2 humana, NBI1 (peso molecular: 914 Da) y p21 (peso molecular: 1491 Da). Se muestran los resultados de los espectros de masas de los péptidos obtenidos en el mismo pico cromatográfico de ciclina A2. B. ciclina A3 bovina y NBI1. Se muestran los resultados de los espectros de masas del péptido obtenidos en el mismo pico cromatográfico de ciclina A3.

1.2.3. TAT-NBI1 induce muerte celular en un panel amplio de líneas celulares

Con el fin de determinar el espectro de acción de TAT-NBI1 se trató de ampliar el panel de líneas celulares tumorales sobre las que se estudió el efecto del

compuesto. Para ello, se analizó la viabilidad de diferentes líneas celulares tumorales, tras tratarlas con diferentes dosis de TAT-NBI1. Las líneas tumorales utilizadas fueron: HL-60 de leucemia promielítica humana; Jurkat, linfocitos T de leucemia linfocítica aguda; Saos-2, osteoblastos derivados de un osteosarcoma primario; A549, derivadas de cáncer de pulmón de célula no pequeña y MCF-7, MDA-MB-468 y SKBr-3 de cáncer de mama. Se incluyó también el estudio una línea de fibroblastos humanos con el fin de determinar la especificidad de los compuestos frente a líneas no tumorales.

Se estudio la viabilidad celular después de 24 horas de tratamiento con TAT-NBI1 utilizando ensayos de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Se analizaron 8 concentraciones diferentes, para cada una de las líneas celulares por triplicado, obteniéndose una curva de dosis respuesta para cada caso. Esto nos permitió el cálculo de la IC50 (concentración de TAT-NBI1 a la que la viabilidad celular se reduce al 50%) para las diferentes líneas tumorales que se muestra en la Tabla 1.5. Los resultados revelaron que TAT-NBI1 fue capaz de inducir muerte celular de forma dependiente de dosis en un amplio panel de líneas tumorales, mostrando IC50s en el rango de 10-20 μM . La IC50 determinada para fibroblastos humanos, fue 4 veces superior a la determinada para el resto de líneas tumorales (81 μM) (Tabla 1.5), dejando abierta la posibilidad de existencia de una ventana terapéutica para el tratamiento tumoral.

Tabla 1.5. IC50 de TAT-NBI1 en diferentes líneas celulares

Línea celular	Tipo de Tumor	TAT-NBI1 IC50 (μM)	
		MTT	TB
HL60	Leucemia	15	15
Jurkat	Leucemia de células T	17	14
Saos-2	Osteosarcoma	10	13
MCF-7	Adenocarcinoma de	11	10
MDA-MB-468	Adenocarcinoma de	15	17
SKBr-3	Adenocarcinoma de	10	11
A549	Carcinoma de pulmón	18	20
Fibroblastos	No tumoral	81	nd

nd: no determinado.

Para comprender el mecanismo de acción de TAT-NBI1 en el contexto celular se estudió con más detalle el mecanismo de internalización y la localización subcelular de TAT-NBI1 en la línea tumoral de osteosarcoma Saos-2. Para ello, estas células fueron incubadas con CF-TAT-NBI1 (25 μM) durante 2 h, y la internalización del péptido fue analizada mediante microscopía confocal *in vivo*. Las imágenes de microscopía mostraron que el fármaco es interiorizado por la célula y alcanza el núcleo (Fig. 1.15A), donde posiblemente se une al complejo CDK/ciclina para ejercer su función.

Por otra parte, los estudios en otras líneas celulares mostraban que el mecanismo de muerte celular inducido por TAT-NBI1 era apoptosis (Canela *et al.*, 2006). La liberación de citocromo c mitocondrial es uno de los pasos que conducen a la célula a muerte por apoptosis. Por ello, y para confirmar que en Saos-2 el mecanismo de muerte era también éste, se estudió mediante inmunocitoquímica la localización de citocromo c tras el tratamiento con TAT-NBI1. En estos estudios se observó la aparición de una población celular que libera el citocromo c al citosol tras 24 horas de tratamiento (TAT-NBI1 - 10 μM)(Fig. 1.15B), indicando que el mecanismo de muerte ocurre por apoptosis también en esta línea celular.

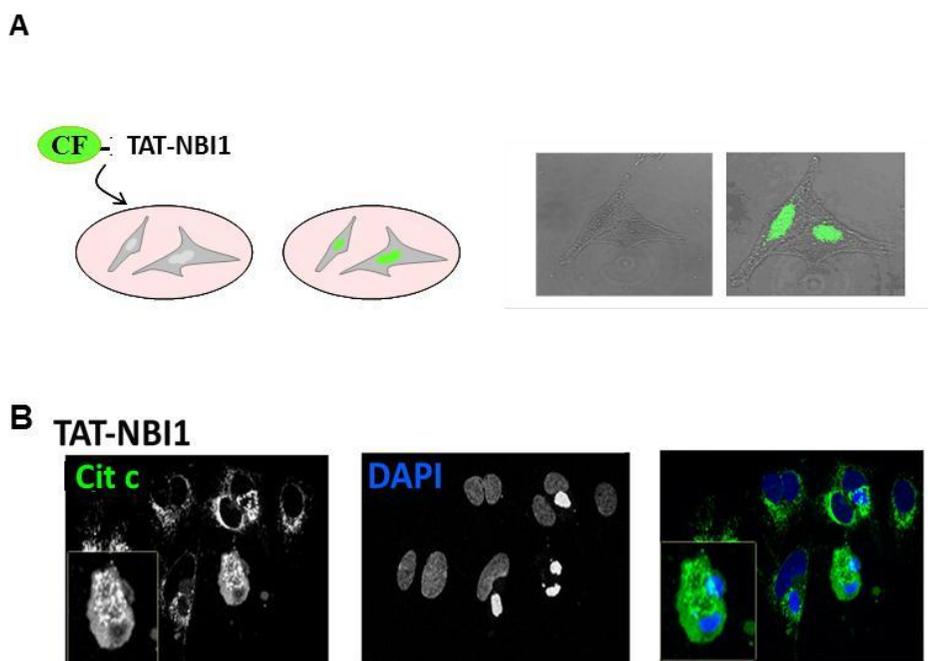


Figura 1.15. TAT-NBI1 se internaliza en las células e induce apoptosis. A. Imagen de microscopía confocal *in vivo* de células Saos-2 incubadas 2 horas con CF-TAT-NBI1 (5 μM). Se observa una localización nuclear del compuesto. B. Imagen de microscopía confocal de una inmunocitoquímica de células Saos-2 incubadas 24 horas con TAT-NBI1 (10 μM). TAT-NBI1 induce la liberación de citocromo c (Cit c) al citosol (verde). En la imagen se muestra la morfología nuclear mediante marcaje con DAPI (azul).

Para confirmar este dato, se analizó la exposición de PS, a través del estudio de sus niveles celulares marcados con anexina-V (AnnV), una proteína que se une específicamente al fosfolípido PS. La PS se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesta en la cara externa de dicha membrana cuando comienza el proceso de apoptosis (AnnV+). Simultáneamente, se midió la incorporación de yoduro de propidio (PI), un agente intercalante de DNA que se incorpora en las células después de la aparición de daños de la membrana celular (PI+). Por lo tanto, la combinación de la tinción de células AnnV y PI puede ser utilizada para distinguir la muerte celular apoptótica y necrótica. Las líneas celulares, HL60, Jurkat y Saos-2, fueron tratadas con diferentes

concentraciones de TAT-NBI1 (10 y 50 μM) durante 24 horas y, después del marcaje con AnnV y PI analizadas por citometría de flujo. Los resultados muestran la aparición de poblaciones celulares AnnV+ en todas las líneas estudiadas, indicando de nuevo, que el mecanismo de inducción de muerte provocada por el tratamiento con TAT-NBI1 es apoptosis (Fig. 1.16).

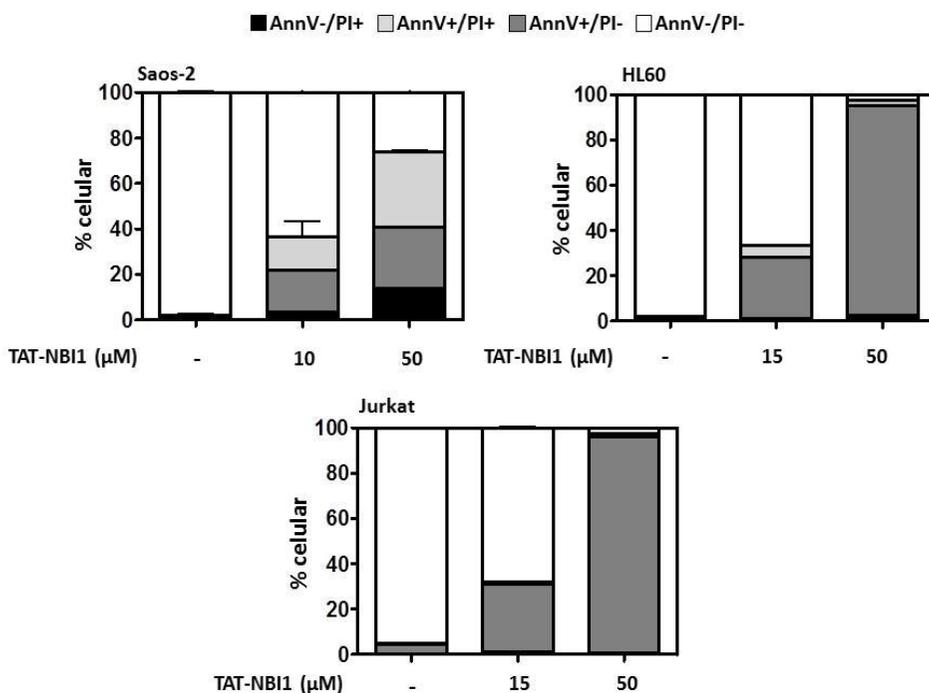


Figura 1.16. TAT-NBI1 induce muerte por apoptosis en diferentes líneas celulares. Exposición de fosfatidilserina por marcaje con AnnV/PI tras 24 horas con TAT-NBI1 a las concentraciones indicadas en las líneas celulares Saos-2, HL60 y Jurkat. Los datos representan la media \pm s.d. de tres experimentos independientes.

1.2.4. Internalización de NBI1 mediante liposomas

El hexapéptido activo NBI1 presentaba actividad inhibitoria *in vitro* en ensayos de actividad quinasa de complejos CDK/ciclina. Sin embargo, para su internalización en células hubo que sintetizarlo fusionado a la secuencia TAT. El péptido TAT-NBI1 posee un peso molecular demasiado elevado que dificultaría determinadas aplicaciones farmacológicas. Se analizaron métodos alternativos de internalización del péptido activo NBI1 en ausencia de la secuencia TAT. Para ello, se utilizó como estrategia el encapsulamiento de NBI1 en liposomas (LP-NBI1) que actuarían como vehículo para dirigir al péptido al interior celular. Los liposomas son vesículas microscópicas formadas por una bicapa lipídica con la parte apolar orientada hacia el centro de la molécula, (donde puede contener algún principio activo) y las cabezas polares orientadas hacia el exterior de la estructura. Los liposomas se clasifican según su tamaño y número de bicapas en: los multilamelares, que tienen un tamaño entre 0.1–10 μm y poseen múltiples compartimentos acuosos concéntricos; y los unilamelares que tienen un tamaño menor a 500 nm y poseen un compartimento central polar y una sola bicapa lipídica (Chatterjee y Banerjee, 2002). La composición lipídica de los liposomas unilamelares utilizados en el presente trabajo, como vehículo del hexapéptido NBI1, constaron de fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol y colesterol en proporción 3:2:1 (Fig. 1.17 A) y se prepararon según se describe en el apartado 5.1.2.5 de materiales y métodos.

Se determinó el efecto citotóxico del péptido encapsulado en liposomas sobre líneas tumorales en las que TAT-NBI1 había mostrado actividad. Para ello, las células fueron tratadas con 8 concentraciones diferentes de LP-NBI1 (entre 0.1 y 50 μM) durante 24 horas y la viabilidad celular se analizó por MTT, obteniéndose las correspondientes curvas de dosis respuesta que nos permitieron calcular la IC₅₀ del complejo liposoma-péptido. Los resultados que se muestran en la Fig. 1.17B, indicaron que LP-NBI1 es capaz de inducir

muerte en distintas líneas celulares del mismo modo que lo hace TAT-NBI1. Sin embargo, en algunas de ellas, especialmente en aquellas que crecen en suspensión, los IC50s son superiores a los obtenidos para TAT-NBI1. La dificultad de internalizar compuestos mediante el uso de liposomas en estos tipos celulares ha sido también descrita para los sistemas habituales de transfección de DNA (Nguyen *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2009). De modo que la mayor IC50 observada puede ser reflejo de una menor dosis efectiva en el interior celular. La caracterización de la carga peptídica en los liposomas es otro parámetro a optimizar, que puede influir en la concentración efectiva del fármaco. En el laboratorio se sigue trabajando en la mejora y estandarización de estrategias que permitan trabajar con el NBI1 en ausencia de la secuencia TAT.

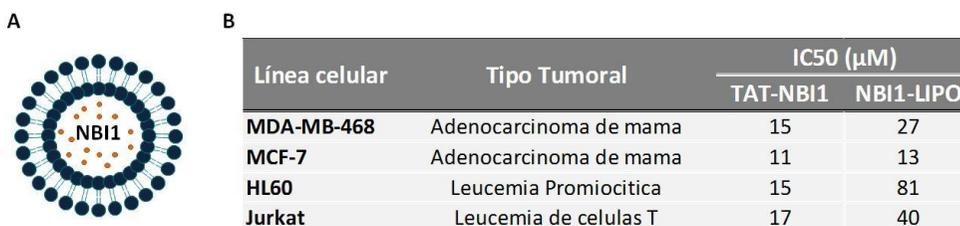


Figura 1.17. NBI1 puede ser internalizado por liposomas. A. Esquema de la formación de liposomas con NBI1. B. IC50 de LP-NBI1 en diferentes líneas celulares tumorales obtenido por MTT tras 24 horas de tratamiento.

1.3. DISCUSION

La activación de CDKs mediante su asociación con ciclinas es fundamental para el control de la progresión del ciclo celular. Estas quinasas se encuentran frecuentemente sobreexpresadas y sus reguladores muestran bajos niveles de expresión, en procesos tumorales. El desarrollo de nuevos agentes sintéticos que puedan restaurar las funciones alteradas de las proteínas supresoras de tumores, es uno de los objetivos centrales en la investigación del cáncer. Por lo tanto, la regulación de la actividad de los complejos CDK/ciclina se considera una diana terapéutica de interés. En este contexto, se han desarrollado inhibidores, la mayoría de los cuales compiten por el sitio de unión al ATP de las CDKs. Muchos de ellos han demostrado tener efecto antiproliferativo, sin embargo, el mecanismo de inhibición de estas moléculas afecta a regiones muy conservadas en las quinasas celulares lo que los hace poco específicos y augura la aparición de efectos secundarios. Es por ello, que la búsqueda de inhibidores específicos de estos complejos continúa siendo un campo activo de investigación (Bach *et al.*, 2005; Lowe *et al.*, 2002).

Para explorar la búsqueda de inhibidores alternativos del complejo CDK/ciclina se inició una campaña de cribado de péptidos bioactivos capaces de ejercer dicha inhibición sin afectar al sitio de unión de ATP, ni al CRM (Canela *et al.*, 2006). Se seleccionó NBI1 (rwmyf-NH₂), para el que se propuso como mecanismo de acción la capacidad de alterar la conformación de algunos complejos CDK/ciclina mediante su unión a una hendidura en la superficie de ciclina (Canela *et al.*, 2006). En este trabajo se han aportado datos basados en estudios de polarización de fluorescencia utilizando el triple mutante NMQ de

ciclina A frente al cual aumenta la IC50 de TAT-NBI1 sugiriendo una menor afinidad. Por tanto, las mutaciones en la hendidura de ciclina A afectan a la unión del péptido y por tanto refuerzan la hipótesis de partida. Los estudios de cocrystalización de ciclina A con NBI1 han resultado infructuosos aunque seguimos trabajando para tratar de obtener cristales y confirmar de este modo el sitio de unión del péptido. En el contexto celular, la adición de la secuencia TAT, facilita la internalización del hexapéptido que, de esta forma, es capaz de alcanzar el núcleo e inducir muerte celular por apoptosis en diversas líneas celulares de tumores muy variados (Fig. 1.16, Tabla 1.5 y Fig. 1.18). Así, TAT-NBI1 podría ser una nueva clase de inhibidor del complejos CDK/ciclina, teniendo como ventaja, que su mecanismo de inhibición se debe a la unión a ciclina y no a la CDK, lo que podría representar una mejora en selectividad frente a quinasas no relacionadas.

Por otra parte, y en vistas a un posible desarrollo como fármaco, se exploró la internalización del péptido independiente de la secuencia TAT, mostrando que la internalización mediada por liposomas es posible y que el péptido mantiene su actividad (Fig. 1.17 y Fig. 1.18). A pesar de que en la actualidad no existe ningún fármaco inhibidor de CDKs aprobado por la FDA, numerosos ensayos clínicos para el tratamiento de tumores muy diversos se encuentran en marcha con este tipo de inhibidores. Las empresas farmacéuticas siguen tratando de mejorar la selectividad de estos fármacos para evitar efectos adversos no controlados. La búsqueda de sitios alternativos al lugar de unión de ATP es una alternativa razonable para mejorar la selectividad y en este sentido, NBI1 ofrece un nuevo sitio de unión que permite la desestabilización del complejo CDK/ciclina y por tanto, su inactivación, sin afectar al centro activo del enzima posiblemente, evitando o disminuyendo los efectos secundarios de los inhibidores de CDKs actuales.

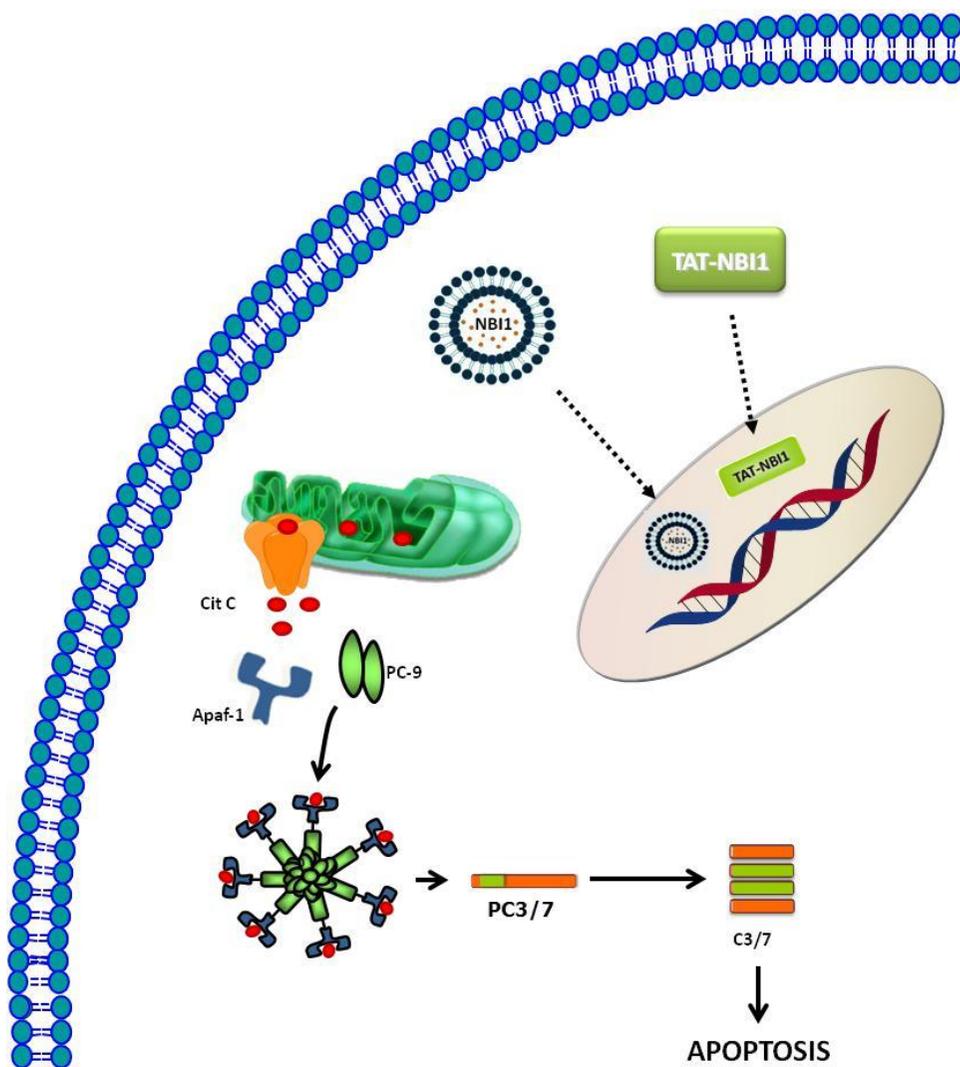


Figura 1.18. Esquema del modelo de activación de apoptosis tras el tratamiento con TAT-NB11 o LP-NB11. El tratamiento con TAT-NB11 induce la activación de la vía intrínseca de apoptosis.

CAPITULO 2

TAT-NBI1, sensibiliza células tumorales resistentes a erlotinib

2.1. INTRODUCCION

2.1.1. EGFR

El crecimiento y el desarrollo de células tumorales ocurre a través de múltiples eventos genéticos que causan cambios fundamentales en los mecanismos reguladores de diferenciación, proliferación, supervivencia y movilidad celular. La activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), contribuye a la supervivencia celular y su desregulación se ha visto implicada en la transformación de células tumorales (Arteaga, 2011). La familia ErbB o del EGFR está formada por cuatro receptores con actividad tirosina quinasa estructuralmente relacionados; EGFR/ErbB1/HER1; ErbB2/HER2/Neu; ErbB3/HER3; y ErbB4/HER4 (Riese y Stern, 1998). Los EGFRs son glicoproteínas de membrana, que constan de un dominio extracelular, un dominio transmembrana hidrófobo y un dominio intracelular catalítico con actividad tirosina quinasa (TKD) (Fig. 2.1). Entre los agonistas del EGFR se incluyen, entre otros, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α) y el factor de crecimiento de unión a la heparina (HB-EGF). Estos agonistas se expresan como proteínas integrales de membrana y se escinden tras el procesamiento mediado por metaloproteinasas que los liberan como ligandos solubles (Wilson *et al.*, 2009). Tras la unión de los ligandos al dominio extracelular de los EGFRs, estos homo o heterodimerizan. La dimerización desencadena la actividad tirosina quinasa del receptor lo que permite su autofosforilación, provocando el reclutamiento y fosforilación de varios sustratos intracelulares, que desencadenan la activación de vías de señalización tales como la ruta de RAS (“*retrovirus-associated DNA sequences*”), de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), de la

proteína quinasa SRC, del transductor de señales y activador de la transcripción (STAT 5/3), de la fosfolipasa C (PLC γ), de la proteína quinasa C (PKC), o de las fosfoinositol 3-quinasas (PI3-K).

El EGFR se internaliza al núcleo y participa en el control de la proliferación celular, la replicación, reparación del DNA (Wang *et al.*, 2006) y regulación transcripcional de genes tales como: *ciclina D1* (Diehl, 2002; Lin *et al.*, 2001), *la óxido nítrico sintasa (iNOS)* (Lo *et al.*, 2005), *el oncogen B de mieloblastosis (B-MYB)* (Hanada *et al.*, 2006), *aurora quinasa A (Aurora-A)* (Hung *et al.*, 2008), *la ciclooxigenasa-2 (COX-2)* (Lo *et al.*, 2010), *el oncogén mielomatosis celular (c-MYC)* (Jaganathan *et al.*, 2011) y *la proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP)* (Brand *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2011; Wang y Hung, 2012). La aparición de EGFR en el núcleo se asocia con un mal pronóstico clínico en diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, cáncer de ovario y carcinoma de células escamosas de la orofaringe y esófago (Lo, 2010; Lo *et al.*, 2005). Bajo condiciones celulares normales, esta familia de receptores se encarga de la regulación de procesos de proliferación celular, diferenciación, transcripción, motilidad y apoptosis. Sin embargo, en condiciones patológicas su sobreexpresión se ha asociado al desarrollo de angiogénesis, procesos tumorigénicos y metástasis. Por otra parte, la carencia de estos receptores conduce a la aparición de procesos neurodegenerativos, tales como esclerosis múltiple o Alzheimer (Lemmon, 2009).

2.1.1.1. Inhibidores de EGFR

La implicación de la activación descontrolada de los receptores de EGFR, en el desarrollo de procesos cancerígenos, ha determinado una intensa búsqueda de inhibidores para este tipo de receptores.

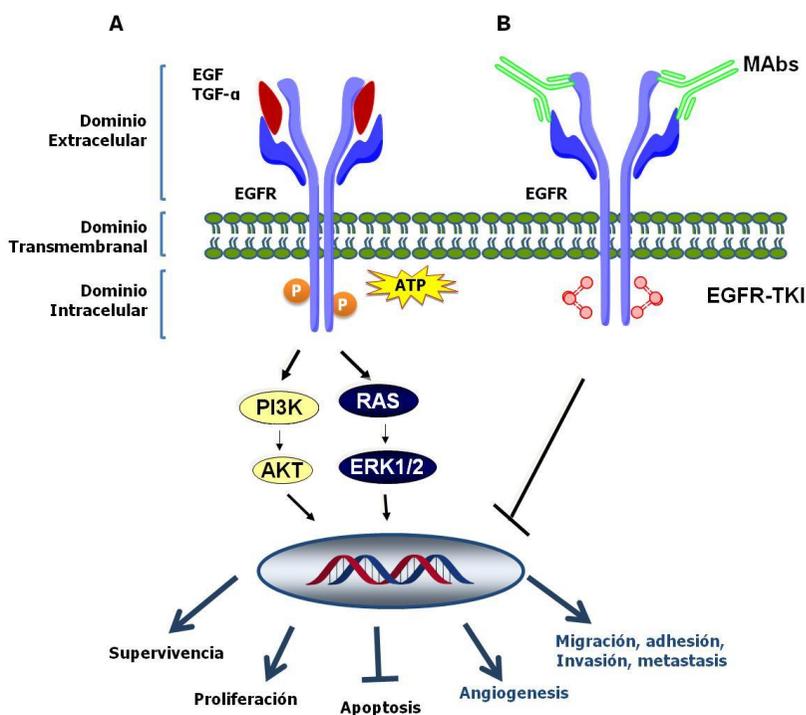


Figura 2.1. Estructura de los receptores EGFR y mecanismos de inhibición. A. Los ligandos del EGFR se unen al dominio extracelular del EGFR, inducen la dimerización del receptor y activan las vías de señalización cruciales para la supervivencia y proliferación celular. B. Inhibidores del EGFR. Los MAbs, impiden la unión del ligando al dominio extracelular del EGFR. Mientras que los EGFR-TKI, se unen al dominio intracelular, bloqueando la actividad tirosina quinasa. La inhibición bloquea las vías de señalización mediadas por el EGFR.

Dos clases de inhibidores de EGFR están actualmente en uso clínico: anticuerpos monoclonales (MAbs) que se dirigen al dominio extracelular de la región de unión al ligando como cetuximab, (Erbix®) (Fan *et al.*, 1994), trastuzumab (Herceptin®- anti-HER2), pertuzumab, (anti-HER2) (Saxena y Dwivedi, 2012)) y moléculas orgánicas de bajo peso molecular que inhiben la actividad tirosina quinasa del receptor intracelular (TKIs) tales como gefitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®), lapatinib (GW572016, Tykerb®), canertinib (C11033) y HKI-272 (Visentin *et al.*, 2010). Las dos clases de inhibidores impiden la autofosforilación y por tanto, la activación de las vías de

señalización reguladas por EFGR (Fig. 2.1). A pesar de los evidentes avances alcanzados mediante el tratamiento con inhibidores de EGFR, es bastante común la aparición de resistencias a este tipo de fármacos. Algunos tumores parecen ser resistentes a estos fármacos de manera intrínseca mientras que otros que inicialmente responden, adquieren con frecuencia, resistencia aproximadamente 10 meses desde el inicio del tratamiento (Zahorowska *et al.*, 2009).

2.1.1.1.1. Anticuerpos monoclonales inhibidores de EGFR (MAbs)

La actividad antitumoral de los inhibidores MAbs (Tabla 2.1) se atribuye no sólo a la inhibición de la señalización mediada por EGFRs, sino también al aumento de internalización y degradación del receptor que se produce tras la unión del MAb. Además, en determinados isotipos, se ha demostrado que la fijación del MAb sobre el EGFR de la superficie de la célula neoplásica provoca que ésta se convierta en objetivo de las células efectoras inmunitarias citotóxicas tales como linfocitos asesinos naturales (NK, “*Natural Killer*”) o macrófagos, induciendo así citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Gerber, 2008; Lammerts van Bueren *et al.*, 2006). Uno de los MAbs más estudiados ha sido cetuximab, un anticuerpo monoclonal (Ig G1) quimérico (ratón-humano). La unión de cetuximab al EGFR es irreversible y facilita la internalización del receptor y su posterior degradación. Este bloqueo induce arresto del ciclo celular, aumento de p27 e inhibición del crecimiento tumoral (Saxena y Dwivedi, 2012). Se administra por vía intravenosa y está aprobado por la FDA (US Food and Drug Administration) para el tratamiento de cáncer metastásico de cabeza y cuello (HNSCC) y cáncer colorectal.

La resistencia de diferentes tipos de cáncer a MAbs es debida, con frecuencia, a la aparición de una mutación en el gen que codifica para EGFR, que afecta al

sitio de unión del MAb. Aunque otro de los mecanismos de resistencia es la aparición de mutaciones en la familia de los protooncogenes RAS (K-RAS y N-RAS) y en el gen B-RAF, de forma que se activa la cascada de RAS-RAF-MEK-ERK, de forma independiente de EGFR (Montagut *et al.*, 2012) (Fig. 2.1).

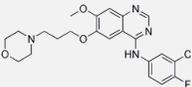
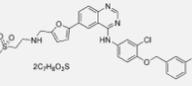
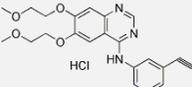
Tabla 2.1. MAb inhibidores de la familia ErbB

MABs	Mecanismo de Acción	Fase Clínica	Efectos adversos	Farmacéutica
Cetuximab (Erbix)	Inhibidor anti-EGFR	Aprobado por la FDA, para cancer colorectal, cabeza y cuello. Fase II para cancer de mama.	Fiebre, escalofríos, rigidez, urticaria, rash, hipotensión, broncoespasmos, angioedema, mareo, anafilaxia, y paro cardíaco.	ImClone LLC
Panitumumab (Vectibix)	Inhibidor Anti-EGFR	Aprobado por la FDA, para cancer colorectal, cabeza y cuello. Fase II para cancer de mama.	Fatiga, deterioro general, dolor abdominal náuseas, diarrea, e irritación ocular.	Amgen
Pertuzumab (Omnitarg)	Inhibidor Anti HER-2	Fase II y III de cancer colorectal metastásico, cancer de mama HER2+, en combinación con otros Mabs.	Deterioro general, dolor abdominal náuseas, diarrea, mareo.	Genentech
Trastuzumab (Herceptin)	Inhibidor Anti HER-2	Aprobado por la FDA, para cancer de mama HER2+, adenocarcinoma de estomago	Disfunción cardiaca	Genentech

2.1.1.1.2. Inhibidores de la actividad tirosina quinasa del EGFR (EGFR-TKI)

Existen varios inhibidores de la actividad tirosina quinasa (TKI) de los receptores de la familia ErbB en desarrollo clínico (Tabla 2.2). Los TKI tienen varias ventajas sobre los MABs. En primer lugar, son administrados por vía oral y son mejor tolerados por los pacientes. En segundo lugar, su bajo peso molecular permite que el fármaco alcance el sistema nervioso central. Por último, ya que los dominios quinasa se encuentran muy conservados entre los miembros de la familia ErbB, algunos inhibidores pueden inactivar a los distintos receptores de forma simultánea (Ekstrand *et al.*, 1994).

Tabla 2.2. Inhibidores de EGFR-TKI

EGFR-TKI	Estructura	Mecanismo de Acción	Fase Clínica	Efectos adversos	Farmacéutica
Gefitinib (Iressa)		Inhibidor reversible de EGFR	Aprobado por la FDA para tratamiento de cáncer de pulmón.	Fatiga, náuseas, vómitos, diarrea y mielosupresión.	Astrazeneca uk ltd
Lapatinib (Tykerb)		Inhibidor irreversible de EGFR y HER2.	Aprobado por la FDA el tratamiento de cáncer avanzado de mama HER2+.	Diarrea, erupciones en la piel; está asociado a una baja incidencia de cardiotoxicidad.	Smithkline beecham corp glaxosmithkline
Erlotinib (Tarceva)		Inhibidor reversible de EGFR	Fue Aprobado como monoterapia por la FDA para el tratamiento de cáncer avanzado de pulmón no microcítico y cáncer avanzado de páncreas.	Erupción cutánea, diarrea, astenia, náuseas y vómito.	OSI Pharmaceuticals

a) Gefitinib, es un inhibidor selectivo y reversible de la tirosina quinasa del EGFR. *In vitro*, puede unirse a otros miembros de la familia ErbB, a dosis bajas es citostático, pero en dosis más altas inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis. Gefitinib, está aprobado por la FDA para tratamiento de cáncer de pulmón. Ha sido evaluado en un estudio en fase II, combinado con docetaxel, en pacientes de cáncer de mama con metástasis, aunque el estudio fue suspendido por la toxicidad del tratamiento (von Minckwitz *et al.*, 2005). Con el fin de mejorar su eficacia antitumoral, se ha combinado con quimioterapia o radioterapia con buenos resultados (Fu *et al.*, 2012).

b) Lapatinib, es un inhibidor dual, inhibe la actividad tirosina quinasa del EGFR y HER-2. Ha mostrado actividad en diferentes líneas celulares metastásicas y en cáncer de mama avanzados. Lapatinib se administra oralmente y es bien tolerado por los pacientes como monoterapia (Chu y Lu, 2008). Fue aprobado por la FDA para su uso con capecitabine (Xeloda®) para el tratamiento de cáncer avanzado de mama HER2+. La combinación mostró una reducción del 51% en el riesgo de progresión de la enfermedad (Cella *et al.*, 2011). La combinación de lapatinib y trastuzumab ha demostrado tener

efecto antitumoral sinérgico en líneas celulares que expresan HER2, y estos resultados han sido confirmados en la práctica clínica en el tratamiento de cáncer avanzado de mama HER2 (Wu *et al.*, 2011).

c) Erlotinib, es un EGFR-TKI reversible y selectivo, muestra actividad antitumoral en varias líneas celulares de cáncer de pulmón (Yamasaki *et al.*, 2007) y en modelos de xenoinjertos (Fleming *et al.*, 2008). Erlotinib fue aprobado como monoterapia por la FDA para el tratamiento de cáncer avanzado de pulmón no microcítico (NSCLC) y en combinación con gemcitabine para el tratamiento de cáncer avanzado de páncreas. Existen diferentes estudios en fases I y II en combinación con trastuzumab (Britten *et al.*, 2009), docetaxel (Samelis *et al.*, 2011), bevacizumab (inhibidor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en pacientes con cáncer de pulmón, cáncer de páncreas metastásico y carcinoma hepatocelular avanzado (Yau *et al.*, 2012).

La segunda generación de TKI dirigidos contra EGFR, forman un enlace covalente irreversible en el dominio de unión a ATP. Entre ellos encontramos canertinib (CI-1033, anti EGFR, HER-2 y HER4)(Rixe *et al.*, 2009), neratinib (HKI-272, anti EGFR, HER-2 y HER-4) (Sequist *et al.*, 2010), afatinib (BIBW 2992, anti EGFR y HER-2) (Miller *et al.*, 2012), y dacomitinib (PF-00299804, anti HER-1, HER-2 y HER-4) (Takahashi *et al.*, 2012). Están en fase clínica II y III en modelos de NSCLC que han presentado resistencia a otros TKI.

Entre los mecanismos de inducción de resistencia a los EGFR-TKI, se ha identificado que en aproximadamente el 50% de los tumores de NSCLC (Suda *et al.*, 2009) resistentes al tratamiento aparece una mutación en el TKD del gen EGFR que provoca la sustitución en Met790 por treonina (Pao *et al.*, 2005). Dicha sustitución aumenta la afinidad del EGFR por el ATP, disminuyendo su unión al fármaco. La aparición de mutaciones en las vías

paralelas de señalización tales como VEGF o el factor de crecimiento semejante a la insulina 1 (IGF-1R) puede a su vez contribuir al desarrollo de resistencia a TKIs (Engelman *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2009). La resistencia de determinados tipos de cáncer de mama a los inhibidores de EGFR se ha relacionado también con la deslocalización del inhibidor endógeno de CDK, p27 (Wu *et al.*, 2006; Yamasaki *et al.*, 2007). En este contexto el desarrollo de terapias combinadas podría revertir la resistencia a estos fármacos y disminuir los efectos secundarios. En este estudio se propone la combinación de un EFGR-TKI (erlotinib) con un inhibidor de los complejos CDK/ciclina (TAT-NBI1) con el objetivo de provocar la inducción de muerte de líneas tumorales, resistentes a erlotinib.

2.1.2. MECANISMOS DE MUERTE CELULAR

La muerte de una célula se puede producir a través de diversos mecanismos moleculares, morfológica y funcionalmente diferenciables. En el tratamiento de tumores es importante comprender las rutas involucradas en la inducción de muerte celular para poder detectar con facilidad los factores responsables de la generación de resistencias. Durante los últimos años se han incrementado los esfuerzos para entender las diversas rutas que conducen a la célula a la muerte, de modo que se han descrito diferentes tipos de muerte celular que se resumen en la Tabla 2.3. En el presente trabajo nos centraremos principalmente en el estudio de los mecanismos de muerte mediados por apoptosis y necroptosis (Fig. 2.2).

Tabla 2.3. Clasificación de los diferentes modelos de muerte celular
(Galluzzi *et al.*, 2012)

Tipo de muerte celular	Características	Dependiente de caspasas	Mecanismo de inhibición
Anoikis	<ul style="list-style-type: none"> * Disminución de EGFR * Inhibición de la señalización de ERK1 * Pérdida funcional de $\beta 1$ integrina * Sobreexpresión de BIM * Activación de caspasa-3 (-6,-7) 	++	<ul style="list-style-type: none"> * Sobreexpresión de BCL-2 * Administración de Z-VAD-fmk
Muerte celular por autofagia	<ul style="list-style-type: none"> * Lipidación de MAP1LC3 * Degradación de SQSTM1 	--	<ul style="list-style-type: none"> * inhibidor de VPS34 * Inhibición genética de Beclin 1, AMBRA1, ATG5, ATG7, ATG12
Apoptosis Mitocondrial/intrinseca dependiente de caspasas	<ul style="list-style-type: none"> * MOMP * Activación de caspasas 	++	<ul style="list-style-type: none"> * Sobreexpresión de BCL-2 * Administración de Z-VAD-fmk
Apoptosis mitocondrial/intrinseca independiente de caspasas	<ul style="list-style-type: none"> * Liberación de proteínas intemembrana (IMS) * Inhibición de la cadena respiratoria 	--	<ul style="list-style-type: none"> * Sobreexpresión de BCL-2
Cornificación	<ul style="list-style-type: none"> * Activación de transglutaminasas * Activación de caspasa-14 	+	<ul style="list-style-type: none"> * Inhibición genética de TG1, TG3M, TGS ó caspasa-14.
Entosis	<ul style="list-style-type: none"> * Activación RHO y ROCK1 	--	<ul style="list-style-type: none"> * Inhibición genética de Metalotioneína-2A * Inhibidor lisosomal
Apoptosis extrínseca por receptores de muerte	<ul style="list-style-type: none"> * Señalización por receptores de muerte * Activación de caspasa-8 y -10 * Procesamiento de BID y MOMP * Activación de caspasa-3 (-6,-7) 	++	<ul style="list-style-type: none"> * Inhibición genética de caspasas (-3 y -8) * Administración de Z-VAD-fmk
Apoptosis extrínseca por receptores de dependencia	<ul style="list-style-type: none"> * Señalización por receptores * Activación de caspasas (-3,-6,-7 y -9) * Activación de la proteína fosfatasa 2 (PP2A) * Activación de DAPK1 (proteína quinasa asociada a muerte) 	++	<ul style="list-style-type: none"> * Inhibición genética de caspasas (-3 y -9) * Inhibición genética de PP2A * Administración de Z-VAD-fmk
Catástrofe mitótica	<ul style="list-style-type: none"> * Activación de caspasa-2 (en algunos casos) * Activación de TP53 ó TP73 (en algunos casos) * Arresto mitótico 	--	<ul style="list-style-type: none"> * Inhibición genética de TP53 * Inhibición genética de caspasa-2
Necroptosis	<ul style="list-style-type: none"> * Señalización por receptores de muerte * Inhibición de Caspasas * Activación de RIP1 y/ó RIP3 	--	<ul style="list-style-type: none"> * Administración de Necrostatina * Inhibición genética de RIP1/RIP3
Netosis	<ul style="list-style-type: none"> * Inhibición de Caspasas * Activación de NADPH oxidasa * Liberación de trampas extracelulares de neutrofilos (NET, en algunos casos) 	--	<ul style="list-style-type: none"> * Inhibición de autofagia * Inhibición de NADPH oxidasa * Inhibición genética de PAD4
Muerte celular dependiente de PARP-1 - parthanatos	<ul style="list-style-type: none"> * Acumulación de PAR mediada por PARP1 * Depleción de ATP y NADH * Unión de PAR con AIF y translocación nuclear de AIF 	--	<ul style="list-style-type: none"> * Inhibición genética de AIF * Inhibición genética ó farmacológica de PARP1
Pyroptosis	<ul style="list-style-type: none"> * Activación de caspasa-1 y caspasa-7 * Secreción de IL-1β y IL-18 	++	<ul style="list-style-type: none"> * Inhibición genética de caspasa-1 * Administración de Z-VAD-fmk
Apoptosis dependiente de ripoptosoma	<ul style="list-style-type: none"> * Señalización independiente de receptores de muerte * Disminución de IAPs * Activación de caspasas (-8,-10,-3) * Activación de RIP1 y/ó RIP3 * No inhibible por Z-VAD 	++	<ul style="list-style-type: none"> * Administración de necrostatina * Inhibición genética de RIP1/RIP3 ó caspasa-8 y -10.

2.1.2.1. Apoptosis

El primero en describir los procesos de muerte celular fue el patólogo alemán Virchow en 1858 (revisado en (Nurse, 2000)), quién basándose en parámetros macroscópicos, definió términos como degeneración, mortificación y necrosis. En 1964, Richard A. Lockshin y Carroll Williams introdujeron el concepto de muerte celular programada (revisado en (Lockshin y Zakeri, 2001)). Pero no fue hasta 1972, cuando John F. Kerr, Andrew H. Wyllie y Alastair R. Currie, implantaron el término apoptosis (Taylor *et al.*, 2008). Este término evoca la caída de las hojas desde los árboles en otoño o la de los pétalos de las flores, para diferenciar la muerte que ocurre de forma natural o fisiológica durante el desarrollo, de la muerte por necrosis.

La muerte celular programada o apoptosis (PCD, "*Programmed cell-death*") juega un papel importante durante el desarrollo, la homeostasis de los tejidos y la eliminación de las células dañadas. La apoptosis se define como un conjunto de reacciones bioquímicas y cambios morfológicos, que tienen lugar en la célula y contribuyen a su muerte celular de una forma ordenada. Las características que definen una célula apoptótica son (i) la activación de una familia de proteasas de cisteína denominada caspasas ("*cysteine aspartyl-specific proteases*"); (ii) la condensación de la cromatina; (iii) la activación de endonucleasas que provocan la fragmentación del DNA; (iv) dilatación del retículo endoplasmático que origina la formación de vesículas que tienden a unirse a la membrana plasmática adquiriendo una forma característica en burbujas ("*blebs*"); (v) deshidratación celular que conduce a su contracción; (vi) fragmentación nuclear y citoplasmática, que resulta en la formación de los denominados cuerpos apoptóticos; (vii) exposición de marcadores de fagocitosis en la superficie celular de cuerpos apoptóticos, como la fosfatidilserina (PS) (Hengartner, 2000).

Las células apoptóticas, son rápidamente reconocidas y fagocitadas por macrófagos y otras células vecinas impidiendo así la exposición del material intracelular, que podría desencadenar una respuesta inflamatoria (Ulukaya *et al.*, 2011).

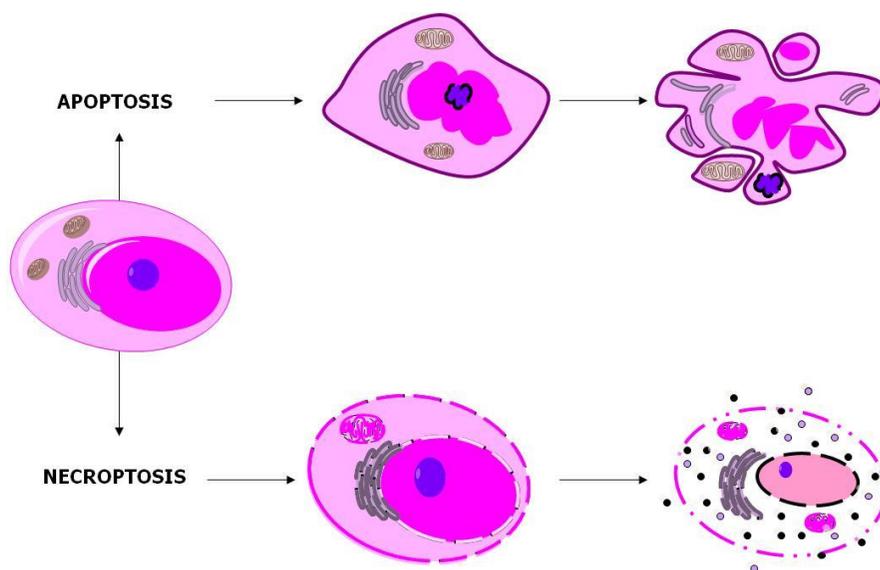


Figura 2.2. Morfología celular de apoptosis y necroptosis. Apoptosis: la cromatina se condensa en la periferia nuclear, los nucléolos se desintegran y se reduce el tamaño del núcleo. El volumen celular total se reduce, la célula se encoge y hace más densa, los orgánulos citoplasmáticos se condensan y el retículo endoplásmico se dilata, a continuación se produce la fragmentación del núcleo y del citoplasma en cuerpos apoptóticos que luego, serán fagocitados por macrófagos o células vecinas. Necrosis/necroptosis: aumento del volumen citoplasmático y de los orgánulos, que provoca el colapso de la membrana plasmática y la liberación del contenido citoplasmático al exterior celular, desencadenando una respuesta inflamatoria local.

Las caspasas son componentes esenciales del proceso de apoptosis por su participación activa en el desmantelamiento celular. Se expresan en la célula como proenzimas (zimógenos), y en respuesta a señales específicas sufren una fragmentación proteolítica (dos cortes) en residuos de ácido aspártico que generan subunidades de la enzima activa que inician el proceso de apoptosis.

Las caspasas están constituidas por un prodominio N-terminal variable entre las caspasas y por una región catalítica formada por dos subunidades: una subunidad grande (17-21 kDa) que contiene el sitio activo y una subunidad catalítica pequeña (10-13 kDa). Basados en la función dentro de la cascada apoptótica, las caspasas se pueden clasificar en dos grupos: las caspasas iniciadoras o activadoras y las caspasas efectoras o ejecutoras (Fig. 2.3). Las caspasas iniciadoras (-8, -9, -10, -2) son las que primero se activan tras un estímulo apoptótico. Poseen prodominios largos que contienen un motivo de interacción proteína-proteína característico: el dominio efector de muerte (DED) o el dominio de activación y reclutamiento de caspasa (CARD). DED y CARD son dominios de muerte (DD). Los dominios DD facilitan la interacción con proteínas adaptadoras que presenten dominios homólogos (Weber y Vincenz, 2001). La procaspasa-8 y -10, tienen dominios DED, mientras que la procaspasa-2 o -9 tienen el dominio CARD (Fig. 2.3) (Kumar, 2007).

Las caspasas efectoras (-3, -6 y -7), son las encargadas de cortar múltiples sustratos celulares necesarios para la supervivencia de la célula, entre ellos proteínas del citoesqueleto (ACTINA), proteínas reguladoras de la reparación del DNA (PARP, "*Poly (ADP-ribose) polymerase*") y proteínas del ciclo celular (MDM2). A diferencia de las iniciadoras, estas caspasas poseen un prodominio corto y no contienen dominios DED o CARD (Fuentes-Prior y Salvesen, 2004; Ulukaya *et al.*, 2011).

Existen dos vías canónicas de activación de caspasas y por lo tanto de inducción de apoptosis: la vía extrínseca, mediada por la activación de la superfamilia de receptores de muerte del factor de necrosis tumoral (TNF) y la vía intrínseca o vía mitocondrial que se inicia en respuesta a estrés celular o inductores citotóxicos.

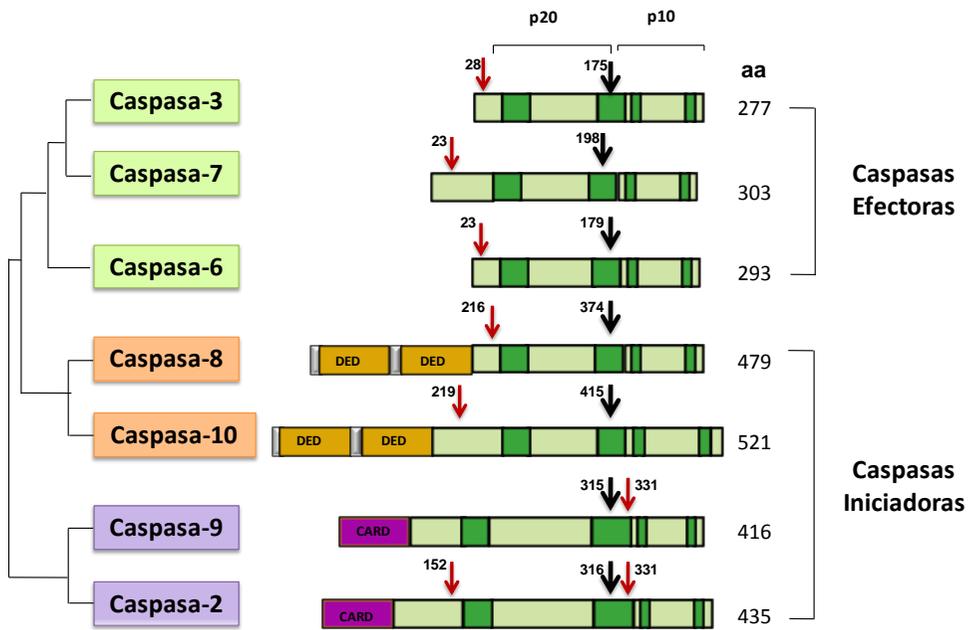


Figura 2.3. Características estructurales de las caspasas. Las procaspasas contienen en su estructura una subunidad grande (p20) y una subunidad pequeña (p10). La posición del corte entre las subunidades grandes y pequeñas, se destaca por una flecha negra, mientras que los cortes adicionales se representan mediante flechas rojas. Los cuatros fragmentos proteicos (en verde), forman el sitio activo de la caspasa. Algunas procaspasas contienen un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD), o un dominio efector de muerte (DED) (adaptado de (Bao y Shi, 2007)).

2.1.2.1.1. Vía intrínseca mitocondrial

La vía intrínseca de apoptosis, se inicia en respuesta a distintos factores, como ausencia de factores de crecimiento o el estrés genotóxico, que inducen la activación de miembros proapoptóticos de la familia de proteínas BCL-2 (*B leukemia/lymphoma 2*) e inducen la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP). La MOMP induce la difusión al citosol de proteínas mitocondriales como el citocromo c, HTRA2/OMI (*High Temperature Requirement protein A serine protease 2*), SMAC/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases*), el factor inductor de

apoptosis AIF (“*Apoptosis induction factor*”) y la endonucleasa G (Brunelle y Letai, 2009; Green y Evan, 2002).

Una vez en el citosol AIF, se transloca al núcleo, causando condensación de la cromatina nuclear y fragmentación de DNA (Daugas *et al.*, 2000). La endonucleasa G induce fragmentación del DNA internucleosomal (Kim *et al.*, 2005) y SMAC/DIABLO y HTRA2/OMI activan la apoptosis neutralizando la actividad de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). El citocromo c una vez liberado al citosol, se une con el factor activador de la apoptosis-1 (Apaf-1, “*Apoptotic protease activating factor-1*”) induciendo su oligomerización y el reclutamiento de procaspasa-9, dando lugar a la formación de un complejo heptamérico conocido como apoptosoma (Bratton y Salvesen, 2010). En el apoptosoma se produce el procesamiento y por tanto, la activación de procaspasa-9. Una vez activa, esta caspasa iniciadora promueve la activación de las caspasas efectoras -3 y -7, desencadenándose así el desmantelamiento celular (Fig. 2.4C) (Riedl y Salvesen, 2007).

2.1.2.1.2. Vía extrínseca

a) Vía extrínseca, apoptosis inducida por CD95/TRAIL-DISC, esta vía extrínseca de apoptosis está mediada por receptores de muerte de la superfamilia de receptores TNF, tales como FAS (CD95, “*cytotoxicity-dependent proteína 95*”, o APO-1, “*apoptosis-1 protein*”), o los receptores TRAIL (TRAIL-R, “*TNF-related apoptosis-inducing ligand*”). La unión de los ligandos (TNF- α , Fas-Ligando y TRAIL) a sus receptores, induce la interacción del dominio DD (“*death domain*”) del propio receptor con el DD de proteínas adaptadoras citosólicas. Estas moléculas adaptadoras comunican los receptores de muerte con las caspasas y con miembros de la familia BCL-2, a través del DD (Bratton y Salvesen, 2010). La proteína adaptadora FADD (“*Fas-Associated protein with Death Domain*”), en respuesta a la unión del ligando recluta a procaspasa-8 para formar un complejo de señalización

inductor de la muerte (DISC, “death-inducing signaling complex”) (Scott *et al.*, 2009). El DISC da lugar a la activación de las caspasas iniciadoras -8 y -10, que a su vez activarán las caspasas efectoras-3 y-7 (Fig. .2.4B) (Fuentes-Prior y Salvesen, 2004).

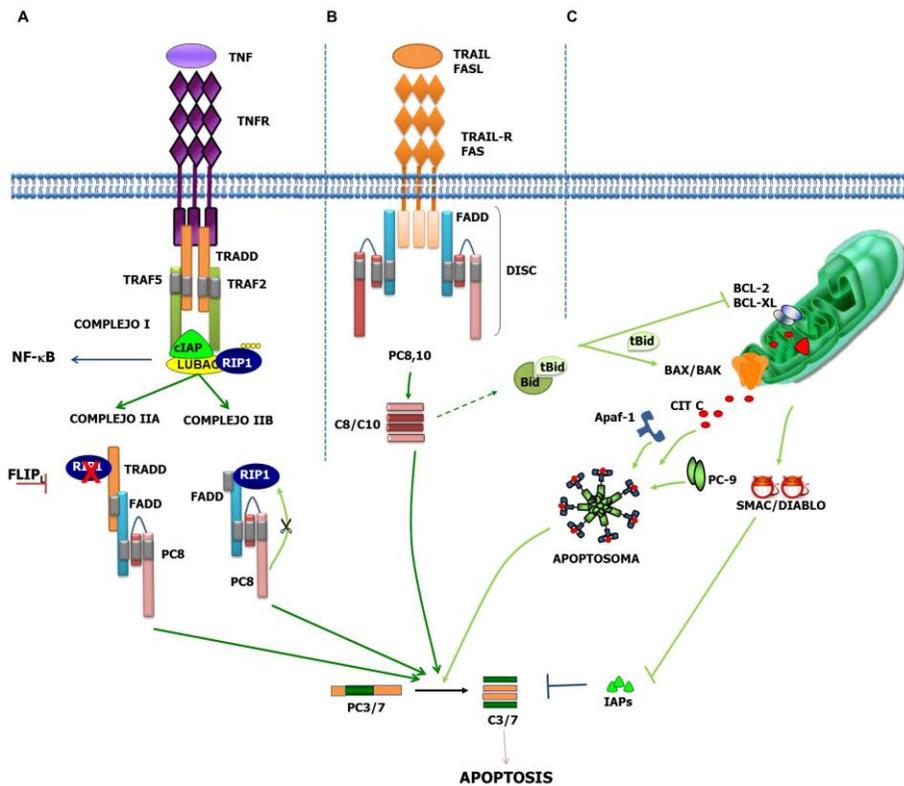


Figura 2.4. Esquema de las rutas apoptóticas. A. Vía extrínseca, apoptosis inducida por TNFR-1; la formación del complejo I asociado a membrana (TRADD, TRAF2 y 5, cIAPs, LUBAC y RIP1), promueve la supervivencia celular a través de la activación de NF-κB. La deubiquitinación de RIP1 inhibe la señalización de NF-κB, y conduce a la formación del complejo citoplasmático II (IIA o IIB) que recluta a procaspasa-8 y la activa iniciando el proceso de apoptosis. B. Vía extrínseca, apoptosis inducida por CD95/TRAIL-DISC; la proteína adaptadora FADD en respuesta a la unión del ligando recluta a procaspasa-8 para formar el DISC. El DISC promueve la activación de las caspasas iniciadoras -8 y -10, iniciando el proceso de apoptosis. C. Vía intrínseca mitocondrial; la permeabilización de la membrana externa mitocondrial induce la difusión al citosol de proteínas mitocondriales como el citocromo c. El citocromo c se une con Apaf-1 y procaspasa-9, dando lugar a la formación del apoptosoma donde se activa caspasa-9 iniciándose el proceso de apoptosis. PC: procaspasa; C: caspasa CIT C: citocromo c (adaptado de (Dickens *et al.*, 2012)).

b). Vía extrínseca, apoptosis inducida por TNFR-1, tras la unión de TNF al TNF-R, se desencadena la formación del complejo I, que en lugar de reclutar FADD recluta a la proteína adaptadora TRADD (*"TNF receptor associated-protein with death domain"*) que a su vez recluta a TRAF2 (*"TNF receptor-associated factor-2"*), TRAF5 (*"TNF receptor-associated factor-5"*), cIAP1, cIAP2, LUBAC (*"linear ubiquitin chain assembly complex"*) y RIP1 (*"Receptor-interacting protein kinase 1"*) formando el complejo I. El estado de ubiquitinación de RIP1 es importante para la regulación de la actividad del complejo I y decide su función en supervivencia o muerte celular. La ubiquitinación de RIP1 inicia el reclutamiento IKK (*"NF-kB-activating Ikb kinase"*) y NEMO (NF-kappa-B essential modulator, IKK γ) al complejo y promueve la activación de la vía NF-kB (*"nuclear factor kappaB"*) induciendo la expresión de genes importantes para la inflamación y la supervivencia celular. Por otro lado, la deubiquitinación de RIP1 por CYLD (*"Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase"*), inhibe la señalización de NF-kB, lo que conduce a la activación del proceso de muerte celular (Micheau y Tschopp, 2003) de modo que el estado de ubiquitinación de RIP1 es fundamental para la transición de complejo I al complejo citoplasmático II (IIA o IIB). El complejo IIA induce apoptosis mientras que el complejo IIB induce apoptosis o necrosis. Complejo IIA implica la activación de un heterodímero de la caspasa-8/FLIP $_L$ (*"cellular FLICE-inhibitory protein"*) [29] que conduce a la inactivación RIP1, evitando así el ensamblaje del complejo IIB (Linkermann *et al.*, 2012). El complejo IIA se ensambla cuando TRADD se libera del TNF-R unido a la membrana. La disociación de RIP1 y TRAF2 de TRADD, permite reclutar FADD (a través de interacciones DD), que a su vez recluta a procaspasa-8 y -10. Una vez activadas, estas caspasas puede escindir otros sustratos, tales como procaspasa-3 e inducir apoptosis. En determinados tipos celulares caspasa-8 es capaz de provocar el procesamiento de BID (*"BCL-2- interacting domain death agonist"*), una proteína de la familia BCL-2, produciendo t-BID (15 kDa). La proteína t-BID se transloca a la mitocondria y activa los

miembros pro-apoptóticos de la familia de BCL-2, induciendo la MOMP, y conectando de esta forma las dos vías de inducción de apoptosis. Para la formación del complejo IIB (FADD, Caspasa-8, RIP1 y RIP3, puede ser o no independiente de TRADD), se requiere de la deubiquitinación de RIP1 por la enzima CYLD (Dickens *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2000) y la liberación de RIP1 del complejo I; RIP1 puede oligomerizarse directamente con FADD y así reclutar procaspase-8 para inducir apoptosis (Linkermann *et al.*, 2012).

2.1.2.1.3. Reguladores de la Apoptosis

a). Familia de proteínas BCL-2, las proteínas de la familia BCL-2 son los principales reguladores de apoptosis y controlan la MOMP. Los miembros de esta familia se clasifican en tres subgrupos: i) las proteínas antiapoptóticas “*BCL-2 like*”: BCL-2, BCL-xL (“*B-cell lymphoma-extra large*”), MCL-1 (“*Induced myeloid leukemia cell differentiation protein*”) y A1/BFL-1 (“*BCL-2-related protein A1*”; (ii) las proteínas pro-apoptóticas “*Bax-like*”: BAX (“*BCL-2-associated X protein*”), BAK (“*BCL-2 homologous antagonist/killer*”) y BOK/MTD (“*BCL-2 related ovarian killer*”), que se caracterizan por tener 4 dominios BH (“*BCL-2 Homology*”, BH1-BH4); (iii) y las proteínas “*BH3-only*”: BID (“*BH3 interacting domain death agonist*”), BIM/BOD (“*BCL-2-like protein 11*”), BMF (“*BCL-2-modifying factor*”), BIK/NBK (“*BCL-2-interacting killer*”), NOXA (“*phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*”) y PUMA/BBC3 (“*BCL-2-binding component 3*”), que sólo tienen 1 dominio BH3 (Fig. 2.5). A través de su dominio BH3, las proteínas “*BH3-only*” integran y transmiten señales de muerte entre los miembros de la familia de BCL-2 (Martinou y Youle, 2011; Youle y Strasser, 2008). Las proteínas “*BH3 only*” interactúan ya sea con las proteínas antiapoptóticas para inhibirlas (“*sensitizers*”) o con las proteínas BAX o BAK para estimular su actividad proapoptótica (“*activators*”)(Giam *et al.*, 2008).

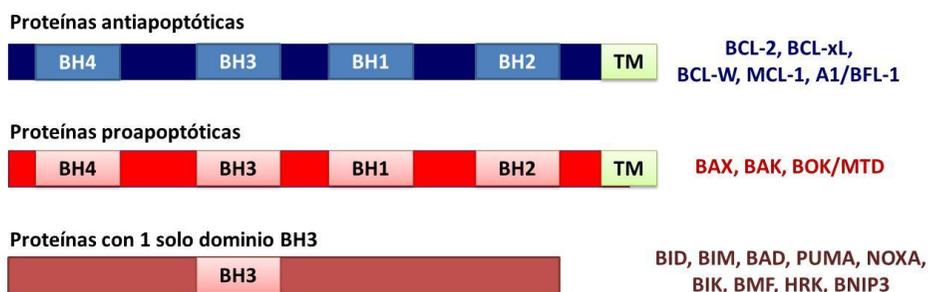


Figura 2.5. Características estructurales de las proteínas de la familia BCL-2. La familia de proteínas BCL-2 se divide en tres grupos basados en su homología de los dominios de BCL-2 (BH). Las proteínas pro y antiapoptóticas contienen 4 dominios BH, y las “BH3-only” solo poseen 1 dominio BH3 (adaptado de (Martinou y Youle, 2011)).

b). IAPs, una de las familias de proteínas inhibidoras de apoptosis más estudiadas por su relevancia fisiológica es la familia de proteínas inhibidoras de las proteínas de apoptosis (IAPs) (LaCasse *et al.*, 2008; Lockshin y Zakeri, 2007). Las IAPs son potentes reguladoras de NF- κ B y de TNF. Modulan la señalización inflamatoria y de inmunidad, los procesos de proliferación y mitosis e intervienen en procesos de invasión celular y metástasis. Igualmente, contribuyen a la regulación de la supervivencia celular, al inhibir plataformas/complejos de muerte tales como el apoptosoma o el ripoptosoma (Darding y Meier, 2012).

En mamíferos, se conocen 8 tipos de IAPs, entre ellos: IAP ligado al cromosoma X (XIAP), los IAPs celulares (cIAP1 y cIAP2), la proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), SURVIVINA, BRUCE, LIVIN, y las IAPs testículo-específicas (TS-IAP) (Mace *et al.*, 2010). Las IAPs se caracterizan por la presencia en su estructura de uno a tres dominios BIR (“*Baculovirus IAPs repeat*”) y de dominios dedos de zinc. XIAP, c-IAP1 y c-IAP2 contienen un dominio estructural adicional en el carboxilo-terminal denominado dominio “RING” (“*Really Interesting New Gene*”), que funciona

como una ubiquitina ligasa E3. RING es el responsable de la neutralización de las caspasas y por ende evita que se desencadene la muerte celular.

Las IAPs se encuentran sobreexpresadas en muchos cánceres humanos y promueven el mantenimiento del tumor (Hunter *et al.*, 2007). La actividad de los IAPs está a su vez regulada por proteínas de unión a IAPs, tales como SMAC/DIABLO. La proteína SMAC se une directamente a las IAPs y antagoniza su función.

2.1.2.2. Otros complejos inductores de muerte celular

2.1.2.2.1. PIDDosoma

En respuesta a estrés genotóxico, shock térmico, daño a DNA y/o estrés del retículo endoplásmico, se ensambla el PIDDosoma, que está formado por las proteínas PIDD (“*p53-induced protein with a death domain*”), RAIDD (“*RIP-associated ICH-1 homologous protein with a death domain*”) y caspasa-2 (Fig. 2.6A) (Park y Wu, 2006). La proteína PIDD (910 aminoácidos) contiene un dominio N-terminal denominado PIDD-N (48 kDa), y dos dominios en el C-terminal PIDD-C (55 kDa) y PIDD-CC (37 kDa). Este último es el principal activador de caspasa-2 (Fig. 2.6B). Cuando se acumulan daños importantes en el DNA, PIDD media la activación de la caspasa-2 induciendo el procesamiento de BID y activando la vía intrínseca de la apoptosis. Sin embargo, en daños leves de DNA, PIDD interactúa con RIP1/NEMO para activar NF- κ B, siendo crítico para la supervivencia celular (Janssens y Tinel, 2012). Además, PIDD regula el procesamiento de MDM2, bloqueando la ubiquitinización de p53 y por tanto, evitando su degradación e induciendo arresto del ciclo celular y expresión de la maquinaria de reparación (Oliver *et al.*, 2011). Así el PIDDosoma tiene funciones tanto en apoptosis, como en control del ciclo

celular, en vías de reparación de DNA y en progresión de tumores (Bouchier-Hayes y Green, 2012; Janssens y Tinel, 2012; Tinel y Tschopp, 2004).

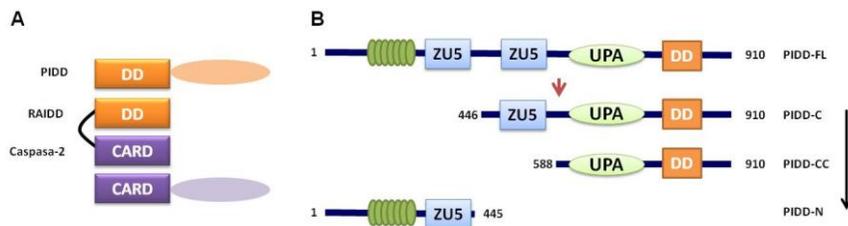


Figura 2.6. Formación del PIDDosoma. A. Representación esquemática del PIDDosoma, formado por PIDD, RAIDD y Caspasa-2 (adaptado de (Bao y Shi, 2007)). B. Autoprocesamiento de PIDD; PIDD-CC es el principal activador de caspasa-2 (adaptado de (Janssens y Tinel, 2012)).

2.1.2.2.2. Ripoptosoma

En respuesta a estrés genotóxico o bien cuando las células se tratan con determinados activadores de apoptosis, como por ejemplo, compuestos que mimetizan la acción de SMAC (Chen y Huerta, 2009), se induce una depleción de las IAPs, lo que provoca, en determinados tipos celulares, la formación espontánea de un complejo macromolecular denominado ripoptosoma (formado por RIP1, FADD y caspasa-8). En dicho complejo se produce la activación de caspasa-8 que provoca la activación de muerte por apoptosis (Tenev *et al.*, 2011) o necroptosis, en el caso de que dicha muerte ocurra de forma independiente de caspasas (Fig. 2.7) (Darding y Meier, 2012; Vandenabeele *et al.*, 2010). Aunque los componentes del ripoptosoma son casi los mismos del complejo IIB, la formación del ripoptosoma se produce independientemente de la activación de la familia de receptores de TNF y de la vía de muerte mitocondrial. El ripoptosoma puede incluir proteínas adicionales, tales como caspasa-10, RIP3 y TRAFF. La formación de homodímeros de caspasa-8 dentro del complejo, permite la activación

catalítica completa de caspasa-8, lo que se traduce en la activación de apoptosis.

Por otra parte, la formación del ripoptosoma está regulada por la presencia en la célula de diferentes isoformas de cFLIP, que son fundamentalmente, la forma la corta (FLIP_S) y la larga (FLIP_L) (Hu *et al.*, 1997). FLIP_S contiene 2 dominios DED, muy similares a los prodominios del N-terminal de caspasa-8/-10; mientras que FLIP_L es idéntico en tamaño a caspasa-8, tiene los dominios DED, pero su región catalítica está modificada, de manera que es inactiva (Krueger *et al.*, 2001; Rasper *et al.*, 1998). La formación de heterodímeros de caspasa-8 y cFLIP_L, se traduce en una limitada actividad catalítica que no es suficiente para desencadenar la apoptosis. Sin embargo, es capaz de escindir RIP1, esto a su vez conduce al desmontaje del ripoptosoma y con ello la supervivencia celular (Feoktistova *et al.*, 2011; Tenev *et al.*, 2011). En contraste, cuando la heterodimerización de caspasa-8 es con cFLIP_S, la activación de caspasa-8 y el procesamiento de RIP1 son inhibidos. En esta situación la apoptosis está bloqueada y la muerte celular es por necroptosis (Feoktistova *et al.*, 2011) (Fig 2.7)

2.1.2.3. Necrosis programada o necroptosis

El proceso de necrosis se caracteriza por la existencia de alteraciones morfológicas, entre ellas aumento del volumen celular, alteración de la membrana plasmática, pérdida del contenido intracelular, estrés oxidativo, hiperpolarización de la membrana mitocondrial y la permeabilización de las membranas plasmática y lisosomal (Vanden Berghe *et al.*, 2010). Durante mucho tiempo la necrosis fue considerada como un tipo de muerte celular accidental y descontrolada. Sin embargo, en los últimos años se han acumulado evidencias que demuestran que la necrosis puede ser también un mecanismo estrictamente regulado (Edinger y Thompson, 2004). Algunos

autores han propuesto el término “necroptosis” para referirse a este tipo de necrosis programada. En la vía de señalización de necroptosis están implicadas las proteínas RIP1 y RIP3 (Degterev *et al.*, 2008; Galluzzi *et al.*, 2009). Recientemente se ha demostrado que los receptores de muerte tras la unión de sus agonistas como el TNF, FASL y TRAIL, pueden activar en determinadas circunstancias los mecanismos de muerte por necroptosis (Fiers *et al.*, 1995). TNFR1 puede activar NF- κ B o apoptosis dependiendo del estado de ubiquitinación de RIP1 lo que da lugar a la posterior formación del complejo II. Sin embargo, la estimulación mediada por TNF α , en presencia de miméticos de SMAC o bajo condiciones en las que la actividad caspasa (principalmente caspasa-8) se encuentra bloqueada y por tanto la apoptosis inhibida, induce la muerte por necroptosis. Se forma el complejo IIB y RIP1 interactúa con RIP3 a través de su dominio RHIM (“*RIP homotypic interaction motif*”) formando un complejo estable denominado necrosoma. RIP1 y RIP3 se autofosforilan y el resultado es la activación de proceso de necroptosis (Fig. 2.7) (Degterev *et al.*, 2008; Galluzzi *et al.*, 2011). Por tanto se puede considerar que FADD y caspasa-8 son efectores positivos de la muerte celular apoptótica iniciada a través de la vía extrínseca, ejercen a su vez una regulación negativa inhibiendo la necroptosis (Welz *et al.*, 2011). Entre los factores que influyen en la activación de la ruta de la apoptosis o de necroptosis se encuentran: la naturaleza del estímulo, el estado de activación de las caspasas y el tipo celular (Wu *et al.*, 2012). De forma paralela la formación del ripoptosoma generalmente señala la activación de apoptosis, pero la presencia de diferentes isoformas de cFLIP dirigen al complejo hacia la vía de supervivencia o necroptosis.

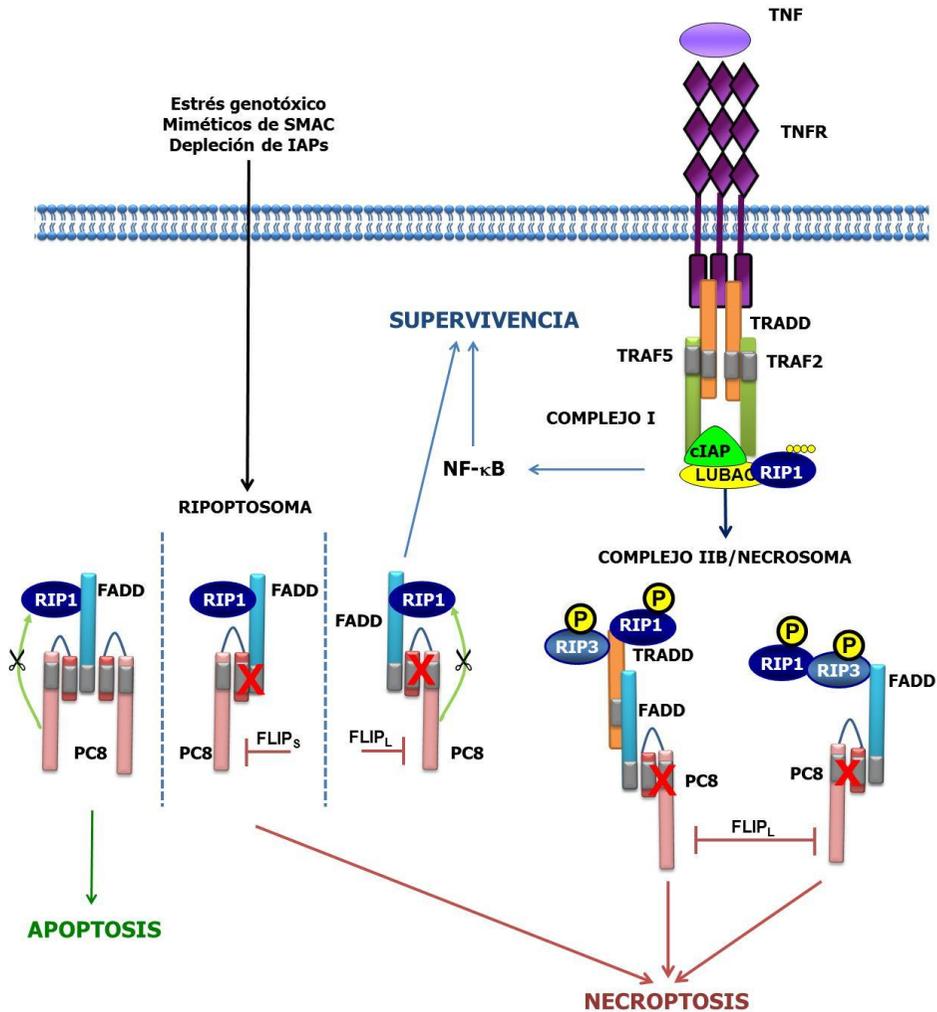


Figura 2.7. Complejos inductores de apoptosis y necroptosis. La necroptosis inducida por receptor tiene lugar cuando caspasa-8 está inhibida. En ausencia de caspasa-8 se activa el necrosoma o complejo IIB en el que RIP1 y RIP3 forman un complejo con caspasa-8 y FADD. RIP3 y RIP1 son fosforilados y señalizan necroptosis. En condiciones de estrés genotóxico, independiente de la activación de TNFR1, se forma el ripoptosoma (RIP1, FADD y caspasa-8) que puede inducir tanto apoptosis como necroptosis, la señalización hacia una u otra vía depende de las isoformas de cFLIP que estén presentes (adaptado de (Wu *et al.*, 2012)).

RESULTADOS Y DISCUSION

TAT-NBI1, sensibiliza células tumorales resistentes a erlotinib

CAPITULO 2

2.2. RESULTADOS

2.2.1. Análisis de viabilidad celular en tratamientos de combinación NBI1 y erlotinib

La hipótesis de partida se sustenta en las recientes evidencias que relacionan la aparición de resistencias a inhibidores de EGFR en tratamientos antitumorales, con la deslocalización celular y pérdida de capacidad inhibitoria sobre las CDKs de p27 (Yamasaki *et al.*, 2007). Por tanto, es lícito asumir, que la inhibición farmacológica de CDKs podría resensibilizar células tumorales a estos tratamientos. Con este objetivo, se decidió analizar la combinación de los fármacos TAT-NBI1 y erlotinib (TAT-NBI1/erl). Como tratamiento control en todos los ensayos se utilizó roscovitina, inhibidor clásico de CDKs, en combinación con erlotinib (Rc/erl) (Fleming *et al.*, 2008). Se eligió para ello un panel de diferentes líneas celulares tumorales entre las que se incluyen una línea de cáncer de pulmón (A549) y tres líneas celulares de cáncer de mama (MDA-MB-468, MCF-7 y SkBr3), con distintos patrones de expresión del EGFR, del receptor de estrógeno (ER), y del receptor HER2/ERBB (Tabla 2.4) y diferentes niveles de sensibilidad al tratamiento con erlotinib (Chuang *et al.*, 2012).

El objetivo inicial fue determinar la sensibilidad y la concentración mínima inhibitoria del crecimiento celular frente a los fármacos (erlotinib, roscovitina y TAT-NBI1) en las líneas celulares seleccionadas (Tabla 2.4). Para ello se realizaron estudios de viabilidad celular por MTT en presencia de los fármacos a diferentes concentraciones tras 72 horas de tratamiento (Fig. 2.8). La concentración de erlotinib máxima que se utilizó en este estudio fue de 20 μM , debido a la baja solubilidad que presenta este

compuesto en medios de cultivo. Por otra parte, la concentración plasmática en pacientes con tumores sólidos avanzados se ha descrito próxima a 5 μM en el estado estacionario (Hidalgo *et al.*, 2001). De acuerdo con los precedentes bibliográficos en cuanto a la catalogación de líneas celulares sensibles y resistentes (Yamasaki *et al.*, 2007) y con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio se consideraron las líneas celulares MDA-MB-468, MCF7 y A549, resistentes a erlotinib, mientras que la línea SkBr3 se consideró sensible a dicho fármaco (Yamasaki *et al.*, 2007).

Tabla 2.4. Características y sensibilidad a TAT-NBI1 y erlotinib de las líneas celulares incluidas en el estudio.

Línea celular	HER2	EGFR	ER	Erlotinib IC50 (μM)	TAT-NBI1 IC50 (μM)
MDA-MB-468	n	p	n	>20	15
SKBr-3	p	n	n	5	10
A549	p	p	n	>20	18
MCF-7	n	n	p	>20	11

Clasificación de las líneas celulares como positivas (p) o negativas (n) para la expresión de los receptores HER2, EGFR y ER. Los valores de IC50 de las diferentes líneas celulares para el tratamiento con TAT-NBI1 o erlotinib.

Para realizar estudios de combinación de los fármacos (cotratamiento), se eligieron condiciones en las que los compuestos no resultaran tóxicos para las células de manera individual, es decir se seleccionaron concentraciones subletales para ambos fármacos (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Dosis subletales de TAT-NBI1 y erlotinib

Línea celular	Concentración subletal (μM)		
	TAT-NBI1	Erl	Rc
MDA-MB-468	5	5	5
MCF-7	1	5	1
SKBr-3	2	2	2
A549	2	2	1

Las células de cáncer de mama, MDA-MB-468, SKBr-3, MCF-7 y las células de cáncer de pulmón A549, fueron tratadas de forma simultánea y durante 72 horas con los cotratamientos TAT-NBI1/erl y Rc/erl utilizando concentraciones subletales de cada fármaco (Tabla 2.5). Posteriormente, se determinó el efecto antiproliferativo del cotratamiento mediante MTT (Fig. 2.8). En la línea celular MDA-MB-468 el cotratamiento indujo una pérdida de viabilidad de casi el 75% de las células (Fig. 2.8A) y un efecto similar se observó en las líneas de células A549 y MCF-7 (Fig. 2.8C y D, respectivamente). Además, se observó que el cotratamiento de TAT-NBI1/erl redujo notablemente la concentración letal de erlotinib en la línea sensible a erlotinib SKBr3 (Fig. 2.8B). Estos resultados sugieren que la coadministración de un inhibidor de CDK/ciclina, provoca la resensibilización de las células previamente resistentes a erlotinib. Además, el cotratamiento favoreció la reducción de la dosis letal en las células sensibles a erlotinib, ampliando así el margen terapéutico del fármaco, lo que podría contribuir a disminuir los efectos secundarios descritos asociados a dosis elevadas. Los índices de combinación de fármacos, analizados utilizando el programa Calcosyn, de todas las combinaciones administradas fueron menores que 1, lo cual indica un comportamiento sinérgico de los fármacos (Fleming *et al.*, 2008).

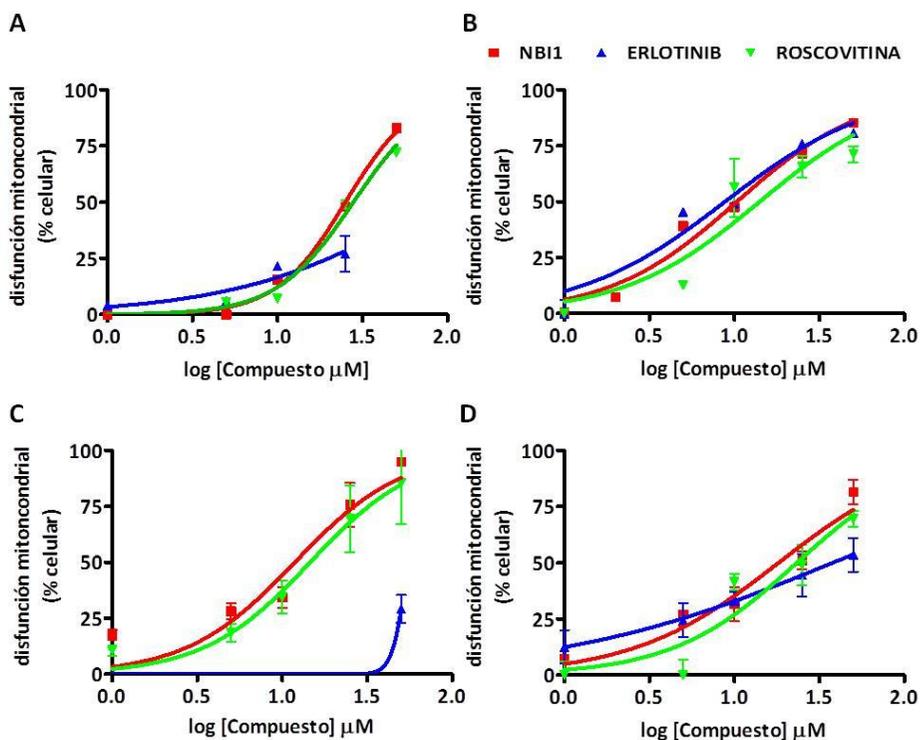


Figura 2.8. Efecto antiproliferativo de TAT-NBI1 y erlotinib. Células A. MDA MB-468 B. SkBr3 C. MCF7 D. A549, fueron tratadas con las concentraciones indicadas de los fármacos y el porcentaje de disfunción mitocondrial fue medido tras 72 horas por MTT. Los datos representan el porcentaje de disfunción mitocondrial de tres experimentos independientes.

Para confirmar que los fármacos, además de disminuir la proliferación celular, como indicaban los estudios por MTT, inducían muerte celular, se realizaron ensayos de viabilidad celular utilizando el método de exclusión del colorante vital azul de tripán confirmándose en todos los casos que las células morían tras los cotratamientos (Fig. 2.9).

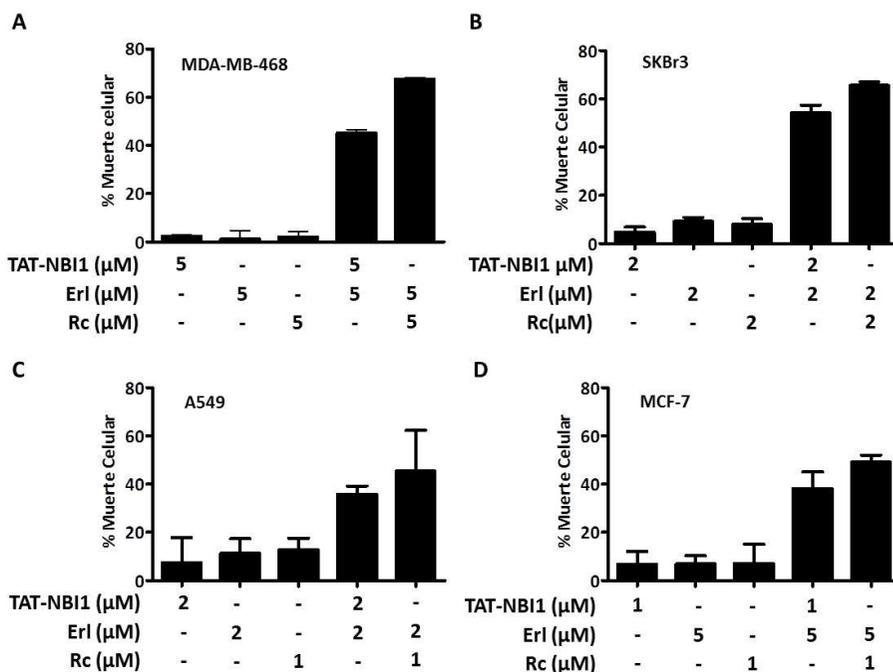


Figura 2.9. El cotratamiento TAT-NBI1/erl induce muerte celular. Porcentaje de muerte celular. A. MDA-MB-468, B. SKBr3, C. A549, D. MCF-7 determinado mediante la exclusión del colorante vital azul de tripán tras 72 horas de tratamiento a las concentraciones de compuestos indicadas. Los resultados representan el valor promedio del porcentaje de muerte celular en 3 experimentos independientes.

Con el fin de determinar los parámetros cinéticos del proceso de inducción de muerte se analizaron los porcentajes de muerte a diferentes tiempos de tratamiento, observándose que las células comienzan a morir a partir de las 48 horas y los porcentajes de muerte incrementan a las 72 horas de cotratamiento con TAT-NBI1/erl (Fig. 2.10).

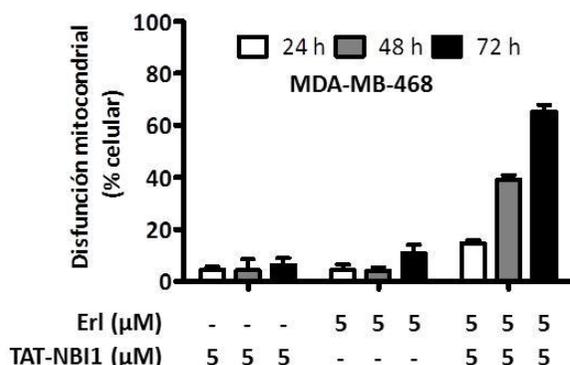


Figura 2.10. Estudio cinético del efecto antiproliferativo provocado por los tratamientos con TAT-NBI1 y erlotinib. Evaluación de la actividad mitocondrial determinada mediante MTT después de 24, 48 y 72 horas de cotratamiento en la línea de cáncer de mama MDA-MB-468. Los resultados representan el valor promedio del porcentaje de células con disfunción mitocondrial en 3 experimentos independientes.

2.2.2. Determinación del tipo de muerte celular inducida por el cotratamiento TAT-NBI1/erl

Una vez establecido que el cotratamiento con TAT-NBI1/erl era capaz de inducir muerte celular en líneas celulares tumorales con perfiles diversos, el siguiente objetivo consistió en determinar el mecanismo de muerte celular. Se analizaron para ello diferentes marcadores que permiten diferenciar si se trata de un proceso de apoptosis o necrosis. En primer lugar, se analizó la exposición de PS e incorporación de yoduro de propidio, mediante marcaje con AnnV y análisis de la distribución poblacional mediante citometría de flujo (Galluzzi *et al.*, 2009). Los resultados demuestran que el cotratamiento en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-468, SKBR3 y la línea de pulmón A549 produjo el perfil típico de células sometidas a un proceso de apoptosis. Después de 48 horas de tratamiento, la población celular mostró un perfil de marcaje correspondiente a apoptosis temprana (AnnV+/PI-) y apoptosis tardía (AnnV+/PI+)(Fig. 2.11 A, B, C). Por el contrario, siguiendo

el mismo tratamiento, la población principal de células MCF-7 fueron AnnV-/PI+, sugiriendo que las células adoptaron un proceso de necrosis celular (Fig.2.11D). Este evento se podría justificar teniendo en cuenta que la línea celular MCF-7 es deficiente en caspasa-3 y por tanto la muerte celular por apoptosis se ve comprometida (Janicke, 2009). Sin embargo, cabe resaltar que, aun en estas circunstancias, el cotratamiento fue capaz de inducir muerte celular.

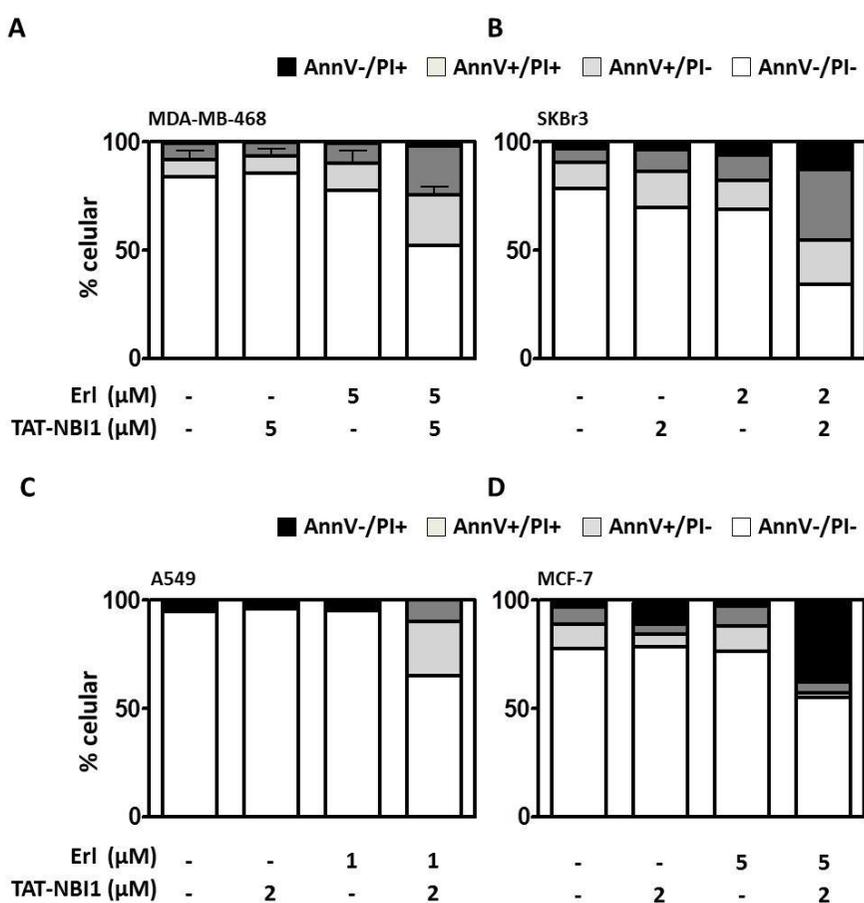


Figura 2.11. El cotratamiento con TAT-NBI1/erl induce apoptosis en diferentes líneas tumorales. Exposición de fosfatidilserina evaluada por citometría de flujo mediante el seguimiento del marcaje con AnnV e internalización de PI tras 72 horas de tratamiento en las diferentes líneas celulares. Los datos representan el promedio \pm s.d de tres experimentos independientes.

2.2.3. Análisis de la distribución del ciclo celular después del cotratamiento de TAT-NBI1/erl

El hecho de utilizar un inhibidor del complejo CDK2/ciclina A como TAT-NBI1 en los tratamientos combinados, podría estar favoreciendo, como ocurre en el tratamiento simple con TAT-NBI1 en dosis letales, que tuviera lugar un proceso de arresto en alguna de las fases del ciclo celular (Canela *et al.*, 2006). Para analizar este posible efecto, se estudió la distribución del ciclo celular a diferentes tiempos después del cotratamiento (24, 48 y 72 h). En ningún caso se observó un arresto significativo de las células en ninguna de las fases del ciclo celular. Sin embargo, en las líneas celulares MDA-MB-468, SKBR3 y A549 (Fig. 2.12 A, B y C, respectivamente), el cotratamiento redujo significativamente la proporción de células en las fases G1 y G2/M después de 48 h, lo que resultó en un aumento de la población en subG1 después de 48 y 72 horas de cotratamiento. La proporción de células acumuladas en subG1 fue aproximadamente del 50% en las tres líneas celulares, comparable con la disminución de la viabilidad celular observada por MTT y por tinción con azul de tripán (Fig. 2.8 y 2.9). Estos datos sugieren de nuevo, que la apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular. Por el contrario, en las células MCF-7 no se observó población en subG1 después de 72 horas de cotratamiento, como era previsible dado su comportamiento necrótico frente al tratamiento (Fig. 2.12D). Estos datos, sugieren que, tratamientos combinados de inhibidores de los complejos CDK/ciclina e inhibidores EGFR pueden activar diferentes mecanismos de muerte celular en función del contexto genético de la línea celular utilizada.

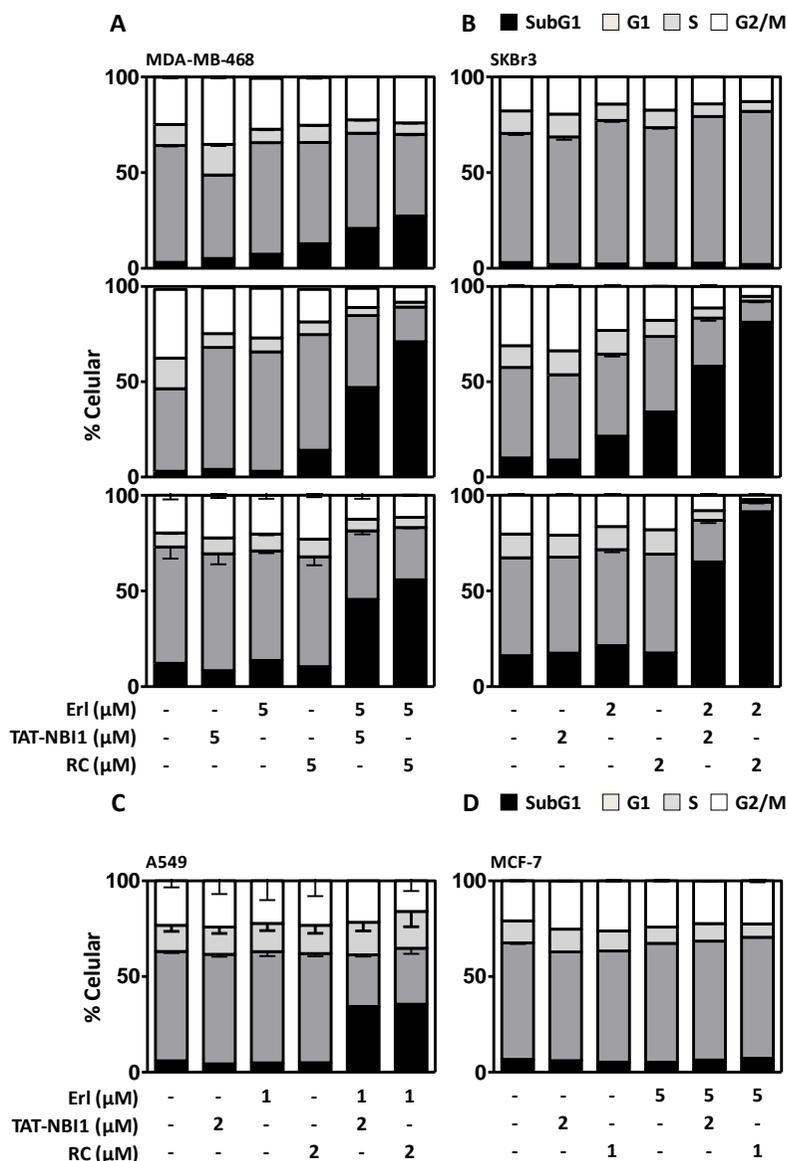


Figura 2.12. Los tratamientos de combinación con TAT-NBI1/erl y Rc/erl inducen la acumulación en subG1 en diferentes tipos celulares.

Distribución de la población celular en las diferentes fases del ciclo celular tras el tratamiento con TAT-NBI1 y erlotinib. Las células fueron incubadas con los tratamientos indicados durante 24, 48 y 72 horas en el caso de A. MDA-MB-468; B. SkBr3, y 72 horas en el caso de C. A549 y D. MCF-7. La valoración del contenido de DNA en la población celular mediante la incorporación diferencial de IP se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Los datos representan el promedio \pm s.d. de tres experimentos independientes.

2.2.4. Análisis de la acumulación de daño en DNA después del tratamiento con TAT-NBI1/erl

Una vez determinado que el cotratamiento con TAT-NBI1/erl induce muerte celular, el siguiente objetivo fue analizar los mecanismos moleculares responsables de dicha inducción. Para ello se seleccionó la línea de cáncer de mama MDA-MB-468 resistente a erlotinib. Una característica de la línea de mama MDA-MB-468, es la pérdida alélica del gen BRAC1 (cáncer de mama 1), que a su vez está asociada con un mal pronóstico terapéutico. Este gen es parte de un complejo de vigilancia del genoma que detecta anomalías en la estructura del DNA, tales como roturas en la doble cadena (DSBs) y desajustes de pares de bases (Petrini y Stracker, 2003). El mecanismo sensor que detecta las lesiones del DNA, está regulado por las quinasas de la familia PI3-K (ATM, ATR y DNA-PKC), que inducen la fosforilación de histona 2A.x en Ser139, marcador de DSBs (Rogakou *et al.*, 1998; Yuan *et al.*, 2010). Asimismo, ATR activa por fosforilación a CHK1 e induce la transducción de señales que deciden entre reparación del DNA o inducción de apoptosis (Smith *et al.*, 2010). Dado que se ha descrito que la actividad de las CDKs también regula mecanismos de reparación de DNA (Cerqueira *et al.*, 2009; Muller-Tidow *et al.*, 2004), se decidió estudiar si el tratamiento conjunto con TAT-NBI1/erl podría estar afectando a la maquinaria de reparación de daños en el DNA. Se determinó para ello la presencia de lesiones en el DNA, mediante el análisis de la fosforilación de γ -H2A.X y el estudio de la activación de los mecanismos de reparación por la fosforilación CHK1 (p-CHK1) en la línea de cáncer de mama MDA-MB-468. Después de 48 horas de cotratamiento con TAT-NBI1/erl (Fig. 2.13 A y B) y Rc/erl (Fig. 2.13 B), se observó un aumento significativo en la fosforilación y en la formación de agregados de γ -H2A.x en el núcleo (Fig. 2.13 B), en paralelo con una disminución significativa de la fosforilación de CHK1 (Fig. 2.13A). En conjunto, estos datos indican que el cotratamiento TAT-NBI1/erl tiene como

consecuencia la acumulación de defectos del DNA (Fig. 2.13A y B) y la represión del inicio de programas de reparación del DNA (Fig. 2.13A). Esta acumulación de daño al DNA también se observó en la línea A549 lo que podría justificar también en este caso que se vea comprometida la supervivencia celular (Fig. 2.20B).

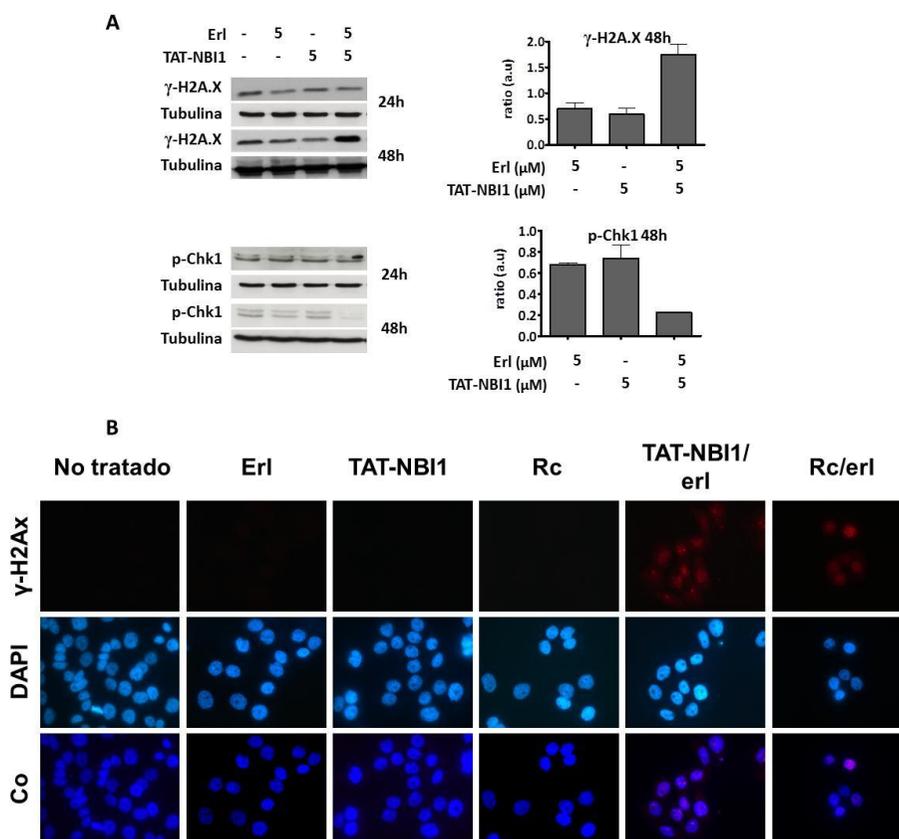


Figura 2.13. El cotratamiento con TAT-NBI1/erl induce acumulación de daños en el DNA. Las células MDA-MB-468 fueron tratadas con TAT-NBI1 y erlotinib solos y en combinación a las concentraciones μ M indicadas. A. se analizaron los niveles de fosforilación de γ -H2A.x y p-CHK1 y los niveles proteicos de tubulina como control de carga mediante western blot después de 24 y 48 horas de tratamiento. Los paneles de la derecha, muestran la densitometría realizada utilizando el programa ImageJ. B. La fosforilación de γ -H2A.x detectada por inmunofluorescencia (rojo) después de 48 horas de tratamiento (erlotinib 5 μ M, TAT-NBI1 5 μ M). Para su visualización los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). En el panel inferior se muestra la combinación (Co) de ambas imágenes.

2.2.5. Determinación de la vía de muerte celular inducida tras el cotratamiento TAT-NBI1/erl en células MDA-MB-468

Dado que el cotratamiento con TAT-NBI1/erl en MDA-MB-468 induce muerte celular por apoptosis, se estudiaron los posibles cambios en los niveles de expresión de proteínas reguladoras de estas rutas, para comprender como se llevaba a cabo la activación del proceso de muerte. El cotratamiento indujo la disminución de la expresión de las proteínas anti-apoptóticas, MCL-1, BCL-xL, BID, XIAP y cIAP1 (Fig. 2.14A), mientras que no tuvo ningún efecto sobre la proteína pro-apoptótica BAX (Fig. 2.14B). En contraste, se observó la activación de la proteína BIM, tanto en el tratamiento con erlotinib en concentraciones subletales, como en la combinación con TAT-NBI1 (Fig. 2.14B), lo que la excluye de su implicación directa en el mecanismo de muerte inducido por el cotratamiento. El aumento en la expresión de la proteína BIM ya se había descrito como una de las proteínas iniciadoras de la ruta de apoptosis inducida por el tratamiento individualizado con erlotinib en líneas celulares sensibles (Costa *et al.*, 2007).

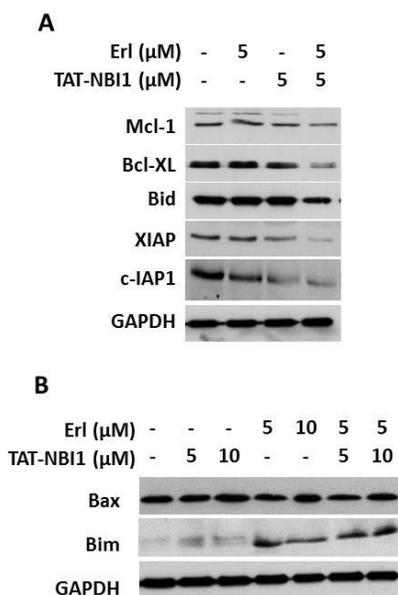


Figura 2.14. Determinación de los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2 en MDA-MB-468. Las células fueron tratadas durante 72 horas, con los fármacos a las concentraciones indicadas, bien solos o en combinación. A. Detección por western blot de los niveles de expresión de las proteínas antiapoptóticas MCL-1 y BCL-xL; la proteína BID y las proteínas inhibitoras de apoptosis XIAP Y cIAP. B. Las proteínas proapoptóticas BAX y BIM.

A continuación se investigó el efecto del cotratamiento TAT-NBI1/erl en la activación de los diferentes miembros de la familia de caspasas. No se observó activación de la caspasa iniciadora de la vía intrínseca (caspasa-9) (Fig. 2.15A) ni liberación de citocromo c al citosol (Fig. 2.15D). En estos experimentos se utilizó el fármaco citotóxico doxorubicina (doxo) como control positivo de la inducción de apoptosis mediada por la vía mitocondrial. Los tratamientos con doxo indujeron tanto la activación de caspasa-9 como la liberación de citocromo c (Fig. 2.15 D). Por tanto, se pudo concluir que el cotratamiento TAT-NBI1/erl induce apoptosis independiente de la vía apoptótica mitocondrial. Sin embargo, se evidenció una marcada activación de caspasa-3/7, 72 horas después del cotratamiento (Fig. 2.15 A, B y C).

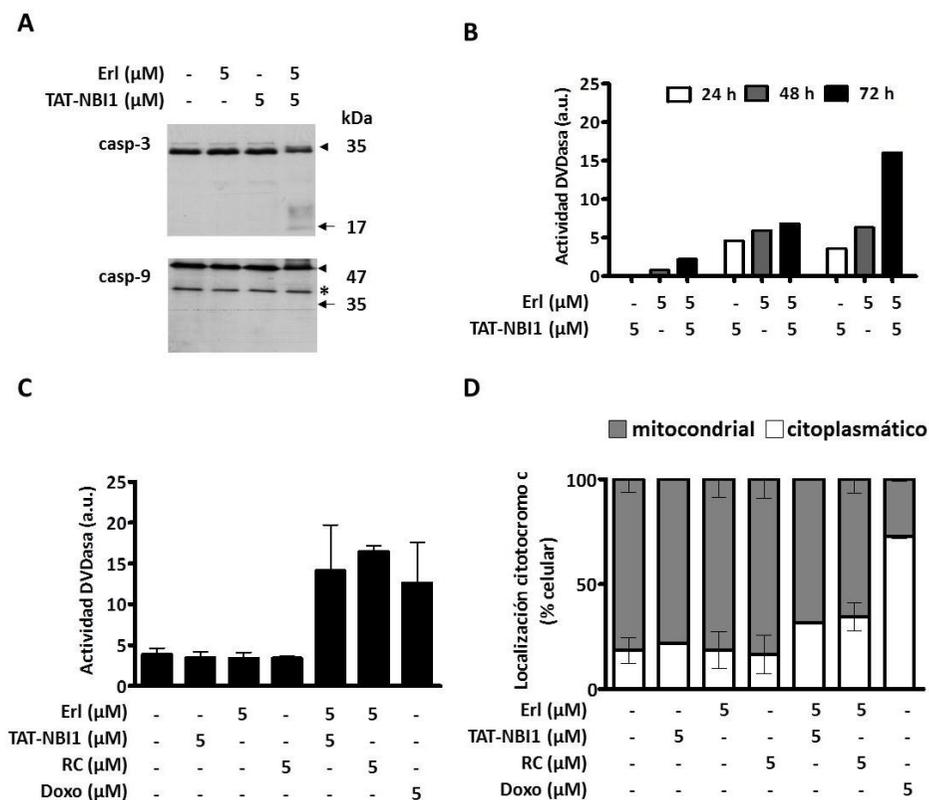


Figura 2.15. Análisis de la activación de la vía apoptótica mitocondrial en MDA-MB-468, después del cotratamiento con TAT-NBI1 y erlotinib. A. Análisis mediante western blot de la expresión y el procesamiento de caspasa-3 (procaspasa-3, 35 kDa; caspasa-3 procesada, 17 y 19 kDa) y caspasa-9 (procaspasa-9, 47 kDa; caspasa-9 procesada, 37 kDa) tras 72 horas de incubación con los tratamientos indicados. La marca * muestra bandas inespecíficas reconocidas por el anticuerpo. B. Valoración de la actividad caspasa 3/7 después de 24, 48 y 72 horas de la aplicación de los tratamientos C. Actividad caspasa-3/7 a las 72 horas de cotratamiento con TAT-NBI1/erl, Rc/erl y doxo (5μM). D. Análisis por citometría de flujo de la liberación de citocromo c tras 72 horas de tratamiento con las concentraciones de fármacos indicadas en cada caso.

Una vez determinado que la vía intrínseca de apoptosis no es la responsable de iniciar la cascada de eventos celulares que desencadenan en la muerte celular se procedió a evaluar el estado de otras caspasas iniciadoras. Se analizaron por ello mediante WB, los niveles proteicos y estado de activación de las caspasas-8 y -10, que tradicionalmente se asocian a la vía extrínseca y

de caspasa-2 que se ha relacionado de forma controvertida con la activación de apoptosis mediada por daño a DNA (Tinel y Tschopp, 2004; Vakifahmetoglu-Norberg y Zhivotovsky, 2010). Los resultados mostraron, que tras los cotratamientos, caspasa-2, -8 y -10 se procesaron a sus subunidades activas (Fig. 2.16). La disminución previamente observada en la proteína BID, podría ser por tanto debida a la activación de caspasa-8 (Fig. 2.14A), proteasa responsable de su procesamiento.

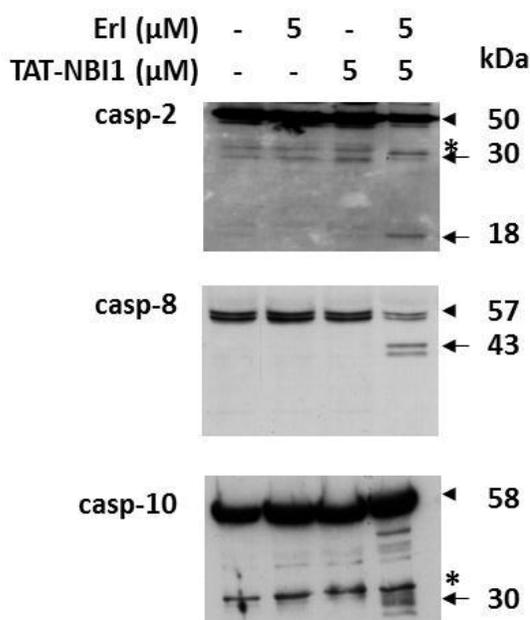


Figura 2.16. Análisis de la activación de caspasas en MDA-MB-468.

Después de 72 horas de tratamiento con TAT-NBI1 y erl, a las concentraciones indicadas, se analizó la expresión de A. caspasa-2 (procaspasa-2, 50 kDa; caspasa-2 procesada, 30 y 18 kDa); caspasa-8 (procaspasa-8, 57 kDa; caspasa-8 procesada, 43 kDa y caspasa-10 (procaspasa-10, 58 kDa; caspasa-10 procesada, 30 kDa) mediante western blot. La marca * muestra bandas inespecíficas reconocidas por el anticuerpo.

A pesar de que el cotratamiento con TAT-NBI1 indujo la activación de caspasas y muerte celular, esta última no fue inhibida por el inhibidor general de caspasas zVAD-fmk (Fig. 2.17A y B), a diferencia de la muerte

celular inducida por Rc/Erl que sí fue claramente inhibida por zVAD-fmk (Fig. 2.17A y B). Las bases moleculares de estas diferencias podrían justificarse por el distinto mecanismo de acción de los dos inhibidores de complejos CDK/ciclina. Roscovitina es un inhibidor ATP competitivo, mientras que TAT-NBI1 se une a un sitio conservado en la superficie de algunas ciclinas impidiendo la formación del complejo con su correspondiente CDK. Por lo tanto, la selectividad quinasa y la sensibilidad de los distintos complejos CDK/ciclina son diferentes para los dos fármacos (Bach *et al.*, 2005) y podrían determinar la respuesta diferencial en la acción de zVAD-fmk.

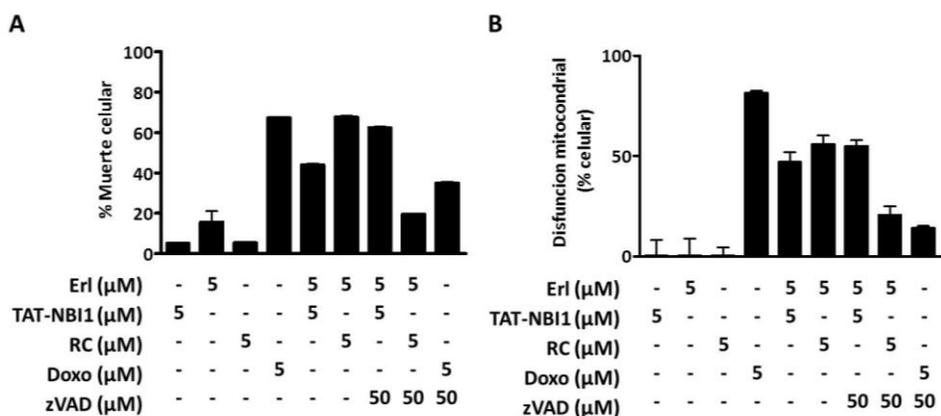


Figura 2.17. La muerte inducida por el cotratamiento TAT-NBI1/erl no es inhibible por zVAD-fmk. Las células MDA-MB-468 fueron tratadas con TAT-NBI1, erlotinib o roscovitina, solos y en combinación durante 72 horas, en presencia o ausencia de zVAD-fmk (50 μM). Como control de la inhibición de zVAD-fmk se utilizó doxo. La viabilidad fue analizada en A. por exclusión del colorante vital azul de tripán y en B. mediante MTT.

También se analizó la posible implicación del PIDDosoma en la activación de apoptosis mediada por el cotratamiento, ya que se ha descrito que en respuesta a estrés genotóxico y daño a DNA se activa este complejo (Tinel y Tschopp, 2004). El reclutamiento de caspasa-2 por el PIDDosoma, induce su procesamiento y el inicio del proceso de apoptosis (Janssens y Tinel, 2012).

Por tanto, se procedió a silenciar caspasa-2 y PIDD para comprender la relevancia de ambas en el mecanismo de inducción de muerte mediada por el cotratamiento (ver materiales y métodos apartado 5.3.2.12). Los resultados muestran que, incluso después del silenciamiento génico, la actividad caspasa-3/7 no disminuyó (Fig. 2.18 A y C) y se mantuvo el procesamiento de caspasa-8 y caspasa-10 (Fig. 2.18 B y D). Estos resultados sugieren que el PIDDosoma, no es el desencadenante del proceso de apoptosis tras el cotratamiento con TAT-NBI1 y erlotinib.

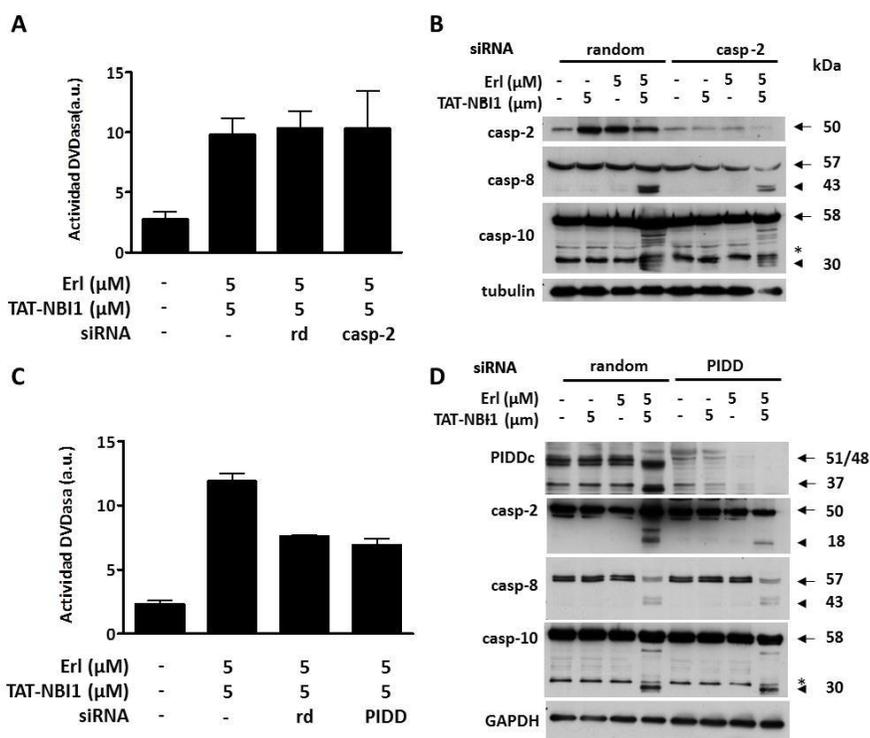


Figura 2.18. El PIDDosoma no es el responsable de la inducción de muerte mediada por el cotratamiento con TAT-NBI1/erl. Las células MDA-MB-468 son transfectadas con un control (random), con el siRNA de caspasa-2 o de PIDD, y a las 24 horas fueron cotratadas. A/C. Actividad caspasa-3/7 tras el silenciamiento de caspasa-2 o PIDD, respectivamente. B. Silenciamiento de caspasa-2, así como estado de activación de caspasa-8 y -10 determinado por western blot. D. Expresión de PIDD tras su silenciamiento, así como el estado de activación de caspasa-2, -8 y -10 determinados por western blot.

Con el fin de analizar la relevancia de la activación de las caspasas -8 y -10 en la inducción de apoptosis, la expresión de ambas proteínas fue silenciada (ver apartado 5.3.2.1.2 de materiales y métodos). Para ello se transfectaron las células con el siRNA correspondiente en cada caso y se incubaron durante 24 horas para permitir el silenciamiento. Posteriormente, las células fueron tratadas con TAT-NBI1/erl. Los resultados muestran una marcada disminución en la actividad caspasa-3/7 tras el silenciamiento individual de caspasa-8 (Fig. 2.19A). Sin embargo, el silenciamiento de caspasa-8 no impidió que se produjera el procesamiento de caspasa-10 y de caspasa-2 (Fig. 2.19B). Similares resultados se obtuvieron con el silenciamiento de caspasa-10. La actividad caspasa-3/7 disminuyó (Fig. 2.19C) del mismo modo que el procesamiento de caspasa-2, mientras que se mantuvo el procesamiento y activación de caspasa-8 (Fig. 2.19D).

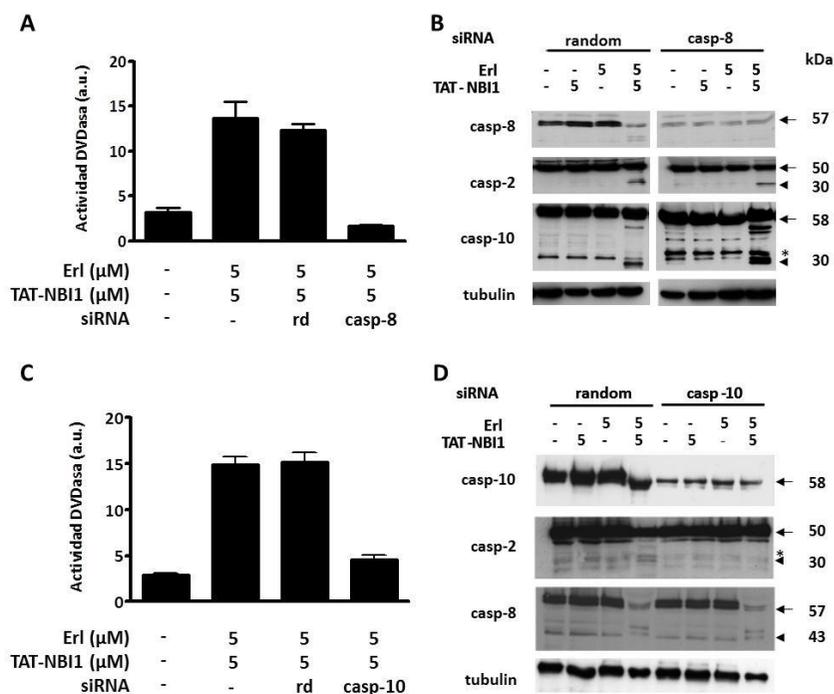


Figura 2.19. El silenciamiento génico de caspasa-8 y caspasa-10 inhibe la apoptosis mediada por los cotratamientos de TAT-NBI1/erl en MDA-MB-468. Las células fueron no transfectadas, transfectadas con un siRNA de caspasa-8 o caspasa-10 o transfectadas con un siRNA control (rd). Los tratamientos indicados se aplicaron 24 horas después de la transfección. A/C. Análisis de la actividad caspasa-3/7 tras 72 horas en presencia de los tratamientos indicados previo silenciamiento de caspasa-8 ó caspasa-10, respectivamente. B/D. Análisis del silenciamiento de caspasa-8 o caspasa-10 respectivamente, así como de la expresión y estado de procesamiento de caspasa-2 y 10 determinados mediante western blot.

En conjunto los resultados demuestran que en la apoptosis inducida por el cotratamiento con TAT-NBI1/erl, la activación de caspasa-8 y caspasa-10 son necesarias (Fig. 2.19). Además, los resultados apuntan a una activación de caspasa-2 mediada por caspasa-10 (Fig. 2.19D), sin embargo, caspasa-2 no parece ejercer una acción directa sobre la inducción de apoptosis (Fig. 2.18A). El mecanismo de activación de apoptosis observado en MDA-MB-468 parece ser común para las diferentes líneas celulares puesto que en el estudio realizado sobre la línea celular A549 se obtuvieron resultados similares (Fig. 2.20).

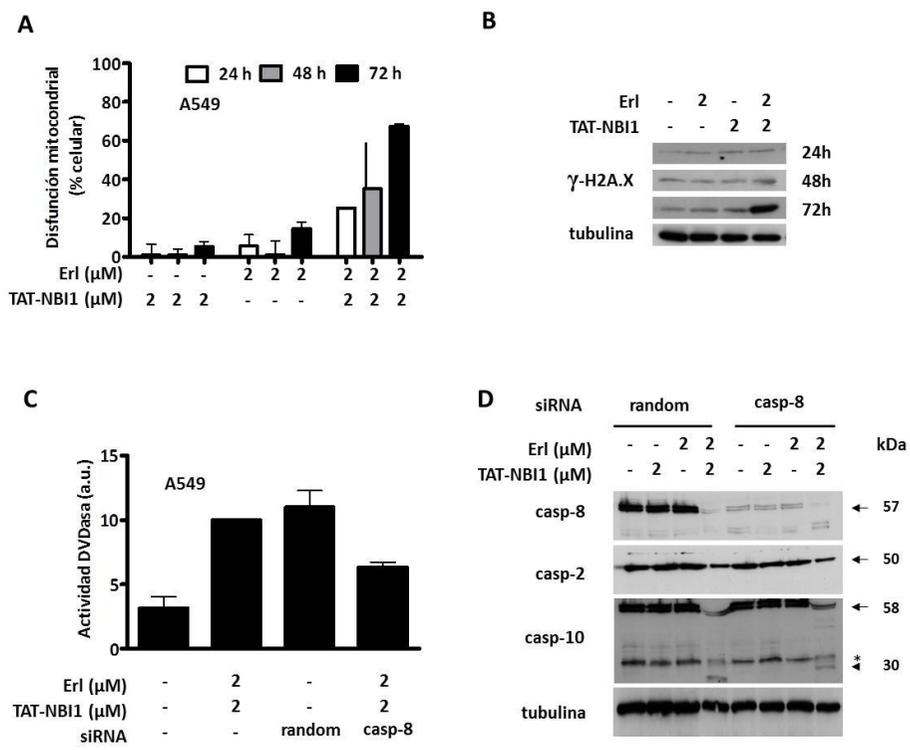


Figura 2.20. TAT-NBI1/erl tiene efecto sinérgico en la línea de pulmón A549, además el silenciamiento génico de caspasa-8 inhibe la apoptosis. A. La actividad mitocondrial después de 24, 48 y 72 horas de cotratamiento determinado mediante MTT. B. Análisis de los niveles de fosforilación de γ -H2A.x detectado por western blott después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento. C. Actividad caspasa-3/7 tras el silenciamiento de caspasa-8. D. Análisis mediante western blot del silenciamiento de caspasa-8, así como de los niveles de expresión y procesamiento de caspasa-2 y -10.

Los resultados obtenidos apuntan a dos eventos básicos en el mecanismo de activación de apoptosis inducido por el cotratamiento; la disminución de cIAP1 y XIAP, y la activación de caspasa-8 y -10. Se han descrito dos mecanismos diferentes de muerte celular que podrían conformar la base molecular de este perfil apoptótico, uno estaría relacionado con la activación de receptores de TNF (Wang *et al.*, 2008) y otro podría consistir en la activación del rioposoma (Feoktistova *et al.*, 2011; Tenev *et al.*, 2011). La ruta mediada por TNF, activa la formación del complejo I (RIP1, TNFR1,

TRADD, TRAF2/5, Lubac y cIAPs), y tras la deubiquitinación de la quinasa RIP1, se forma el complejo IIB, donde FADD y caspasa-8 son reclutados. Esto conduce a la activación de caspasa-8 y el inicio del proceso de apoptosis. Por el contrario, el ripoptosoma (RIP1, RIP3, FADD, caspasa-8 y caspasa-10) se forma en respuesta a estrés genotóxico y es independiente de la activación de TNFR. Se ha descrito recientemente que la muerte celular inducida por el ripoptosoma no es inhibida por zVAD-fmk. Mientras que necrostatina-1 (nec-1) (Hitomi *et al.*, 2008), inhibe la unión de RIP1 a RIP3, inhibiendo su formación (Feoktistova *et al.*, 2011; Tenev *et al.*, 2011). En este contexto, se decidió evaluar si el cotratamiento con TAT-NBI1/erl, era dependiente de RIP1 y para ello se llevaron a cabo los procedimientos de cotratamiento pero en presencia de nec-1. Como control se utilizó la línea celular MDA-MB-231, en la que previamente se había descrito que el estrés genotóxico inducido por etopósido, da lugar a la inducción del ripoptosoma (Tenev *et al.*, 2011). De este modo se demostró que nec-1 también inhibe la activación de caspasas inducida por TAT-NBI1/erl, tanto en las células MDA-MB-231 como en las células MDA-MB-468 (Fig. 2.21A y B, respectivamente). Así mismo, nec-1 fue capaz de inhibir la muerte de las células MCF-7 después del cotratamiento con TAT-NBI1/erl. (Fig. 2.21C).

Los datos en conjunto, indican que el cotratamiento con TAT-NBI1/erl, induce un mecanismo de muerte celular caracterizado por la acumulación de daño en DNA, disminución de cIAPs y XIAP y apoptosis dependiente de caspasa-8 y -10. Así mismo, el proceso no es inhibido por zVAD-fmk pero sí por nec-1, posicionando al ripoptosoma o al receptor de TNFR1 como los posibles complejos integradores de señales y activadores del mecanismo de muerte celular inducida por el cotratamiento (Feoktistova *et al.*, 2011). En el caso de la línea celular MCF-7, que no tiene caspasa-3, el cotratamiento con TAT-NBI1 también induce muerte celular, que es inhibida con nec-1, lo que sugiere que el mecanismo de muerte en este caso podría ser necroptosis.

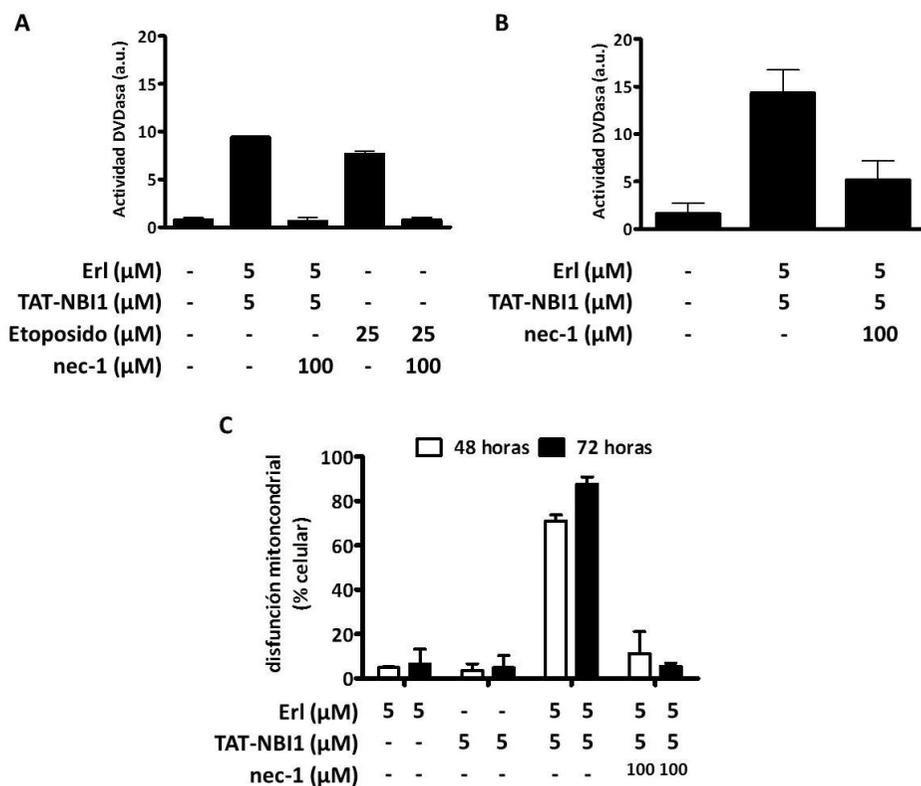


Figura 2.21. Necrostatina-1 inhibe la apoptosis inducida tras el cotratamiento con TAT-NBI1/erl. A. Actividad caspasa-3/7 en células MDA-MB-231, tratadas con etoposido (25 μM) ó TAT-NBI1/erl, y con o sin necrostatina-1 (nec-1, 100 μM). B. Actividad caspasa-3/7 en células MDA-MB-468, después del cotratamiento con TAT-NBI1/erl, y con nec-1. C. Actividad mitocondrial después de 48 y 72 horas de cotratamiento con y sin nec-1, en la línea de cáncer de mama MCF-7 determinado mediante MTT.

2.3. DISCUSION

Desde la aprobación de gefitinib en 2003 por la FDA los EGFR-TKI se utilizan habitualmente en la práctica clínica para el tratamiento de distintos tipos de cáncer. Sin embargo, sólo un pequeño número de pacientes responden a este tipo de tratamiento y la aparición de resistencia adquirida es común entre las personas que responden. La resistencia se ha visto principalmente en los tumores de mama. El 50-70% de los tumores de mama, sobreexpresan EGFR, lo cual es un indicador de tumores agresivos y de mal pronóstico (Schroeder *et al.*, 1997). Así mismo, estos tumores generalmente carecen de la expresión del receptor de estrógenos alfa (ER α), receptor de progesterona, y ErbB2 (Burness *et al.*, 2010). Dada la agresividad de estos tumores y la ausencia de terapias dirigidas, la identificación de nuevos tratamientos es una prioridad. Otras de las limitaciones de los tratamientos está relacionada con la aparición de efectos tóxicos secundarios, en muchos casos asociados a la utilización de las altas dosis. Además, debido a la redundancia en la señalización, otras rutas convergen en las vías activadas por EGFR, de modo que la inhibición de EGFR, por sí sola, no es suficiente para la supresión completa de la cascada de señales. En este contexto, inhibidores de vías complementarias tales como mTOR, VEGF y RAS/RAF/ERK, han sido diana, para la búsqueda de tratamientos alternativos (Adjei, 2006). Las terapias combinadas se consideran por ello una aproximación válida y necesaria para eludir la toxicidad, así como la aparición de resistencias. Una mejor comprensión de la sinergia y/o potenciación evocada a nivel molecular por las combinaciones de fármacos ayudará al desarrollo de estos tratamientos dirigidos a diferentes vías

simultáneamente. Así por ejemplo, se han obtenido resultados alentadores en ensayos clínicos que se encuentran en fase I y II, utilizando terapias combinadas con inhibidores de EGFR e inhibidores de angiogenesis. Un estudio en fase I/II utilizando la combinación de erlotinib y bevacizumab ha demostrado actividad antineoplásica en carcinoma hepatocelular avanzado (Yau *et al.*, 2012), y en pacientes con carcinoma de células escamosas avanzado de cabeza y cuello (Kundu y Nestor, 2012). Asimismo, existen estudios en fase I/II en los que se administra erlotinib en combinación con sorafenib (inhibidor VEGFR y de quinasas RAF) para el tratamiento de glioblastomas (Wick *et al.*, 2011). Datos de un estudio de fase II de lapatinib y bevacizumab en cáncer de mama metastásico HER2+, indicaron que la combinación es bien tolerada, con una actividad antitumoral prometedora (Rexer y Arteaga, 2012). Los datos preliminares de un estudio de fase I con everolimus (inhibidor de mTOR) y erlotinib en tratamientos de cáncer de mama avanzado han producido resultados alentadores (Barnett, 2012). Tanto estudios preclínicos como clínicos, han mostrado que la combinación de EGFR TKIs con quimioterapia (Mahaffey *et al.*, 2007; Riely *et al.*, 2009; Solit *et al.*, 2005) atenúa los efectos citotóxicos. Esto parece ser debido a que las células son arrestadas en G1, protegiéndose de los efectos de los quimioterapéuticos, que conducen a apoptosis preferentemente a células que se encuentran en fase S (gemcitabina, derivados del platino, pemetrexed) o en fase G2/M (taxanos) (Li *et al.*, 2007; Solit *et al.*, 2005; Visentin *et al.*, 2010).

Los complejos CDK/ciclina debido a su papel fundamental en la progresión del ciclo celular, diferenciación, transcripción y apoptosis, son un atractivo conjunto de dianas para el diseño de nuevos fármacos anticancerígenos. En las últimas décadas, un gran número de inhibidores de CDKs con diferentes mecanismos de acción han sido evaluados en ensayos preclínicos y clínicos. Entre ellos, roscovitina es uno de los inhibidores que ha sido evaluado en

profundidad, tanto en tratamientos individuales como combinados. Así por ejemplo, se ha demostrado que roscovitina es capaz de inducir apoptosis en diferentes líneas tumorales además de potenciar el efecto antitumoral de diversos agentes citotóxicos (Fleming *et al.*, 2008; Grant y Roberts, 2003); en combinación con TRAIL induce la sensibilización de células de cáncer de mama resistentes (Ortiz-Ferron *et al.*, 2008); en estudios clínicos en fase II su combinación con sapacitabina (inhibidor de la síntesis de DNA) ha mostrado resultados positivos en el tratamiento de pacientes con tumores sólidos avanzados (Liu *et al.*, 2012), etc.

En este trabajo se ha puesto de manifiesto que la administración conjunta de TAT-NBI1, un inhibidor no competitivo de ATP del complejo CDK2/ciclina A, con erlotinib, un inhibidor de la actividad tirosina quinasa del EGFR, podría aportar ventajas en los tratamientos antitumorales. Se ha demostrado, que el cotratamiento provoca, tanto la disminución de la dosis de erlotinib necesaria para inducir muerte en las células sensibles como la sensibilización de células resistentes. Además el cotratamiento es capaz de inducir diferentes tipos de muerte celular en función de los componentes genéticos de la línea celular analizada. Así, se ha comprobado que el cotratamiento TAT-NBI1/erl induce necroptosis en la línea celular MCF-7 (línea resistente a erlotinib) que carece de caspasa-3 (Douarre *et al.*, 2005; Janicke, 2009; Kweon *et al.*, 2006; Meng *et al.*, 2012). Por el contrario, en la línea de cáncer de mama SKBr3 (línea sensible a erlotinib), en la línea de cáncer de mama MDA-MB-468 y en la línea de cáncer pulmón A549 (líneas resistentes a erlotinib), el cotratamiento TAT-NBI1/erl induce muerte celular mediada por apoptosis. Esta sensibilización de células tumorales, tanto sensibles como resistentes a erlotinib, demuestra una mejora importante en el valor terapéutico de los EGFR-TKI, cuando se administra en combinación con un inhibidor CDK/ciclina, y en particular con un inhibidor no competitivo de ATP, como es TAT-NBI1.

Un análisis más detallado del mecanismo molecular sugirió que la apoptosis que desencadena el cotratamiento puede ser inducida por el estrés genotóxico que se manifiesta por acumulación de defectos en el DNA de las células tratadas. Se ha observado también la disminución de IAPs y alteraciones en los niveles de las proteínas relacionadas con apoptosis, tales como BCL-xL, MCL-1, BID y BIM, que inician la activación de la vía de señalización apoptótica, que finalmente activa las caspasas y provoca el desmantelamiento celular. Las IAPs tienen la capacidad de inhibir el ripoptosoma, y además, son reguladores positivos de la vía NF- κ B, en la señalización del complejo I, cuando se activa el receptor de TNFR1. Así mismo, las IAPs son frecuentemente desregulados en procesos tumorales, lo que favorece la resistencia a la quimioterapia, progresión de la enfermedad, un pobre pronóstico y con ello la supervivencia celular. La depleción de IAPs, da como resultado la formación del complejo IIB en respuesta a TNF-R1 o la formación del ripoptosoma, los cuales resultan en una rápida activación de la caspasa-8 y la inducción de la apoptosis (Feoktistova *et al.*, 2011).

Los datos obtenidos en el presente trabajo, sugieren que el estrés genotóxico inducido por TAT-NBI1/erl depende de la activación del ripoptosoma (Fig. 2.22) como la maquinaria molecular que conduce a la activación de las caspasas-8 y -10. De hecho, en presencia del inhibidor de RIP1 (nec-1) la muerte celular por apoptosis inducida por TAT-NBI1/erl se ve disminuida drásticamente. Sin embargo, no podemos descartar la implicación del complejo IIB (Fig. 2.22) en el proceso. Para poder hacerlo sería necesario bloquear las rutas de activación de apoptosis extrínseca que provocan la activación de caspasa-8 mediante la formación del complejo IIB (TNF, TRAIL o CD95). En contraste, observamos una pobre activación de la vía intrínseca, como demuestran los bajos niveles de salida de citocromo c y la falta de activación de caspasa-9. Esto apoya la idea de que en el mecanismo

molecular de inducción de muerte celular la formación del ripoptosoma/complejo IIB tendría un papel relevante. Por otra parte, el silenciamiento de caspasa-8 y caspasa-10, pero no de caspasa-2, disminuye la activación de caspasa-3/7 en células sometidas al cotratamiento TAT-NBI1/erl sugiriendo la participación de una vía de señalización en la que la caspasa-2 se sitúa después de la activación de caspasa-8/-10 (Fig. 2.19D). Las funciones de caspasa-2 son todavía hoy por hoy controvertidas, aunque se ha demostrado su papel en apoptosis (Janssens y Tinel, 2012; Kumar, 2009), también se ha descrito su contribución a supervivencia celular. De hecho, se ha demostrado que caspasa-2 contribuye a un “*feedback loop*” positivo por su participación en la inhibición de MDM2 que refuerza la estabilidad de p53 y contribuye a la supervivencia celular y resistencia a diversos fármacos (Oliver *et al.*, 2011).

Se ha descrito recientemente que tratamientos escalonados en el tiempo con erlotinib y doxo sensibilizaron a un subconjunto de células de cáncer de mama resistentes; en este estudio también se propuso un papel relevante a caspasa-8 para este tipo particular de tratamiento combinado aunque no se estableció definitivamente el mecanismo molecular (Lee *et al.*, 2012). Con nuestros datos se podría especular que en la base del mecanismo molecular se podría también situar una activación mediada por el ripoptosoma como la propuesta en este estudio. La formación del ensamblaje del ripoptosoma, induce la muerte por apoptosis así como la señalización proinflamatoria que puede dar lugar a la eliminación del tumor. Algunos estudios han demostrado que el estrés genotóxico no puede estimular la asociación de RIP1 con caspasa-8 en células normales, pero sí en células tumorales (Tenev *et al.*, 2011), lo cual podría representar una ventaja prometedora para matar selectivamente células tumorales. Está claro, que se requiere trabajo adicional para dilucidar plenamente si el ripoptosoma o el complejo IIB es el

complejo inductor de muerte y como este cotratamiento puede ser un potencial tratamiento en cáncer.

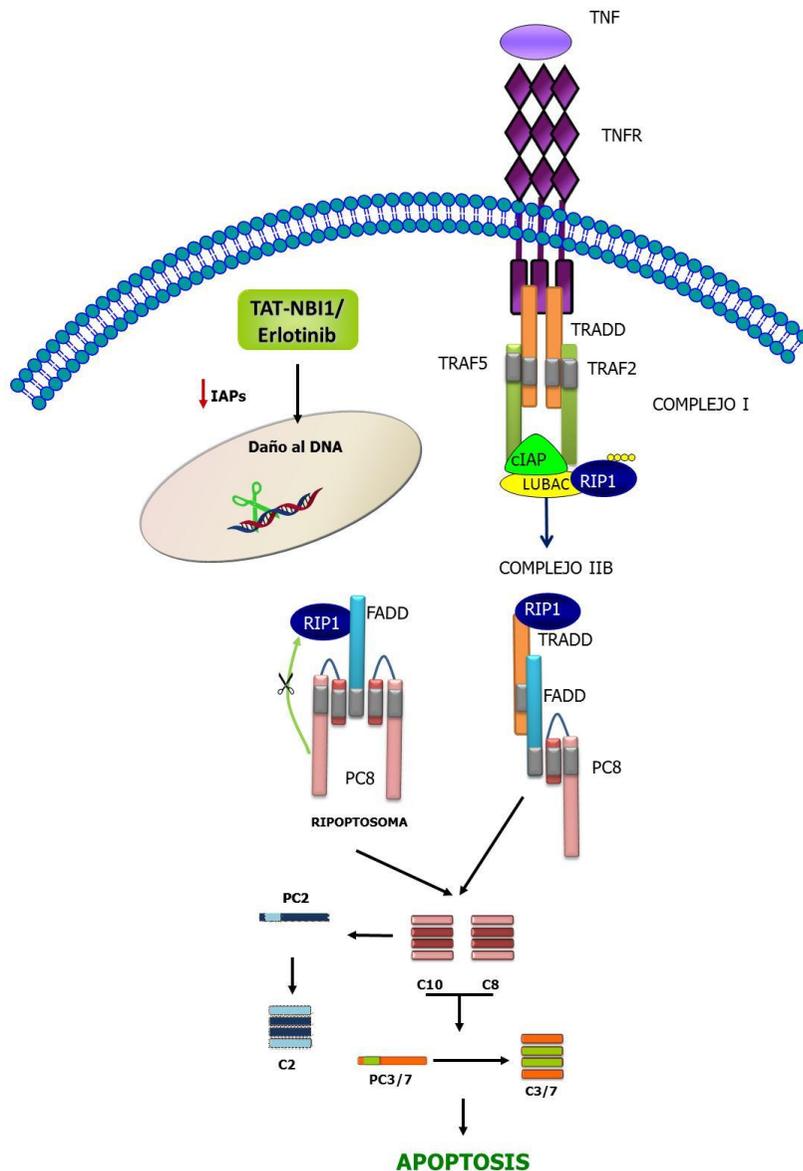


Figura 2.22. Modelo de activación de apoptosis tras el cotratamiento con TAT-NBI1/erl. El tratamiento con TAT-NBI1/erl, induce estrés genotóxico, que provoca la depleción de IAPs. Como consecuencia se formaría el complejo IIB en respuesta a TNF-R1 o el rioposoma, que activan caspasa-8 e inician la activación de muerte por apoptosis.

CAPITULO 3

Inhibidores de ciclo celular en
procesos de regeneración
celular

3.1 INTRODUCCION

3.1.1. Inhibidores CDK en regeneración celular

Está bien establecido que las alteraciones en la actividad de las CDKs son determinantes en la proliferación de células tumorales y su inhibición contribuye a la disminución de la proliferación y a la inducción de apoptosis. Sin embargo, en determinadas condiciones fisiológicas, la parada del ciclo celular mediante el uso de inhibidores de CDKs puede permitir a la célula iniciar procesos de reparación del daño. Así, recientemente, se ha planteado el posible desarrollo de inhibidores de CDK como potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de procesos de daño neurológico. Se ha descrito que la administración de roscovitina induce inhibición de apoptosis con efectos neuroprotectores, antiexcitotóxicos y antiinflamatorios en modelos de isquemia cerebral y enfermedades neurodegenerativas (Hilton *et al.*, 2008; Iyirhiaro *et al.*, 2008; Menn *et al.*, 2010). Aunque el mecanismo molecular no se conoce con detalle, se ha sugerido la implicación de CDK5 (Hilton *et al.*, 2008; Menn *et al.*, 2010).

3.1.1.1. CDK5

CDK5 es un miembro atípico de la familia de las CDKs, que fue descrita por primera vez en 1992 (Hellmich *et al.*, 1992; Hisanaga *et al.*, 1993; Lew *et al.*, 1992; Meyerson *et al.*, 1992). Es una quinasa altamente conservada en mamíferos que se expresa en todos los tejidos, aunque destacan los altos niveles de expresión en el sistema nervioso central (Dhariwala y Rajadhyaksha, 2008). CDK5 se regula por las proteínas p35 y p39,

principalmente localizadas en la membrana, aunque pueden encontrarse también en núcleo o citoplasma. La proteína p25 es un fragmento proteolítico de p35 (fragmento de 208 aminoácidos del extremo C-terminal de p35), generado por calpaína (proteasa dependiente de calcio) que induce una activación de CDK5 sostenida en el tiempo y su cambio de localización al núcleo, alterando así la especificidad por sustrato. p35 es relevante para la homeostasis del sistema nervioso ya que su déficit se asocia con la aparición de defectos en migración neuronal y en la formación y actividad sináptica (Ko *et al.*, 2001). Ciclina I también se ha descrito como proteína reguladora de CDK5. Ciclina I se expresa constitutivamente en células diferenciadas como neuronas, cardiomiocitos y podocitos. Los ratones nulos para ciclina I no muestran alteraciones en el desarrollo, ni alteraciones fenotípicas evidentes. Sin embargo, los podocitos de estos ratones son mucho más susceptibles a la entrada en apoptosis. Por el contrario, el aumento en la expresión de ciclina I previene la muerte celular de podocitos tanto *in vitro* como *in vivo* (Griffin *et al.*, 2006). Por tanto se puede considerar que CDK5 tiene un papel dual participando en la activación de rutas de supervivencia y de apoptosis celular (Fig. 3.1).

El complejo CDK5/p35 está implicado en procesos tanto de supervivencia, como de muerte celular mediante la fosforilación de diversos sustratos (Fig. 3.1 y Fig. 3.2). Regula negativamente la activación de la vía proapoptótica de JNK, directamente, fosforilando JNK3 (Li *et al.*, 2002); participa en la activación de la ruta de supervivencia celular de la fosfatidil inositol 3 quinasa/AKT (PI3K/AKT) mediante la activación de receptores ErbB. Los complejos CDK5/ciclina I y CDK5/p35, regulan la expresión y fosforilación de las proteínas antiapoptóticas BCL-xL y BCL-2 (Brinkkoetter *et al.*, 2009; Cheung *et al.*, 2008) y además CDK5/ciclina I media la activación de rutas de supervivencia como MEK/ERK (Brinkkoetter *et al.*, 2009).

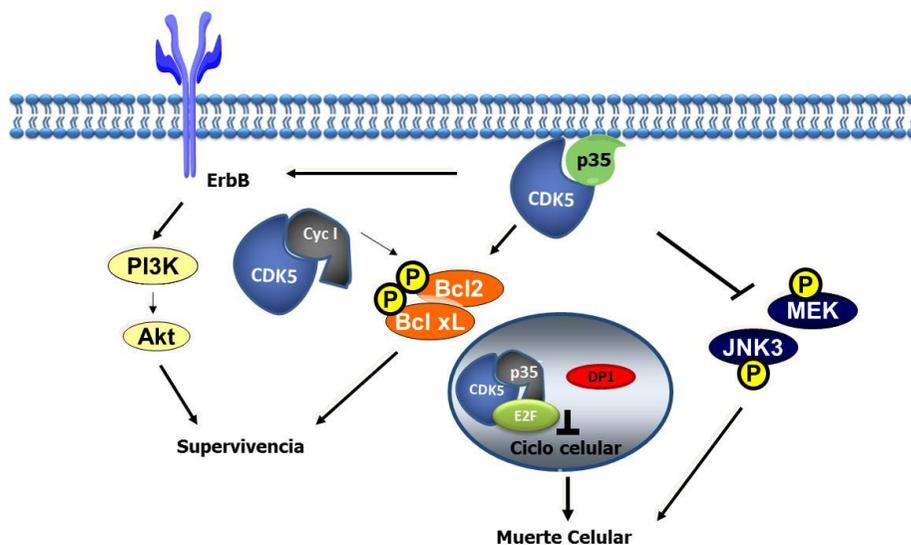


Figura 3.1. CDK5 regula apoptosis y supervivencia celular. CDK5/p35 fosforila BCL-2 y ErbB, activando la vía PI3K-Akt de supervivencia y, fosforila JNK3 y MEK1 inhibiendo la muerte celular. Sin embargo, en el núcleo CDK5/p35, rompe el complejo de DP1 con E2F1, dando lugar a la inhibición del ciclo celular y a la activación de rutas de apoptosis (adaptado de (Hisanaga y Endo, 2010)). El complejo CDK/ciclina I activa por fosforilación las proteínas BCL-2 y BCL-xL, promoviendo la supervivencia celular (Brinkkoetter *et al.*, 2009).

La actividad CDK5/p35 también influye en la disfunción mitocondrial debido a su capacidad de fosforilar peroxirredoxina 2 (Prx2) en el citoplasma. Prx2 es una enzima antioxidante con actividad peroxidasa. La fosforilación mediada por CDK5, reduce la actividad de Prx2 provocando el aumento del stress oxidativo y por tanto de la muerte neuronal (Qu *et al.*, 2007; Rashidian *et al.*, 2009). Por otra parte CDK5, cuando se encuentra asociada a p25, está implicada mayoritariamente en la inducción de apoptosis (Fig. 3.2). CDK5 fosforila los receptores de glutamato dependientes de N-metil-D-aspartato (NMDA) en el citoplasma, lo que hace aumentar la afluencia de calcio provocando la activación de calpaínas y por tanto la escisión de p35 a p25, dando lugar a la activación prolongada del complejo CDK5/p25 que induce muerte celular. Además, CDK5/p25 inhibe la acción del factor de

transcripción prosupervivencia MEF2 (factor potenciador de miocitos 2). (Gong *et al.*, 2003); exagera la muerte celular mediante la fosforilación de p53, aumentando con ello la transcripción de BAX (Zhang *et al.*, 2002); fosforila HDAC1 y la inactiva, provocando la compactación de la cromatina, la inhibición de la transcripción de genes como p21, E2F-1, ciclina A y ciclina E y la aparición de roturas en el DNA de doble cadena lo que contribuye al aumento de los procesos de muerte neuronal (Hisanaga y Endo, 2010; Kim *et al.*, 2008).

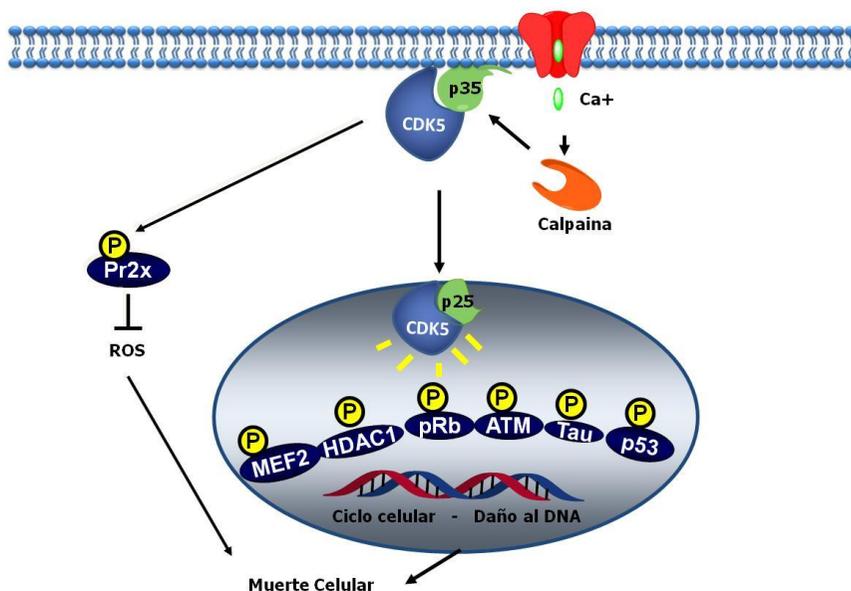


Figura 3.2. Mecanismos de inducción de muerte celular mediados por CDK5. En presencia de estímulos como estrés oxidativo o excitotoxicidad, las calpaínas cortan p35 produciendo p25, que cambia su localización al núcleo. La interacción de p25 con CDK5 induce la fosforilación de diferentes sustratos activando rutas de muerte celular. CDK5/p35 fosforila peroxirredoxina 2 (Prx2) en el citoplasma inhibiéndola y provocando así el aumento del stress oxidativo lo que activa rutas de muerte celular (adaptado de (Hisanaga y Endo, 2010)).

Aunque el papel de CDK5 ha sido especialmente estudiado en cerebro y en concreto en la regulación de los procesos de muerte y supervivencia neuronal,

en los últimos años se ha puesto de manifiesto su relevancia en otros tipos y procesos celulares. Actualmente se reconoce su papel en procesos de senescencia, transporte de glucosa, migración y cicatrización (Laloti *et al.*, 2009; Saikkonen *et al.*, 2008; Tripathi *et al.*, 2008). Sin embargo su regulación por los niveles de las proteínas reguladoras (p35, p25 y ciclina I) no está totalmente establecido y apunta a una regulación en la que más que la abundancia relativa de una u otra proteína, lo que parece determinante son las cantidades relativas entre ellas (Taniguchi *et al.*, 2012). Con estos antecedentes, se propuso como objetivo el estudiar el papel de los inhibidores de CDKs en los mecanismos de recuperación tisular tras procesos de isquemia reperusión (I/R) ligados a daño renal como los producidos en la enfermedad renal crónica (ERC).

3.1.2. Enfermedad renal crónica

La ERC es una pérdida progresiva e irreversible de las funciones renales, que se caracteriza por una disminución en el filtrado glomerular por debajo del 50%. Como consecuencia, los riñones no eliminan los desechos metabólicos ni desempeñan sus funciones reguladoras, dañando así el equilibrio funcional del individuo (Bagshaw, 2006). Existen dos tipos de tratamiento que se aplican actualmente para el paciente con ERC, la diálisis (hemodiálisis ó diálisis peritoneal) y el trasplante renal. En aquellos casos en los que es posible realizar el trasplante, el tiempo de vida media del paciente se incrementa y ante todo mejora su calidad de vida (Bagshaw, 2006). Según datos del Registro Nacional de Enfermos Renales la prevalencia de la enfermedad renal terminal en tratamiento dialítico (ya sea hemodiálisis o diálisis peritoneal) es de 415 procedimientos por millón de población (pmp), de los cuales el 22% son candidatos a trasplante renal. Se realizan más de 2000 trasplantes anuales, pese a ello, 4000 pacientes permanecen en lista de espera. Un 25%

de los riñones son desechados para trasplante. Aunque las causas son diversas, la preservación del órgano desde el momento de la extracción hasta el momento de la implantación en el individuo receptor determina, tanto la viabilidad del trasplante como su correcta implantación a corto y largo plazo. Técnicamente, la operación de trasplante de riñón es sencilla. Consta de tres anastomosis o uniones: arterial, venosa y urinaria. Sin embargo, está bien documentado que períodos cortos de isquemia (15, 60 minutos) son suficientes para observar eventos patofisiológicos en los túbulos renales que pueden comprometer la viabilidad del trasplante. Los riñones son particularmente susceptibles a la lesión isquémica renal. Una de las razones es que la microvasculatura del riñón es muy compleja y debe cumplir con una alta demanda de energía. En condiciones normales hay una sobredemanda de oxígeno en los tejidos renales. En condiciones patológicas, sin embargo, el suministro de oxígeno se altera fácilmente (Leong *et al.*, 2007). Al extraer un riñón para trasplante se le somete a la deprivación de oxígeno que puede resultar en hipoxia celular y/o disoxia. La hipoxia celular se produce por una disminución en la disponibilidad de oxígeno. La disoxia celular, en contraste, se refiere a un estado patológico en el que se limita la capacidad de las mitocondrias para realizar la fosforilación oxidativa, independientemente de la cantidad de oxígeno disponible (Connett *et al.*, 1990; Legrand *et al.*, 2008). Estos cambios metabólicos desencadenan una disminución del ATP celular, bajada del pH intracelular y pérdida del balance iónico (Kosieradzki y Rowinski, 2008; Legrand *et al.*, 2008). El proceso de reperfusión también es crítico para el órgano debido mayoritariamente a dos eventos. En primer lugar, se produce un daño oxidativo causado por el incremento de especies reactivas del oxígeno (ERO) durante la reintroducción de oxígeno en el tejido previamente isquémico. El segundo es la activación de una respuesta inflamatoria, que provoca la infiltración de polimorfonucleares (PMN) que amplifican el daño celular. Este aporte de oxígeno necesario restablece la actividad metabólica normal. Esto coincide con la aparición de un pico de

muerte celular por necrosis o apoptosis, puesto que las células dañadas disponen en este momento de la energía necesaria para llevar a cabo la síntesis de proteínas necesarias para estos procesos (Kosieradzki y Rowinski, 2008).

Existen evidencias de que el daño producido por PMN, puede ser mejorado con agentes inmunosupresores tales como la ciclosporina (Singh *et al.*, 2005) o fingolimod (Delbridge *et al.*, 2007). Por otra parte, compuestos inhibidores de CDK, tales como el flavopiridol o roscovitina (Aydemir *et al.*, 2002), han sido utilizados como inmunosupresores y han mostrado protección frente a los daños producidos por los procesos de I/R (Osuga *et al.*, 2000).

3.1.2.1. Modelos de isquemia celular

Imitar el microambiente isquémico, es posible, induciendo hipoxia-hipercapnia, por privación de nutrientes tales como glucosa o suero, o por la acumulación de desechos metabólicos (Biju *et al.*, 2005; Russ *et al.*, 2007). Durante la hipoxia tisular, se produce siempre hipercapnia (exceso de CO₂) (Johnson y Weil, 1991), como resultado del metabolismo anaeróbico. La hipercapnia influye en los procesos apoptóticos, en el metabolismo mitocondrial y en el pH intracelular. Las mediciones de concentración de CO₂ en riñones sometidos a hipoxia, muestran que en el microambiente renal las concentraciones de CO₂ son cercanas al 18%. Así, en busca de modelos de I/R renal, Hotter y colaboradores (Hotter *et al.*, 2004), desarrollaron un modelo de isquemia en células tubulares renales porcinas (LLC-PK1) sometiendo las células a hipoxia (1% O₂) e hipercapnia (18% CO₂), y posterior reoxigenación (Hx-Hp/Nx). Este tratamiento induce condensación de la cromatina, fragmentación del DNA y un aumento de la actividad caspasa-3, que dirige la entrada de las células en muerte por apoptosis. Debido a que el riñón porcino

es similar al riñón humano estructural y funcionalmente (Russ *et al.*, 2007), la línea celular LLC-PK1 es ampliamente utilizada como modelo renal.

El objetivo de este apartado del trabajo consistió en evaluar el posible uso de los inhibidores de CDKs y en concreto de TAT-NBI1, para el tratamiento y prevención de los daños producidos en riñón como consecuencia de un proceso de isquemia renal.

RESULTADOS Y DISCUSION

Inhibidores de ciclo celular en
procesos de regeneración
celular

CAPITULO 3

3.2. RESULTADOS

3.2.1. Determinación de condiciones subletales de TAT-NBI1 y roscovitina en la línea celular LLC-PK1.

Para estudiar el posible papel de inhibidores de CDKs en células renales sometidas a procesos de isquemia/reperfusión, se seleccionó la línea celular epitelial del túbulo proximal renal derivada de riñones de cerdo, LLC-PK1. Para mimetizar el proceso de I/R se eligió un modelo en el que las células se someten a hipoxia (1% O₂) e hipercapnia (18% CO₂) durante 24 horas, y posteriormente a un tratamiento de 24 horas en condiciones de normoxia (5% CO₂) (Hx-Hp/Nx).

El primer objetivo fue determinar la sensibilidad de la línea LLC-PK1, a roscovitina y TAT-NBI1. Se analizaron los valores IC₅₀, así como la concentración subletal, para los dos fármacos en condiciones de normoxia y en Hx-Hp/Nx, con el fin de seleccionar condiciones donde ninguno de los compuestos resultara tóxico para las células (Fig. 3.3). Se seleccionó la concentración de 5 µM para los tratamientos con roscovitina y TAT-NBI1. En estas condiciones ambos fármacos mantienen la viabilidad celular por encima del 80%.

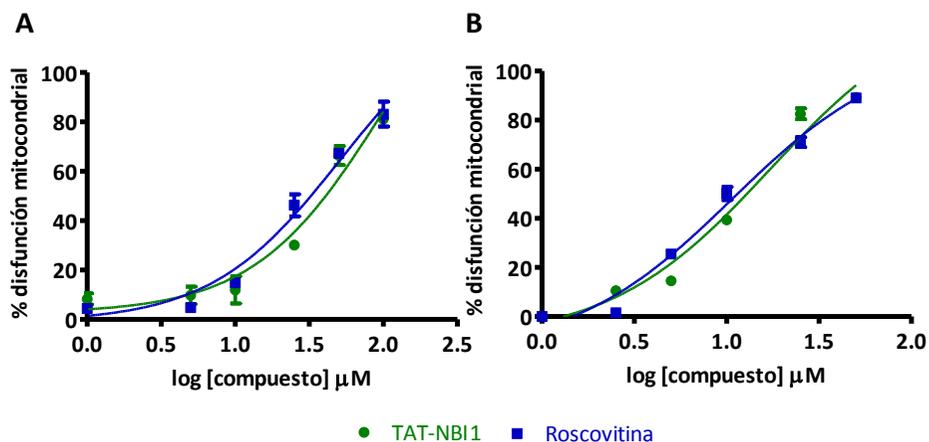


Figura 3.3. TAT-NBI1 y roscovitina tienen efecto citotóxico dependiente de dosis en la línea celular LLC-PK1. Células LLC-PK1 fueron mantenidas en A. normoxia durante 24 horas o B. sometidas a Hx-Hp 24 horas. Ambas fueron tratadas con TAT-NBI1 (en verde) o roscovitina (azul) a las concentraciones indicadas y finalmente, sometidas a 24 horas de normoxia. Los resultados representan el valor promedio del porcentaje de disfunción mitocondrial determinado por MTT de 3 experimentos independientes.

3.2.2. Efectos antiapoptóticos de TAT-NBI1 en el modelo de isquemia/ reperusión.

Utilizando el modelo de Hx-Hp/Nx, las células LLC-PK1 fueron sometidas a 24 horas de hipoxia/hipercapnia, posterior tratamiento con el vehículo control o con los inhibidores de CDK (TAT-NBI1 o roscovitina) y mantenidas 24 horas más en normoxia. En el cultivo celular sometido al proceso, en presencia de vehículo control, se produjo un pico de muerte celular por apoptosis evidenciada por la activación en caspasa-3/-7 (Russ *et al.*, 2007). Sin embargo, el tratamiento de las células con los inhibidores de CDKs (roscovitina o TAT-NBI1), en condiciones subletales, provocó la inhibición de la actividad caspasa-3/7 (Fig. 3.4).

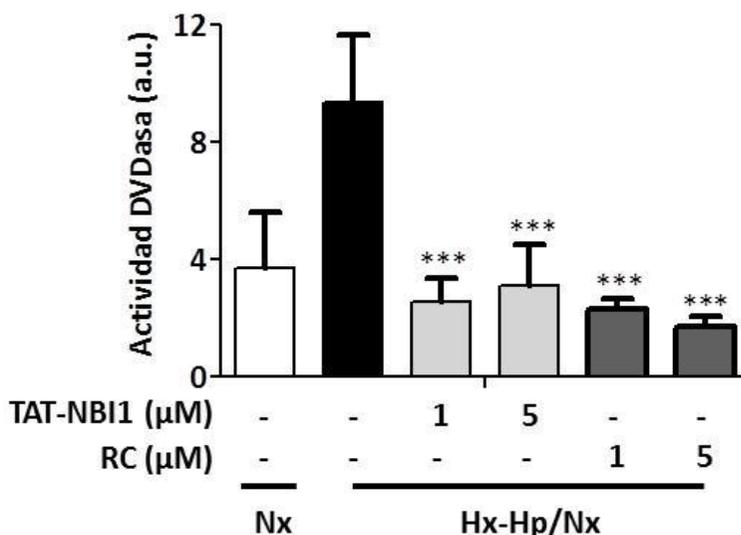


Figura 3.4. El tratamiento con TAT-NBI1 protege de la activación de apoptosis inducida por Hx-Hp/Nx. Células LLC-PK1 fueron sometidas a condiciones de Hx-Hp. Después de 24 horas, las células fueron tratadas o no con TAT-NBI1 (1 y 5 μM) o con roscovitina (1 y 5 μM) y mantenidas durante 24 horas en normoxia. La actividad caspasa 3-7 fue analizada en los extractos citosólicos (50 μg) mediante adición del sustrato Ac-DEVD-AFC. Los resultados representan el valor promedio de actividad DV Dasa en 3 experimentos independientes. (Anova de 1 vía, Dunnett; ***p valor <0,0001).

3.2.3. Incremento en la viabilidad celular mediada por TAT-NBI1 en el modelo de isquemia/reperfusión renal

Tras comprobar que el tratamiento con TAT-NBI1 o roscovitina disminuyó la actividad caspasa, sugiriendo una actividad antiapoptótica, se analizaron las consecuencias en términos de viabilidad celular mediante el ensayo de tinción celular con el colorante vital azul de tripán. Los resultados demostraron que el tratamiento con TAT-NBI1 indujo un aumento significativo en la viabilidad celular (Fig. 3.5). El tratamiento Hx-Hp/Nx indujo un 60% de muerte en las células control, mientras que en presencia de TAT-NBI1 la viabilidad celular se mantuvo en torno al 80%. Los resultados obtenidos fueron similares cuando las células se trataron con roscovitina.

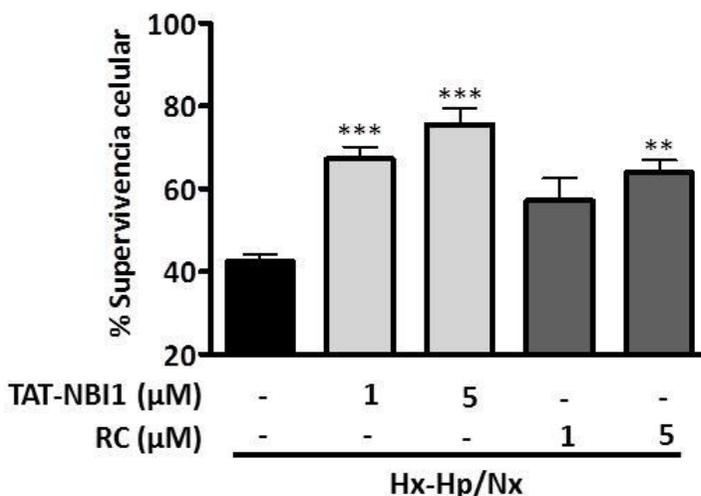


Figura 3.5. El tratamiento con TAT-NBI1 protege de la muerte celular inducida por Hx-Hp/Nx. Células LLC-PK1 tratadas como se indica en la figura 3.4 se tiñeron con el colorante vital azul de tripán para evaluar cambios en viabilidad celular. Los resultados representan el valor promedio del porcentaje supervivencia celular respecto al control en normoxia en 3 experimentos independientes (Anova de 1 vía, Dunnett; ***p < 0,0001; **p < 0,01).

3.2.4. Estudio del mecanismo molecular de recuperación inducido por el tratamiento con TAT-NBI1 en el modelo de isquemia/reperfusión renal

El siguiente objetivo fue, determinar el mecanismo molecular por el cual los inhibidores de CDKs ejercen un efecto protector después de un proceso de Hx-Hp/Nx. Como se ha presentado en la introducción, se ha propuesto un papel relevante para CDK5 en la regulación y activación de rutas de supervivencia y de apoptosis celular, especialmente en sistema nervioso central. Se postuló entonces la hipótesis de que CDK5 estuviese también implicada en el mecanismo molecular subyacente a la recuperación de células renales tras un proceso de I/R. TAT-NBI1 mostró, *in vitro*, actividad inhibitoria de CDK5 con una IC50 de 7 μM (capítulo 1, Tabla 1.4), por lo que su efecto podría estar relacionado con la inhibición de esta quinasa.

Para analizar la participación de CDK5 en este proceso, se determinaron, en primer lugar, los niveles de expresión de CDK5 y sus proteínas reguladoras p35/p25 y ciclina I, en el modelo de Hx-Hp/Nx en LLC-PK1. Los niveles proteicos de CDK5 se mantuvieron constantes independientemente del tipo de tratamiento o de la presencia de los inhibidores (Fig. 3.6). En normoxia, el tratamiento con TAT-NBI1 no indujo modificación de los niveles proteicos de p35/p25. Al someter las células a condiciones de Hx-Hp/Nx se observó un aumento de los niveles proteicos, más acusado en el caso de p25. Cuando las células se sometieron a condiciones de Hx-Hp/Nx pero en presencia de TAT-NBI1, se revirtieron los niveles proteicos de p35/25 a los niveles control (Fig. 3.6). El nivel proteico de ciclina I disminuyó significativamente en células sometidas a Hx-Hp/Nx, sin embargo, en presencia de TAT-NBI1 no se observó tal disminución. Cabe destacar que en condiciones de normoxia la presencia de TAT-NBI1 no produjo cambios en los niveles proteicos de ciclina I (Fig. 3.6).

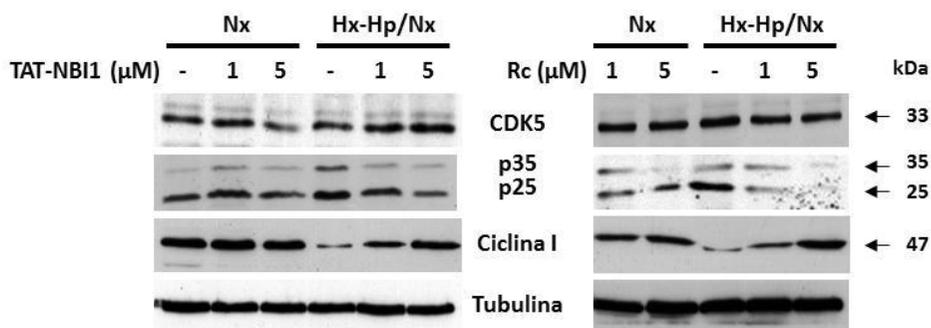


Figura 3.6. El tratamiento con TAT-NBI1 reestablece los niveles de p35/p25 y ciclina I en el modelo Hx-Hp/Nx. Las células LLC-PK1 fueron tratadas como se indica en la figura 3.4. Tras los tratamientos, la expresión de CDK5, p35/25 y ciclina I fue analizada mediante western blot utilizando los anticuerpos detallados en el apartado 5.3.1.6 de materiales y métodos. Los blots fueron incubados contra tubulina como control de carga.

En podocitos renales se ha descrito que la activación de CDK5 por ciclina I, regula la expresión de BCL-2 y BCL-xL mediante la activación de la vía MEK/ERK lo que favorece la supervivencia (Brinkkoetter *et al.*, 2009;

Brinkkoetter *et al.*, 2010; Taniguchi *et al.*, 2012). Se evaluó si esta base mecanicista era extrapolable al modelo de Hx-Hp/Nx establecido en las células de túbulo renal LLC-PK1. En condiciones Hx-Hp/Nx se observó una disminución en la fosforilación de ERK1 (44kDa, Fig. 3.7), respecto del control, que implicaría la pérdida de señales de supervivencia celular. Sin embargo, los niveles de fosforilación de ERK1 no se vieron afectados en las células sometidas a Hx-Hp/Nx en presencia de TAT-NBI1 y la disminución fue moderada en presencia de roscovitina (44kDa, Fig. 3.7).

Se ha demostrado que las células LLC-PK1 sometidas a Hx-Hp/Nx muestran rasgos fenotípicos de apoptosis que en determinadas situaciones pueden derivarse de la acumulación de daños que afectan a la integridad del DNA. Se evaluó esta posibilidad mediante el análisis del estado de fosforilación de la histona H2Ax. Los resultados mostraron que la Hx-Hp/Nx indujo un aumento en la fosforilación de H2Ax, en ausencia, pero no en presencia de TAT-NBI1. En estas últimas condiciones se obtuvieron niveles de fosforilación de H2Ax comparables a los de las células control mantenidas en normoxia (Fig. 3.7). También se analizó el estado de la maquinaria de reparación de DNA mediante la evaluación del estado de fosforilación de CHK1. Cuando las células fueron sometidas a Hx-Hp/Nx, se observó una marcada disminución en la fosforilación de CHK1, por el contrario, cuando el tratamiento se llevó a cabo en presencia de TAT-NBI1, los niveles de fosforilación fueron semejantes a los obtenidos para las células control en normoxia (Fig. 3.7). Las consecuencias del tratamiento fueron similares en presencia de roscovitina.

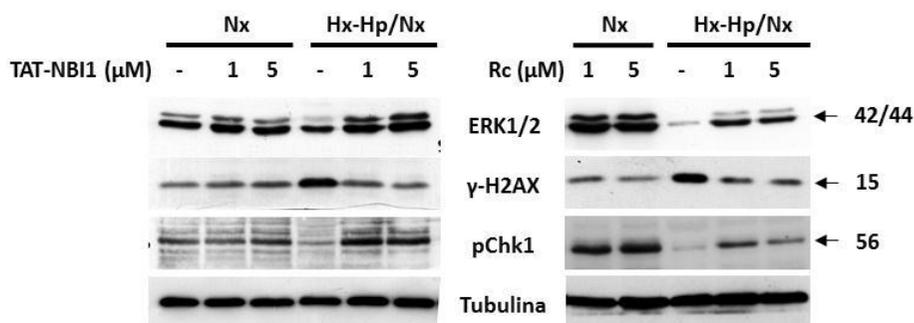


Figura 3.7. El tratamiento con TAT-NBI1 favorece la activación de la vía de supervivencia ERK1/2 y los procesos de reparación del DNA, en el modelo de Hx-Hp/Nx. Las células LLC-PK1 fueron tratadas como se indica en la figura 3.4. Tras los tratamientos, la fosforilación de ERK1/2, H2AX y CHK1 fueron analizados mediante western blot utilizando los anticuerpos detallados en el apartado 5.3.1.6 de materiales y métodos. Los blots fueron incubados contra tubulina como control de carga.

Los resultados precedentes apuntan a que las células LLC-PK1, cuando se someten a Hx-Hp/Nx, acumulan daño en el DNA y presentan problemas en los mecanismos de reparación. Se ha descrito que el daño oxidativo en el DNA (oxidación de las bases y roturas de la cadena) es una consecuencia severa del estrés oxidativo asociado a I/R que induce apoptosis (Cooke *et al.*, 2003; Kryston *et al.*, 2011). En la regulación de la compleja comunicación entre las distintas rutas de señalización implicadas en el proceso en su conjunto, CDK5 parece tener un papel relevante.

Para profundizar en esta hipótesis, se llevó a cabo el silenciamiento génico de CDK5 y se observó que, tanto TAT-NBI1 como roscovitina, dejaron de ejercer efecto alguno en los procesos evaluados sugiriendo, en primer lugar, que CDK5 es la diana celular de TAT-NBI1. En ausencia de CDK5, TAT-NBI1 no inhibió la actividad caspasa-3/-7 inducida por Hx-Hp/Nx (Fig. 3.8A); no se observaron modificaciones significativas en los niveles proteicos de p35/p25 y ciclina I ni en el estado de fosforilación de ERK (Fig. 3.8B). Sin embargo, hay un hecho llamativo que se puede deducir de estos resultados y pone en evidencia la

complejidad de los procesos celulares responsables de decisiones tan importantes para la célula como adoptar rutas de supervivencia o muerte. El silenciamiento génico de CDK5 no previno la muerte celular inducida por Hx-Hp/Nx. En cambio, por lo expuesto hasta ahora, en presencia de CDK5, su inhibición por TAT-NBI1 previene muerte celular inducida por Hx-Hp/Nx. Esto sugiere que CDK5 no participa directamente en la inducción de muerte celular pero es determinante para permitir la activación de los procesos de recuperación celular. Cuando CDK5 permanece activa, la célula sometida a estrés oxidativo no es capaz de acceder a mecanismos de recuperación.

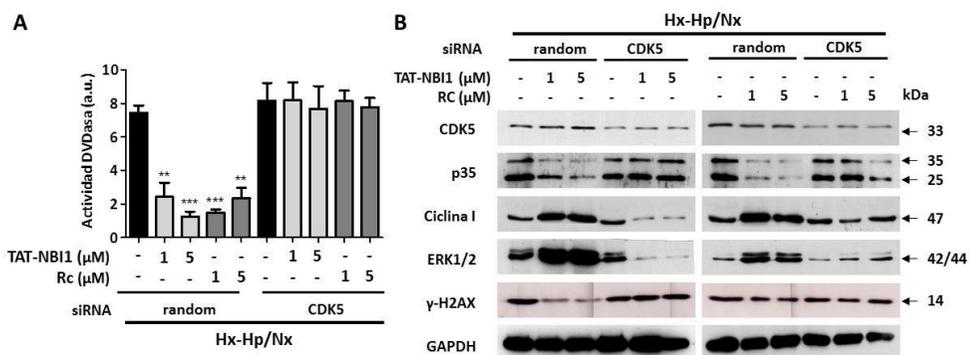


Figura 3.8. CDK5 no participa en la inducción de apoptosis pero sí en la recuperación celular mediada por TAT-NBI1. Las células LLC-PK1 fueron transfectadas con siRNA de CDK5 o siRNA control (random). 24 horas, después del silenciamiento fueron, sometidas a Hx-Hp durante 24 horas, tratadas con TAT-NBI1 o roscovitina y mantenidas durante 24 horas en normoxia. A. Actividad caspasa-3/7 (DVDasa) de los extractos citosólicos de LLC-PK1. Los resultados representan el valor promedio de la actividad DVDasa en 3 experimentos independientes (Anova de 1 vía, Dunnett; ***p < 0,0001; **p < 0,01). B. Tras los tratamientos descritos en A los niveles de expresión en los extractos proteicos totales (100 μg) de CDK5, p35, ciclina I, ERK1/2 y γ-H2Ax fueron analizados mediante western blot. Los blots fueron incubados contra GAPDH como control de carga. Los análisis densitométricos evaluaron que el silenciamiento de CDK5 fue del 52%.

No obstante, para confirmar la participación de CDK5, las células LLC-PK1 se transfectaron con un dominante negativo de CDK5 (DNcdk5). El DNcdk5 compete con la proteína CDK5 endógena por la unión con sus activadores y sustratos. Sin embargo, el DNcdk5 tiene una mutación puntual en el sitio

catalítico y por tanto es catalíticamente inactiva. Los resultados obtenidos tras transfectar con el DNcdk5 muestran similitud con los obtenidos tras el silenciamiento de CDK5. El proceso Hx-Hp/Nx induce activación de caspasas que no es inhibida por TAT-NBI1, aunque sí se observó una cierta inhibición por roscovitina (cabe recordar que roscovitina es un inhibidor competitivo de ATP y podría estar afectando la actividad de alguna proteína quinasa accesoria del proceso) (Fig. 3.9A). Por otra parte, en las células en las que se sobreexpresó CDK5 mediante la transfección con un vector recombinante que expresa el tipo silvestre de CDK5 (WtCDK5), el tratamiento de Hx-Hp/Nx permitió la activación de caspasas. Es destacable que, considerando las cantidades relativas de CDK5 presentes en las células silvestres y en las que se sobreexpresó, la magnitud de la activación de caspasas inducida por Hx-Hp/Nx es similar. Sin embargo, la inhibición de la actividad caspasa sí fue dependiente de la cantidad relativa de CDK5 en la célula. Así, mientras en las células silvestres concentraciones de TAT-NBI1 de 1 μ M y 5 μ M inducen una inhibición en torno al 80%, en células con CDK5 sobreexpresada las mismas concentraciones de inhibidor indujeron inhibiciones únicamente en torno al 15% y 50%, respectivamente (Fig. 3.9C). Estos resultados podrían relacionarse con el papel dual que puede ejercer CDK5 en el control de la supervivencia y la muerte celular. En este punto, la subunidad reguladora de CDK5 se consideró que debería de influir y por tanto, se decidió estudiar la implicación de dichas subunidades en el mecanismo de recuperación mediado por TAT-NBI1.

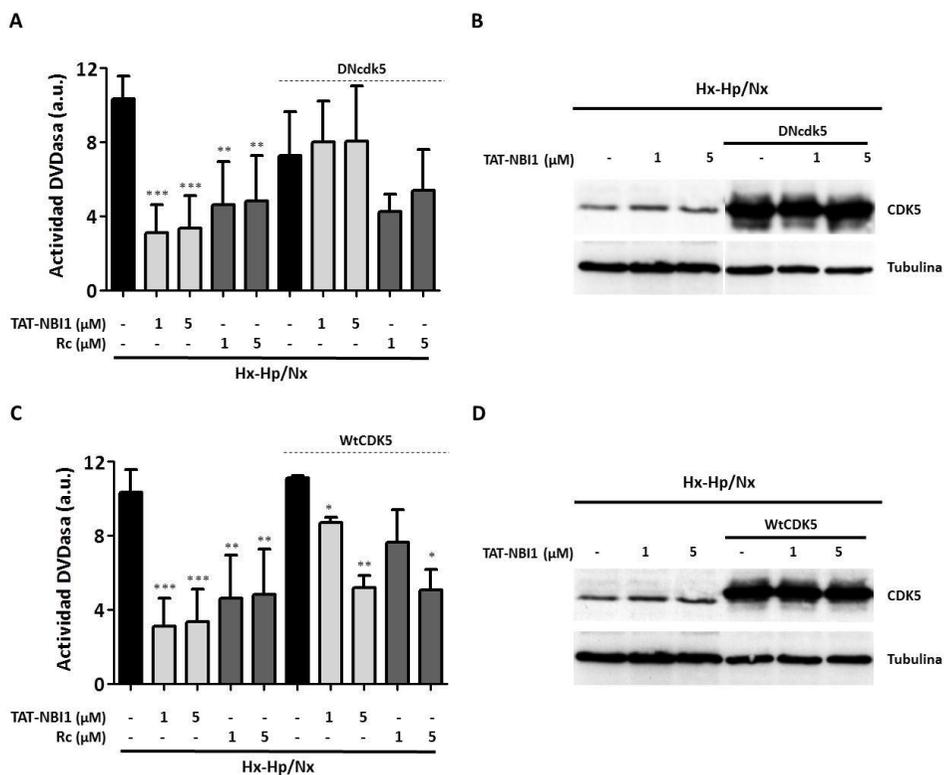


Figura 3.9. CDK5 activa es necesaria para el efecto antiapoptótico de TAT-NBI1. Las células LLC-PK1 fueron transfectadas con DNcdk5 y WtCDK5. 24 horas, después de la transfección fueron, sometidas a Hx-Hp durante 24 horas, tratadas con TAT-NBI1 o roscovitina y mantenidas durante 24 horas en normoxia. A/C. Actividad caspasa-3/7 (DvDasa) de los extractos citosólicos. Los resultados representan el valor promedio de la actividad DVDasa en 3 experimentos independientes (Anova de 1 vía, Dunnett; ***p < 0,0001; **p < 0,01; *p < 0,05). C/D. Los niveles de expresión de DNcdk5 y WtCDK5 respectivamente fueron determinados por western blot.

En células, tanto en normoxia como en Hx-Hp/Nx, se observó que p25 era más abundante que p35 (Fig. 3.6) aunque en condiciones de Hx-Hp/Nx ambas proteínas aumentaron en cantidad relativa, efecto inhibido en presencia de TAT-NBI1. Cabe tener en cuenta que p25 es resultado de la escisión mediada por calpaína de p35, por tanto es de suponer que tanto la estabilidad intrínseca de p35 frente a procesos de degradación proteica, como la activación de calpaína, deben influir en los niveles relativos de p35 y p25. En primer lugar, se estudió el efecto de la inhibición del procesamiento de p35 a p25, mediante la

utilización del inhibidor de calpaína (ALLN, N-[N-(N-Acetyl-L-leucyl)-L-leucyl]-L-norleucine). Como cabía esperar, el procesamiento de p35 a p25 disminuyó tras el tratamiento con ALLN, al tiempo que se observó una menor activación de caspasa-3/7 inducida por Hx-Hp/Nx. (Fig. 3.10A). Se observó en paralelo un aumento en los niveles de expresión de ciclina I (Fig. 3.10B).

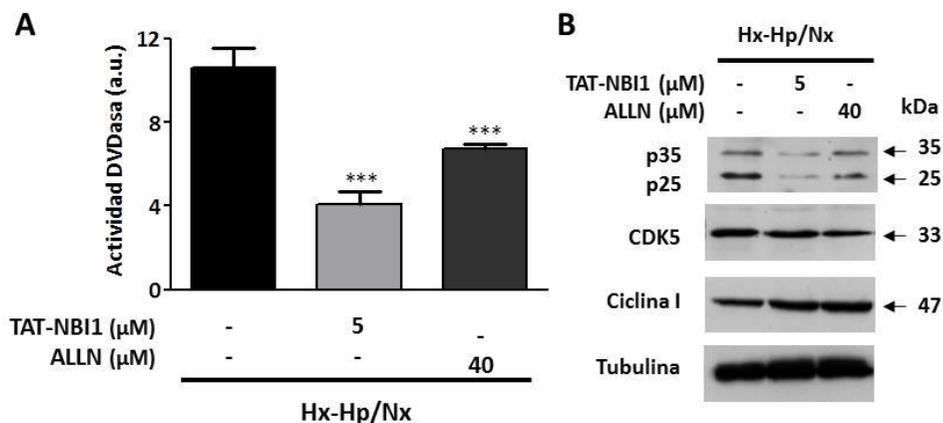


Figura 3.10. El tratamiento con inhibidor de calpaína tiene efecto antiapoptótico. Las células LLC-PK1 fueron sometidas a Hx-Hp, tratadas con TAT-NBI1 o con un inhibidor de calpaína e incubadas durante 24 horas en normoxia. A. Actividad caspasa-3/7 (DVDasa) de los extractos citosólicos. Los resultados representan el valor promedio de la actividad DVDasa en 3 experimentos independientes (Anova de 1 vía, Dunnett; *** $p < 0,0001$). B. Niveles de expresión de p35/p25, CDK5 y ciclina I determinados por western blot.

Por tanto, en células LLC-PK1 sometidas a Hx-Hp/Nx, el tratamiento con inhibidores de la actividad CDK5 y con un inhibidor de calpaína (responsable del procesamiento de las subunidades reguladoras de CDK5) tiene efectos similares. Ambos inducen una disminución de p25 y un incremento en ciclina I, que se traducen en la inhibición de apoptosis.

Como cabía esperar, el silenciamiento génico de p35 en las células LLC-PK1 conllevó una disminución de la actividad caspasa-3/7 inducida por Hx-Hp/Nx (Fig. 3.11). No obstante, la actividad caspasa-3/7 residual siguió siendo inhibible por TAT-NBI1 (Fig. 3.11).

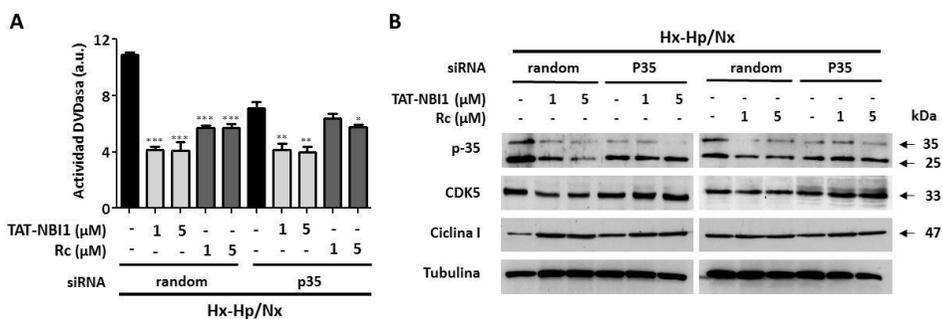


Figura 3.11. El silenciamiento de p35 tiene efectos similares a los producidos por TAT-NBI1. Las células LLC-PK1 fueron transfectadas con siRNA de p35 o siRNA control (random). 24 horas, después del silenciamiento fueron, sometidas a Hx-Hp durante 24 horas, tratadas con TAT-NBI1 o roscovitina y mantenidas 24 horas de normoxia. A. Actividad caspasa-3/7 (DVDasa) de los extractos citosólicos. Los resultados representan el valor promedio de la actividad DVDasa en 3 experimentos independientes (Anova de 1 vía, Dunnett; ***p < 0,0001; **p < 0,01; *p < 0,05). B. Niveles de expresión de p35, CDK5 y ciclina I, tras el silenciamiento de p35 (el silenciamiento determinado por análisis densitométrico fue del 48%) determinados por western blot.

A continuación se llevó a cabo el silenciamiento génico de ciclina I. Se observó que, en estas condiciones, el efecto antiapoptótico de TAT-NBI1 en el modelo de I/R, se ve drásticamente disminuido. En ausencia de ciclina I, el tratamiento con TAT-NBI1 no inhibió ninguno de los parámetros analizados asociados a la muerte celular inducida por Hx-Hp/Nx (Fig. 3.12).

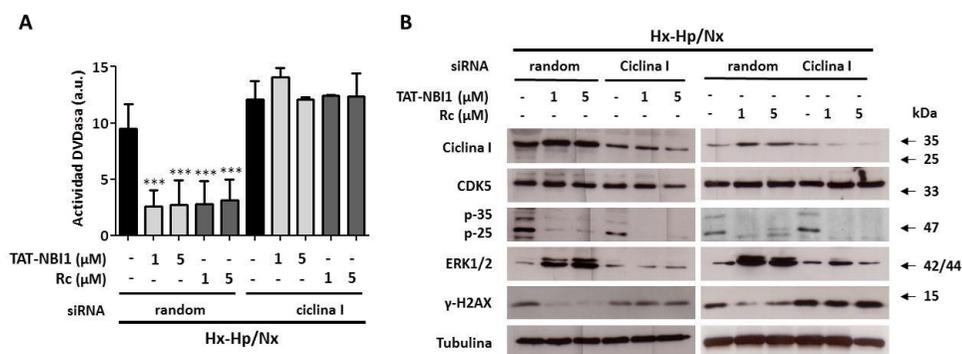


Figura 3.12. El silenciamiento de ciclina I induce apoptosis y bloquea el efecto antiapoptótico TAT-NBI1. Las células LLC-PK1 fueron transfectadas con siRNA de ciclina I o siRNA control (random). 24 horas, después del silenciamiento fueron, sometidas a Hx-Hp durante 24 h, tratadas con TAT-NBI1 o roscovitina y mantenidas 24 horas de normoxia. A. Actividad caspasa-3/7 (DvDasa) de los extractos citosólicos. Los resultados representan el valor promedio de la actividad DVdasa en 3 experimentos independientes (Anova de 1 vía, Dunnett; *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$). B. Niveles de expresión de ciclina I, CDK5, p35, ERK1/2 y γ -H2A.x, tras el silenciamiento de ciclina I (el silenciamiento determinado por análisis densitométrico fue del 55%) fueron determinados por western blot.

3.3. DISCUSION

En el presente estudio se muestra que el tratamiento con un inhibidor de complejos CDK/ciclina protege a las células de túbulo proximal renal frente al daño inducido en un modelo de I/R (Hx-Hp/Nx). En concreto, el tratamiento con TAT-NBI1 después de someter las células a Hx-Hp/Nx tiene un efecto antiapoptótico, que además, se traduce en un incremento de la viabilidad celular. Los resultados sugieren que el mecanismo de acción del compuesto requiere de la formación del complejo CDK5/ciclina I (Fig. 3.12).

CDK5, mediante su asociación con p25, tiene un papel activo en el proceso de inducción de muerte en neuronas sometidas a diferentes estímulos de stress entre los que se incluyen los relacionados con I/R (Paoletti *et al.*, 2008; Rashidian *et al.*, 2005). De este modo, su inhibición mediante el uso de inhibidores de CDK clásicos como roscovitina, produce la recuperación celular (Aydemir *et al.*, 2002; Timsit y Menn, 2007; Topaloglu *et al.*, 2003). En podocitos, células renales postmitóticas encargadas del proceso de filtración glomerular, se ha demostrado la implicación de CDK5, ciclina I y p35 en procesos de supervivencia celular (Brinkkoetter *et al.*, 2010; Griffin *et al.*, 2006). Los ratones doble KO para ciclina I y p35 presentan un fenotipo renal normal, sin embargo la inducción de enfermedad glomerular, provoca la aparición de una apoptosis exacerbada en los mutantes dobles para ciclina I y p35. Estos resultados destacan la implicación de estas proteínas en procesos de supervivencia celular ligados a situaciones de stress (Taniguchi *et al.*, 2012). Por tanto, el equilibrio entre los diferentes reguladores de CDK5, su localización celular así como el tipo celular, parecen ser factores clave que determinan la

función de CDK5 en supervivencia o muerte. La variación de dicho equilibrio celular puede desencadenar que se favorezcan unas vías respecto a otras.

A pesar de que los estudios de expresión de CDK5 y p35 demuestran que estas proteínas están presentes en prácticamente todos los tejidos (<http://www.genecards.org/>; CDK5 código: GC07M150750; p35 código: GC17P030813), su papel en otros tipos celulares no ha sido estudiado. En este trabajo, se ha demostrado que en células de túbulo renal sometidas a I/R, es necesaria la presencia de CDK5 activa para que los inhibidores de complejos CDK/ciclina, TAT-NBI1 y roscovitina ejerzan su función protectora (Fig. 3.8 y Fig. 3.9C). Dado que CDK5 es capaz de señalizar tanto rutas de supervivencia celular como de muerte, podríamos considerarlo como un sensor del estado celular. Proponemos, por tanto, que en células del túbulo renal el sensor se encuentra en estado de equilibrio, puesto que su silenciamiento no tiene ningún efecto en normoxia, ni provoca variaciones en la muerte celular inducida por I/R (Fig. 3.6 y Fig. 3.8). Sin embargo, la aplicación de un inhibidor de CDK5/p35 como TAT-NBI1, provoca una clara disminución de p35/p25 posiblemente favoreciendo la asociación de CDK5 con ciclina I. Aunque no se ha podido disponer de p35 recombinante para llevar a cabo estudios de unión a TAT-NBI1, se podría asumir que el péptido se une a p35 (de forma análoga a como se une a ciclina A inhibiendo la actividad del complejo CDK2/ciclina A) inhibiendo la formación del complejo. Este hecho disminuiría, la ya de por sí corta, vida media de p35, que a su vez, impediría tanto su procesamiento a p25 como la estabilización del complejo CDK5/p25 implicado en señalización a muerte celular. Además, la ciclina I tiene mayor homología de secuencia con ciclina E que con otras ciclinas (Nakamura *et al.*, 1995). No se ha podido caracterizar la capacidad de unión de TAT-NBI1 a ciclina I pero estudios previos de modelado molecular y de actividad sugirieron que TAT-NBI1 no se unía a ciclina E, por tanto se podría hipotetizar que el péptido tiene también baja afinidad por unir ciclina I. Por tanto, la disminución de complejos

CDK5/p25 y la formación de complejos CDK5/ciclina I favorecería así la activación de vías de supervivencia celular como la inducida por ERK1/2 (Fig. 3.7). Estos datos concuerdan con el hecho de que el silenciamiento de ciclina I no provoca cambios en la inducción de apoptosis, pero sí elimina el efecto protector de TAT-NBI1 y roscovitina. Por tanto, si el silenciamiento de ciclina I, al igual que la eliminación de CDK5, no tienen ningún efecto sobre la inducción de muerte celular, pero sí influyen en la recuperación mediada por estos compuestos, es razonable suponer la implicación del complejo CDK5/ciclina I en dicha recuperación. A favor de esta interpretación están los resultados obtenidos en presencia de inhibidores de calpaína, que evitan el procesamiento de p35 a p25; p35 sería degradada impidiendo la acción deletérea para la célula de CDK5/p25. En presencia de los inhibidores de calpaína se obtienen parámetros fenotípicos similares a los obtenidos en presencia de TAT-NBI1 en el modelo I/R en las células LLC-PK1 (Fig. 3.10).

El mecanismo de acción de TAT-NBI1, consiste en la inhibición del complejo CDK/ciclina mediante la unión selectiva a un bolsillo hidrofóbico en la superficie de ciclina, que altera la conformación del complejo. Este bolsillo no se encuentra presente en todas las ciclinas. De hecho TAT-NBI1 inhibe el complejo CDK2/ciclina A mientras que no posee la capacidad de inhibir el complejo CDK2/ciclina E. Las bases moleculares de la interacción específica de TAT-NBI1 con el complejo CDK5/p35 frente al complejo CDK5/ciclina I podrían por tanto estar fundamentadas en las diferencias estructurales entre ciclina I y p35. De hecho, estructuralmente ciclina I está más estrechamente relacionada con ciclina G y E (Landberg *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 1995), lo que explicaría la incapacidad de TAT-NBI1 para inhibir este complejo. Sin embargo estos datos no explicarían el comportamiento paralelo que observamos en roscovitina, que *in vitro* ha mostrado la capacidad de inhibir también al complejo CDK5/ciclina I (Brinkkoetter *et al.*, 2009). La compleja regulación de la función de CDK5, en la que intervienen factores múltiples, como la presencia

o no de sus diferentes activadores, su estabilidad, su estado de procesamiento, de fosforilación, su diferente localización celular etc. hacen que estemos ante un proceso complicado, que está sólo empezando a descifrarse en los últimos años. El hecho de que roscovitina inhiba otros complejos o que haya una regulación cruzada entre los niveles de p21 y ciclina I (Griffin *et al.*, 2006), son factores que pueden determinar que el modo de acción de este compuesto sea similar al que proponemos para TAT-NBI1.

CAPITULO 4

Inhibidores de la enzima
gliceraldehido 3-fosfato
deshidrogenasa

4.1 INTRODUCCION

La enzima gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) está implicada en el proceso de glucólisis. GAPDH cataliza la fosforilación oxidativa del gliceraldehido-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato, utilizando dinucleótido de adenina y nicotina (NAD⁺) como aceptor de electrones (Sirover, 1999).

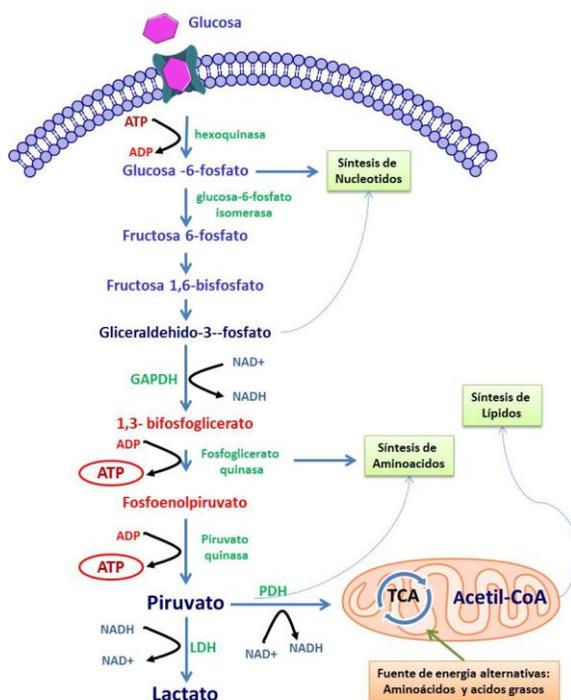


Figura 4.1. Esquema de la glucólisis. La glucosa es oxidada a lactato o piruvato. Bajo condiciones aeróbicas, el producto dominante en la mayoría de tejidos es el piruvato y la vía metabólica se conoce como glucólisis aeróbica. Cuando el oxígeno disminuye, el producto glucolítico dominante en muchos tejidos es el lactato y el proceso se conoce con el nombre de glucólisis anaerobia. Los substratos y productos de la reacción se muestran en azul y las enzimas en verde. Los dos intermediarios de alta energía cuya oxidación se acopla a la síntesis de ATP se indican en rojo (1,3-bifosfoglicerato y fosfoenolpiruvato) (adaptado de (Pelicano *et al.*, 2006)).

Además de su función metabólica, diferentes estudios han demostrado la participación de GAPDH en otras funciones celulares como la fusión de la membrana celular, la división celular y reparación de DNA, la endocitosis, la sinapsis neuronal y las adaptaciones al ambiente (Guo *et al.*, 2012). Además, GAPDH se encuentra involucrada en la regulación del ciclo celular mediante la modulación de la actividad del complejo CDK1/ciclina B, facilitando la entrada en mitosis y progresión del ciclo celular (Carujo *et al.*, 2006). Por otra parte, GAPDH está implicada en apoptosis. Se ha observado desregulación en la actividad glucolítica de GAPDH en células de pacientes con enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Huntington (Tatton *et al.*, 2000). De hecho, un estudio realizado en cultivos de neuronas de cerebelo, evidenció que un aumento en los niveles de GAPDH y su posterior translocación al núcleo precedieron a la muerte neuronal. De hecho, cuando las células se trataron con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra el RNA mensajero de GAPDH se observó un efecto protector poniendo de manifiesto que GAPDH puede constituir una diana farmacológica de interés (Ishitani *et al.*, 1998). Estas observaciones iniciales se ampliaron a células no neuronales y quedó establecido que la acumulación nuclear de GAPDH precede a la inducción de apoptosis y puede ser antagonizada mediante la sobreexpresión de BCL-2 (Sawa *et al.*, 1997). Por tanto, compuestos inhibidores de GAPDH podrían representar una buena estrategia para abordar tratamientos en enfermedades neurodegenerativas (Tristan *et al.*, 2011).

Consolidado el papel de GAPDH como agente proapoptótico resulta paradójico que se encuentre sobreexpresada en la mayoría de los cánceres humanos (Guo *et al.*, 2012; Sawa *et al.*, 1997). Los trabajos pioneros de Warburg en 1924 (revisado en (Vander Heiden *et al.*, 2009)) pusieron de manifiesto que las células cancerosas metabolizan la glucosa de forma diferente a las células normales. Warburg descubrió que a diferencia de la mayoría de las células normales, las células tumorales muestran una elevada tasa de captación de

glucosa y un metabolismo glucolítico muy elevado en presencia de niveles fisiológicos de oxígeno que da lugar a un aumento del metabolismo celular, relacionado con el aumento de la agresividad del tumor y un mal pronóstico del paciente en varios tipos de cáncer (revisado en (Sawa *et al.*, 1997)). Este aumento en el metabolismo puede atribuirse a múltiples factores tales como, la disfunción mitocondrial, el ambiente hipóxico y la acumulación de señales oncogénicas. En el contexto del cáncer, la hipoxia es de particular interés ya que se ha propuesto que el ambiente hipóxico en el que, en ocasiones, se desarrolla un tumor promueve la estabilización del factor inducible por hipoxia 1α (HIF1 α) (Semenza, 2000) que, a su vez, induce directamente la transcripción de enzimas glucolíticas como GAPDH (Semenza *et al.*, 1994). Las células tumorales generan ATP en la glucólisis, a pesar de tratarse de un proceso mucho menos eficiente, desde el punto de vista energético (dos ATP por glucosa), que la fosforilación oxidativa (36 ATP por glucosa). Por lo tanto, las células cancerosas consumen más glucosa que las células normales para mantener el suficiente suministro de ATP. Este aumento en la glucólisis por parte de las células tumorales, ha conducido a la hipótesis de que la inhibición en esta vía puede suprimir la generación ATP en las células cancerosas y por lo tanto puede ser una manera eficaz de atacar a las células tumorales sin afectar al tejido normal. Cuando se inhibe la glucólisis, las mitocondrias intactas en las células normales pueden usar fuentes alternativas de energía tales como los ácidos grasos y aminoácidos para la producción ATP a través de la respiración (Fig. 4.2).

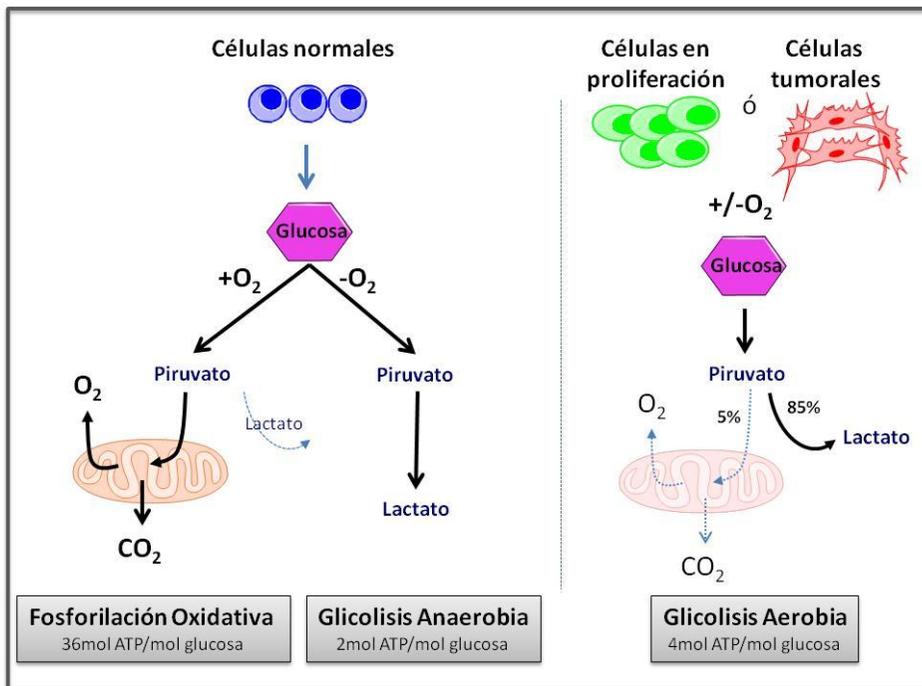


Figura 4.2. Representación esquemática de las diferencias entre la fosforilación oxidativa y la glucólisis. En presencia de oxígeno, las células normales metabolizan glucosa para convertirla en piruvato a través de la glucólisis y oxidan el piruvato en la mitocondria en el proceso de fosforilación oxidativa. Cuando el oxígeno es limitante, las células pueden redirigir el piruvato generado por la glucólisis mediante la generación de lactato (glucólisis anaeróbica). Las células tumorales tienden a convertir la mayoría de glucosa a lactato independientemente de si el oxígeno está presente (glucólisis aeróbica, efecto Warburg). Esta propiedad es compartida por los tejidos normales en proliferación (adaptado de (Vander Heiden *et al.*, 2009)).

Varios ensayos clínicos han demostrado resultados prometedores con inhibidores de la glucólisis (Pelicano *et al.*, 2006). Un ejemplo, es el dicloroacetato (DCA), una sustancia utilizada para el tratamiento de niños con acidosis láctica (Stacpoole *et al.*, 2006). Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima piruvato quinasa deshidrogenasa (PDK), la cual a su vez inhibe la piruvato deshidrogenasa (PDH), enzima que regula el flujo de piruvato al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) (Fig. 4.1). La inhibición de PDK con DCA, activa PDH, lo que desplaza el metabolismo de la glucosa a

partir piruvato en dirección a la producción de acetil coenzima A (acetil-CoA) (Michelakis *et al.*, 2008). DCA se ha mostrado por tanto como potencial tratamiento antitumoral, ya que reduce el crecimiento del tumor (Michelakis *et al.*, 2008). Sin embargo, ya han surgido algunos tipos de cáncer que han desarrollado resistencias al DCA (Papandreou *et al.*, 2011; Washington y Quintyne, 2012).

Así, el desarrollo de nuevos inhibidores de la glucólisis representa un área importante de investigación para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y en la terapia del cáncer. En el presente estudio, hemos llevado a cabo un cribado de quimiotecas para la identificación de inhibidores potenciales de GAPDH.

RESULTADOS Y DISCUSION

Inhibidores de la enzima
gliceraldehido 3-fosfato
deshidrogenasa

CAPITULO 4

4.2. RESULTADOS

4.2.1 Cribado de quimiotecas para la identificación de inhibidores de GAPDH.

El primer objetivo fue la puesta a punto de un ensayo de actividad GAPDH adaptado a placas de 96-pocillos para llevar a cabo los cribados de las quimiotecas. Como se ha descrito en la introducción, GAPDH, cataliza la fosforilación oxidativa del gliceraldehído-3-fosfato produciendo 1,3-difosfoglicerato, gracias a la reducción del dinucleótido de adenina y nicotinamina (NAD⁺) a NADH. Dicha reducción puede ser monitorizada mediante espectroscopia de fluorescencia, dado que el NADH presenta un máximo de absorción a 340 nm y un máximo de emisión a 465 nm (Fig. 4.3).

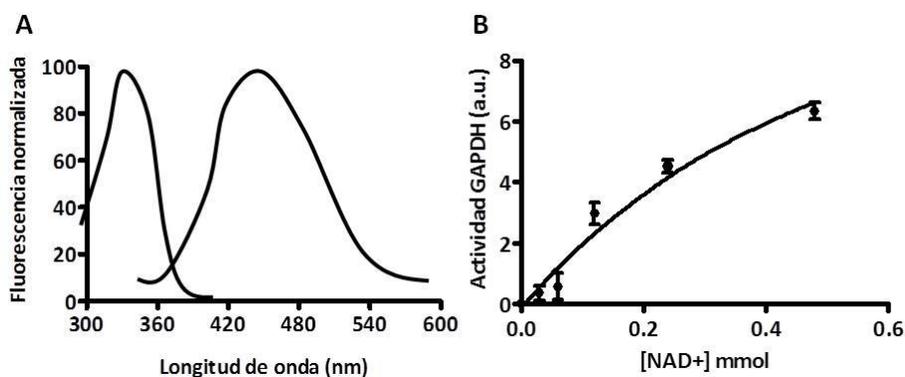


Figura 4.3. Estandarización de la actividad GAPDH in vitro. A. Espectro de excitación y emisión de fluorescencia de NADH, que presenta un máximo de absorción a 340 nm y de emisión a 465 nm. B. Análisis de la actividad GAPDH a diferentes concentraciones de NAD⁺. Se utilizaron 0.03 unidades de enzima GAPDH que se incubaron a 30°C en presencia de los substratos gliceraldehído-3-fosfato (5 mM) y NAD⁺ a las concentraciones indicadas. La actividad del enzima se monitorizó mediante espectroscopía de fluorescencia midiendo la emisión del NADH a 465nm.

Como fuente de diversidad química se utilizó la quimioteca Prestwick formada por 1120 compuestos (Prestwick chemical library®). Esta quimioteca está constituida por compuestos aprobados por la FDA caracterizados por su amplia diversidad química y su biodisponibilidad. Así, se analizó en el ensayo de GAPDH la capacidad de inhibición de los componentes de la quimioteca. El primer cribado se realizó utilizando los compuestos a una concentración de 50 μ M. Se generó una selección inicial de 34 posibles inhibidores de GAPDH de los 1120 ensayados (Fig. 4.4) aunque finalmente solo se seleccionaron seis atendiendo que presentaban inhibiciones superiores al 50% (Fig. 4.5). Se descartaron también aquellos compuestos que presentaban fluorescencia intrínseca para tratar de evitar la selección de falsos positivos o aquellos para los que en la bibliografía ya se había descrito una actividad como inhibidores generales de actividades deshidrogenasa

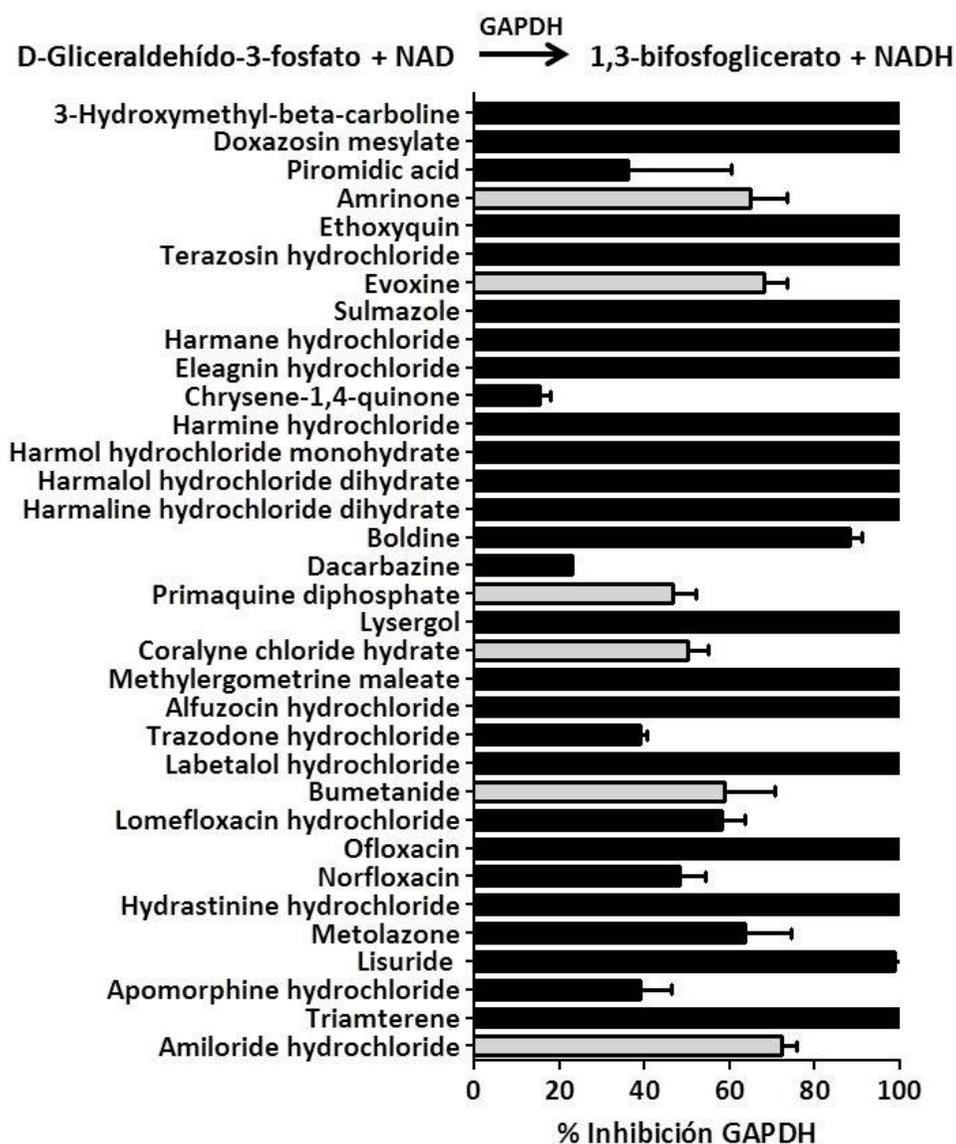


Figura 4.4. Cribado inicial de compuestos de la quimioteca Prestwick, con capacidad de inhibir la actividad GAPDH. Se analizaron 1120 compuestos en el ensayo de actividad GAPDH. Los compuestos (50 μ M) se incubaron durante 15 min con 0.03 unidades de GAPDH. Tras la incubación se añadieron los substratos 5 mM de gliceraldehído-3-fosfato y 5 mM de NAD⁺ y la actividad enzimática fue monitorizada espectrofotométricamente mediante medida de la emisión de fluorescencia a 465 nm del NADH. En gris se muestran los compuestos seleccionados como potenciales inhibidores de GAPDH según los criterios que se detallan en el texto.

A continuación se evaluaron los compuestos en experimentos de dosis respuesta (Fig. 4.5A) reduciéndose a cuatro los compuestos seleccionados: i) clorhidrato de amilorida, ii) difosfato de primaquina, iii) evoxine y iv) amrinona. Las características en términos de bioactividad de estos compuestos se describen en la Fig. 4.5B.

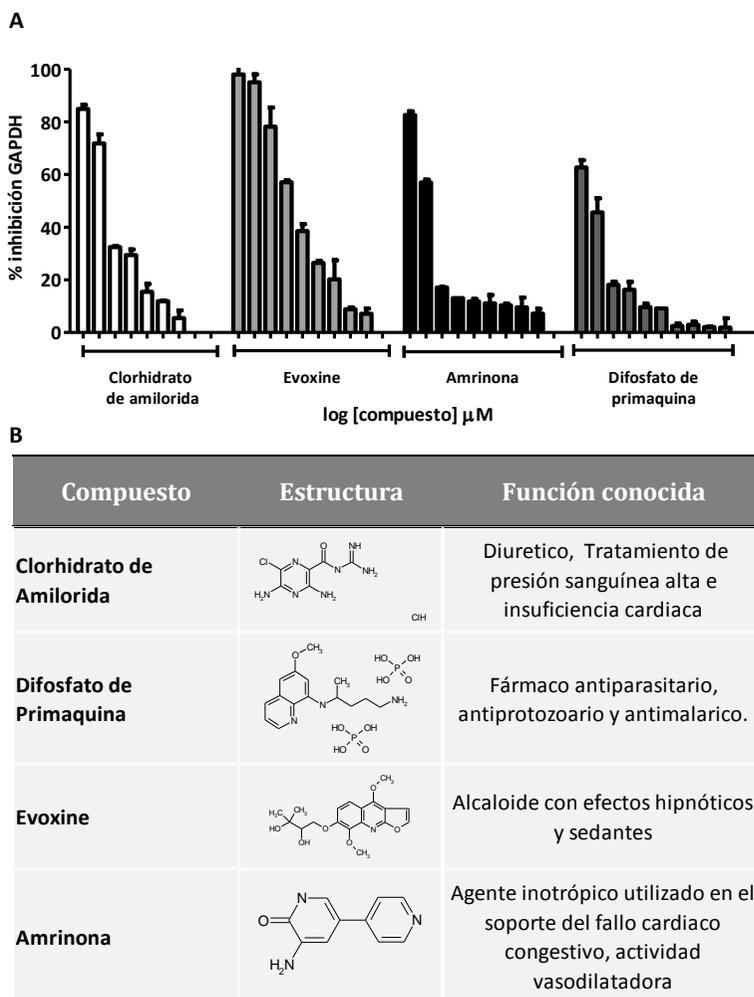


Figura 4.5. Ensayos de dosis respuesta para la inhibición de la actividad GAPDH. . A. Curva de dosis respuesta de los compuestos seleccionados (50, 35, 18, 12.5, 9, 6, 3, 1.5 y 1 μ M) en el ensayo de actividad GAPDH descrito en la figura 4.4B. Estructura y función de los compuestos seleccionados.

A continuación, a modo de ensayo secundario para evaluar la selectividad frente a GAPDH, se evaluó la actividad de los compuestos frente a enzimas reductoras similares como la lactato deshidrogenasa (LDH). Esta enzima cataliza la conversión de lactato a piruvato, mediante la reducción de NAD^+ a NADH. El seguimiento de la reacción catalizada por LDH se llevó a cabo como se ha descrito previamente para GAPDH, de modo que el incremento de la emisión de fluorescencia con el tiempo, debido a la formación del NADH, es proporcional a la actividad de LDH (Fig. 4.6).

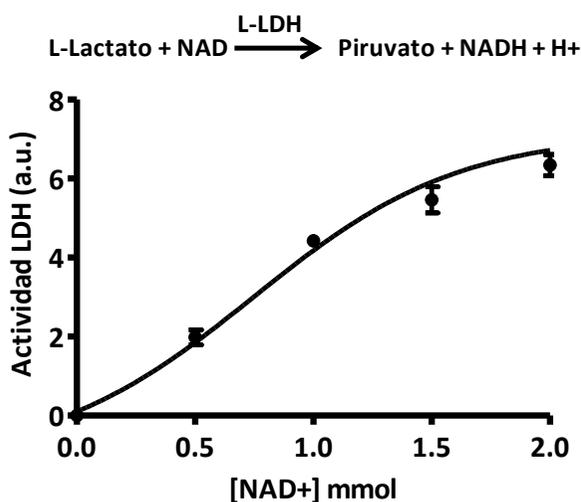


Figura 4.6. Estandarización de la actividad LDH *in vitro*. Evaluación de la actividad LDH a las concentraciones indicadas de NAD^+ . Se utilizaron 0.05 unidades de enzima LDH que se incubaron a 30°C en presencia de los substratos L-lactato (30 mM) y NAD^+ a las concentraciones indicadas. La actividad del enzima se monitorizó mediante espectroscopía de fluorescencia midiendo la emisión del NADH a 465 nm.

Se evaluó la actividad inhibitoria de los cuatro compuestos y se observó que el clorhidrato de amilorida y evoxine ejercían actividad inhibitoria sobre LDH. Por el contrario tanto amrinona como el difosfato de primaquina no inhiben la actividad LDH y se pueden considerar como inhibidores específicos de GAPDH (Fig. 4.7).

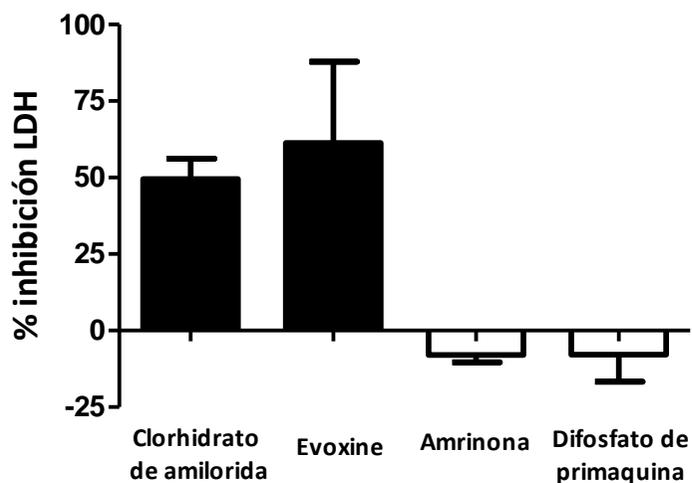


Figura 4.7. Inhibición de la actividad de la enzima LDH. La especificidad de los compuestos seleccionados como potenciales inhibidores de GAPDH, fue evaluada en el ensayo secundario de inhibición de la enzima LDH. Los compuestos (50 μ M) fueron incubados con 0.05 unidades del enzima LDH durante 15 minutos y la actividad del enzima se monitorizó mediante espectroscopía de fluorescencia midiendo la emisión del NADH a 465 nm.

4.3. DISCUSIÓN

La enzima GAPDH se considera una proteína “*housekeeping*” que además de su papel en la glucólisis está implicada en otras funciones. La desregulación, ya sea funcional o de localización, se ha asociado a diversas patologías y en especial, GAPDH ha cobrado un elevado interés como posible diana terapéutica en cáncer (Hara *et al.*, 2006; Tatton, 2000; Tristan *et al.*, 2011). Las células tumorales comúnmente presentan un aumento de la glucólisis aeróbica. Esta es una adaptación biológica a los cambios metabólicos, debida a la disfunción mitocondrial, la hipoxia y a señales oncogénicas, que favorece la utilización de la glucólisis como vía mayoritaria de obtención de ATP. En este sentido, se han observado alteraciones del metabolismo energético y un aumento en la expresión de las enzimas glucolíticas (Guo *et al.*, 2012; Pelicano *et al.*, 2006). Teniendo en cuenta el aumento en la aparición de resistencias a los tratamientos de quimio y radioterapia convencionales, es un reto científico la comprensión exacta de las alteraciones diferenciales en procesos como la glucólisis para el diseño de futuras terapias. Aun así, habrá que tener en cuenta que ciertos órganos son dependientes de glucólisis, incluyendo el cerebro, retina, y testículos y también utilizan la glucosa como fuente de energía principal. La inhibición de la glucólisis podría ser, en principio, tóxica para estos órganos. Sin embargo, los tejidos normales pueden utilizar eficazmente fuentes de energía alternativas (ácidos grasos, aminoácidos, etc) para generar suficiente ATP mitocondrial a través de metabolismo para apoyar su función celular cuando la vía glucolítica se inhibe durante la terapia.

Se han descrito distintos fármacos que ejercen acción inhibitoria de glucólisis; en unos casos como efecto secundario, p.ej., etopósido o cisplatino

(Rodríguez-Enriquez *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2002), otros muy inespecíficos como el gospol, inhibidor general de deshidrogenasas (Rodríguez-Enriquez *et al.*, 2009) y otros análogos de sustratos glucolíticos como 2-Deoxy-D-Glucosa (2-DOG). La 2DOG es reconocida por los transportadores de glucosa pero no puede entrar en la ruta de la glucólisis lo que disminuye el flujo glucolítico, inhibiendo la actividad enzimática de la hexoquinasa y glucosa-6-fosfato isomerasa (Fig. 4.1). Así pues, este compuesto se ha descrito como un inhibidor susceptible de bloquear la glucólisis en tumores. Sin embargo, al ser un inhibidor competitivo, las dosis efectivas son excesivamente elevadas (Cheng *et al.*, 2012; Giammarioli *et al.*, 2012). La glucólisis puede ser inhibida por otros compuestos, tales como arsenito, yodoacetato, oxalato y oxamato. Sin embargo, la eficacia en la reducción de tumores ha sido baja y se han demostrado efectos secundarios graves en los pacientes (Vivi *et al.*, 1997).

En este estudio, a partir de la evaluación de una quimioteca se han identificado dos compuestos que, de forma selectiva frente a enzimas similares, inhiben la enzima GAPDH. Estos compuestos se pueden considerar cabeza de serie para un futuro desarrollo en programas de química médica en aras de mejora de actividad y propiedades farmacológicas. En cualquier caso, el desarrollo de inhibidores de la glucólisis se espera que tenga aplicaciones futuras en terapias antitumorales siempre que el complejo estado metabólico que diferencia células tumorales de normales quede bien establecido.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- ♣ El péptido NBI1 desarrollado como inhibidor de determinados complejos CDK/ciclina, cuando se fusiona al péptido TAT es internalizado por la célula y localiza en el núcleo induciendo apoptosis en diferentes líneas celulares tumorales. NBI1 también puede formularse farmacológicamente utilizando liposomas.
- ♣ El cotratamiento con TAT-NBI1/erl en condiciones subletales tiene un efecto sinérgico sobre diferentes líneas celulares resistentes a erlotinib, induciendo la supresión de crecimiento y la inducción de apoptosis. En la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-468, induce estrés genotóxico que cursa con activación de caspasa-8, posiblemente mediada por el ripoptosoma.
- ♣ El tratamiento con TAT-NBI1 de células de túbulo renal sometidas a un proceso de I/R, tiene un efecto antiapoptótico, que se traduce en un aumento en la supervivencia y viabilidad celular. Se ha demostrado la implicación del complejo CDK5/ciclina I en el mecanismo molecular.
- ♣ Se han identificado, a partir del cribado de quimiotecas, dos compuestos inhibidores de GAPDH como futuros agentes terapéuticos en tratamientos de base metabólica en cáncer.

CAPITULO 5

Materiales y Métodos

5.1. Ensayos *in vitro*

5.1.1. Materiales

5.1.1.1. Reactivos

Para la síntesis de CF-TAT-NBI1: 5-(and-6)-Carboxyfluorescein, succinimidyl ester (C-1311, Invitrogen). Para realizar los liposomas: fosfatidilcolina (P3556, Sigma); fosfatidilglicerol (P9274, Sigma); colesterol (C8667, Sigma). Para el ensayo de inhibición de GAPDH y LDH: enzima GAPDH (G6019, Sigma); nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺, N15111, Sigma); tetrasodio pirofosfato (P8010, Sigma); arsenato de sodio (S9663, Sigma); D-gliceraldehído- 3-fosfato (G5251, Sigma); L-lactato deshidrogenasa (61309, Sigma) y L-lactato de sodio (L7022, Sigma).

5.1.1.2. Péptidos:

Péptido	Secuencia	Peso molecular
NBI1	rwimyf-NH ₂	914
TAT-NBI1	YGRKKRRQRRRGGrwimyf-NH ₂	2513
p21	Ac-FYHSKRRLIFS-NH ₂	1494

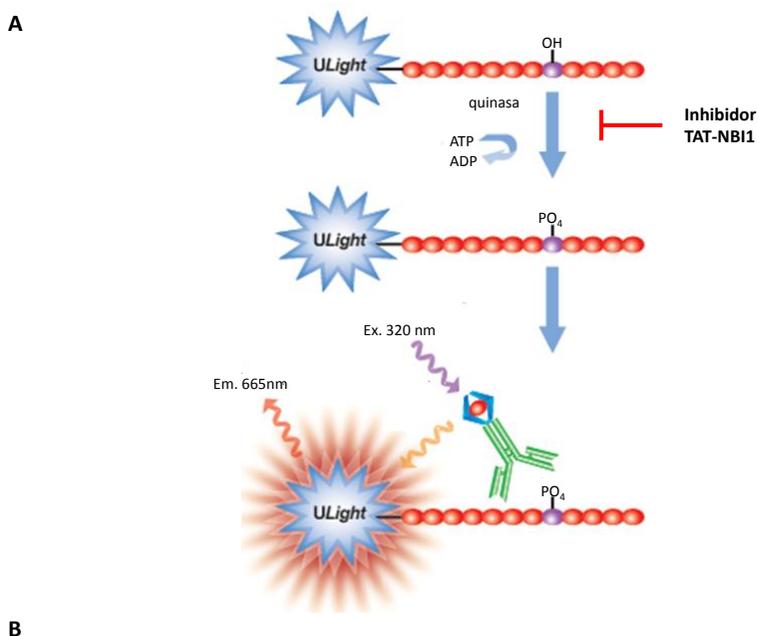
La síntesis de los péptidos fue realizado por Ana Giménez (técnico laboratorio de química de péptidos y proteínas del Centro de investigación príncipe Felipe), en un sintetizador automático de péptidos de Applied Biosystems 433A.

5.1.2. Métodos

5.1.2.1. Ensayo de Actividad quinasa

Para determinar la capacidad de inhibición de TAT-NBI1 sobre diferentes complejos CDK/ciclina, se realizaron ensayos de actividad quinasa en la empresa CEREP. Brevemente, los ensayos de actividad de los diferentes complejos CDK/ciclina recombinantes se realizaron en presencia de ATP y un péptido sustrato modificado con una sonda de emisión (Uligth-

CFFKNIVTPRTPPPSQGK-amide). Los complejos se incubaron en ausencia o presencia de diferentes concentraciones del inhibidor TAT-NBI1 (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 y 50 μM). El producto de reacción se incubó con un anticuerpo anti-fosfopéptido conjugado con europium (Eu). La reacción quinasa puede entonces ser analizada mediante la excitación del Eu que transfiere su energía al aceptor ULight que a su vez emite luz a 665 nm (Fig. 5.1A), siendo la intensidad de luz emitida proporcional al nivel de sustrato (péptido) fosforilado. Para cada tipo de CDK, las condiciones se resumen en la Fig. 5.1B.



Quinasa	Origen	Substrato	Incubación	Reacción
CDK2 (h)/cycA	Proteína recombinante humana	ATP +Uligth-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-amide (50nM)	30 min 22°C	phospho-Uligth-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-amide
CDK5/p35 (h)	Proteína recombinante humana	ATP +Uligth-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-amide (100nM)	60 min 22°C	phospho-Uligth-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-amide
CDK7/MAT1 (h)/cycH	Proteína recombinante humana	ATP +Uligth-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-amide (50nM)	30 min 22°C	phospho-Uligth-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-amide
CDK9 (h)/cycT1	Proteína recombinante humana	ATP +Uligth-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-amide (100nM)	90 min 22°C	phospho-Uligth-CFFKNIVTPRTPPPSQGK-amide

Figura 5.1. Ensayo de actividad quinasa. A. Modelo esquemático del fundamento del ensayo quinasa basado en la metodología LANCE. B. Condiciones del ensayo para cada uno de los complejos CDK/ciclina.

5.1.2.2. Ensayo de anisotropía de fluorescencia

El ensayo de polarización/anisotropía de fluorescencia se basa en el hecho de que una molécula fluorescente cuando es excitada por luz polarizada en un plano, emite en ese mismo plano siempre que no haya movimiento. Las moléculas pequeñas se mueven de modo que el plano de emisión es diferente del plano de excitación. Si un haz de luz verticalmente polarizada excita un fluoróforo en movimiento, la luz emitida podrá ser recogida en el plano vertical y en el horizontal. El grado de movimiento de la luz emitida desde el plano vertical al horizontal nos informa de la movilidad de la molécula. De tal modo que, si una molécula es grande la luz permanecerá polarizada mientras que una molécula pequeña, que tendrá un movimiento mayor, perderá dicha polarización. Esta propiedad de los fluoróforos se usa entre otras aplicaciones para estudiar la interacción entre diferentes moléculas, de tal modo que al aumentar el tamaño molecular, disminuye la movilidad y por tanto aumenta la polarización de la luz.

La polarización se define por tanto como: $P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$

donde I_{\parallel} es la intensidad de luz paralelamente polarizada e I_{\perp} es la intensidad de luz perpendicularmente polarizada.

En este caso, se sintetizó un derivado fluorescente del péptido TAT-NBI1 mediante su conjugación a carboxifluoresceína (CF-TAT-NBI1) y se estudió su interacción con ciclina A2 humana y sus mutantes. Para conservar intactas las propiedades del péptido bioactivo se incluyó una secuencia separadora de dos glicinas entre la secuencia del péptido y la secuencia TAT. El péptido TAT-NBI1 se sintetizó utilizando química Fmoc en fase sólida, en el sintetizador automático de péptidos 433A de Applied Biosystems y se purificó utilizando HPLC de fase reversa en un cromatógrafo de alta resolución (HPLC, Merck

Hitachi L-2130) equipado con una columna (C-18, Lichrospher® 100 (250 x 10 mm)) hasta obtener una pureza superior al 90%. Su identidad se comprobó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (peso molecular: 2513 Da). Para la incorporación de la CF se empleó el mismo tipo de síntesis realizando un acople final sobre la resina con 5-(and-6)-Carboxyfluorescein, succinimidyl ester.

Mediante anisotropía de fluorescencia se analizó la interacción de CF-TAT-NBI1 con ciclina A2 humana y el mutante de ciclina A2 NQM. En placas negras de 96 pocillos Opti-plate (Perkin Elmer), se realizaron diluciones seriadas de la proteína (0.001-37 μM) que se incubaron en presencia de CF-TAT-NBI1 (60 nM), en un volumen total de 200 μl , durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para realizar estudios de unión del péptido a las diferentes proteínas se excitó la CF con luz polarizada de longitud de onda de 480 nm y se midió la emisión de fluorescencia polarizada a 580 nm, utilizando el espectrofluorímetro Wallac Victor 1420.

5.1.2.3. Dicroísmo circular

La espectroscopía de dicroísmo circular (DC) tiene su fundamento en las propiedades que tienen algunos átomos o grupos de átomos de absorber en diferente proporción la luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda. La luz linealmente polarizada puede ser considerada como una superposición de luz circularmente polarizada a derechas e izquierdas de la misma fase y amplitud. De tal modo que si esa luz atraviesa una molécula ópticamente activa que absorbe de forma diferencial ambos componentes de la luz se genera una elipse. La existencia de esa elipticidad es lo que se denomina dicroísmo. En proteínas los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe a la distribución espacial de

la cadena principal de la proteína, de tal modo, que las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria. Los perfiles de DC de estructuras secundarias tipo α -hélice se caracterizan por la existencia de un máximo en 190 nm y dos mínimos a 208 y 222 nm, mientras que los perfiles de estructuras β se reconocen por presentar un máximo a 195 nm y un mínimo a 217 nm y la estructura desorganizada (“*random coil*”) presenta un mínimo en el rango de 190-200 nm. Estas diferencias entre los perfiles de DC permiten determinar el tipo de estructura predominante en una proteína.

La caracterización de estructura secundaria por CD se realizó usando un dicrógrafo tipo Jasco 810. Una alícuota de cada proteína (ciclina A2 humana y mutante) se diluyó en tampón fosfato 20 mM hasta alcanzar una concentración de 3 μ M. Su espectro se recogió en la zona entre 200-240 nm en una celda de cuarzo de 0.1 mm de paso óptico a 25 °C. El análisis del contenido de estructura secundaria de las proteínas estudiadas a partir de su espectro de CD se realizó mediante el uso de los programas K2D3 (Louis-Jeune *et al.*, 2011) y DichroWeb (Whitmore y Wallace, 2008).

5.1.2.4. Preparación de las muestras para cristalización

Ciclina A2 humana y ciclina A3 bovina, se intentaron cristalizar en colaboración con el Dr Alberto Marina del IBV (CSIC) en presencia y ausencia de NBI1. Los detalles se describen a continuación:

a) *Ciclina A2 humana*, los componentes del complejo se incubaron en una relación 1:2.5:2.5 de ciclina A2 humana, NBI1 y p21 (apartado 5.1.1.2), respectivamente, en tampón 20 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 3 mM KCl, 5% glicerol. Para la purificación se utilizó una columna superdex 200. Los picos de exclusión fueron analizados por espectrometría de masas para identificar el pico correspondiente al complejo. El complejo una vez purificado fue enviado a cristalizar.

b) Ciclina A3 bovina, los componentes del complejo se pusieron en una relación 1:2.5 de ciclina A3 bovina y NBI1, respectivamente, en tampón 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 100 mM MgCl₂, 0.01% monotioglicerol, 0.01% NaN₃. Para purificar el complejo se utilizó una columna superdex 200. Los picos de exclusión fueron analizados por espectrometría de masas para identificar el pico correspondiente al complejo. El complejo una vez purificado fue enviado a cristalizar.

5.1.2.5. Obtención de liposomas unilamelares (SUVs)

Para la obtención de liposomas se siguió esencialmente el procedimiento descrito por Chatterjee S y Banerjee DK (Chatterjee y Banerjee, 2002), el procedimiento consta de tres etapas principales que se detallan a continuación:

a) Preparación de la película lipídica, los componentes (6.5 mg fosfatidilcolina, 3.5 mg fosfatidilglicerol, 2 mg colesterol y 50 mg sacarosa) son introducidos en un matraz de fondo redondo, y disueltos con 1 ml de una mezcla 2:1 (v/v) de cloroformo:metanol. Una vez disueltos, se procedió a la eliminación del disolvente orgánico por evaporación mediante paso de corriente de nitrógeno gaseoso.

b) Hidratación de la película lipídica, se añadieron 500 µl del compuesto (5mM de NBI1 o erlotinib diluido en tampón fosfato salino (PBS)) al matraz que contenía la película lipídica. Para la hidratación, se agitó el matraz durante 30 segundos en un vibromixer (potencia máxima) seguidos de 30 segundos de reposo en el baño a 35°C. Esta operación se prolongó hasta obtener un tiempo de agitación efectivo de 10 minutos. Finalmente, se dejó en reposo a 35°C durante 30 minutos para asegurar la obtención de vesículas cerradas sin defectos estructurales. Los liposomas hasta aquí obtenidos fueron multilamelares (MLVs) y con un tamaño medio generalmente superior a los 1000 nm.

c) Obtención de liposomas SUV, para obtener liposomas SUVs (vesículas unilamelares pequeñas), los MLVs fueron sonicados en periodos de 2 minutos y un minuto de reposo, hasta un tiempo efectivo de sonicación de 10-16 minutos o hasta que la solución adoptará un aspecto opalescente, indicativo de que los liposomas tienen un tamaño ≤ 100 nm.

5.1.2.6. Ensayos de inhibición de GAPDH

GAPDH es la enzima que cataliza la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato y a 1,3-difosfoglicerato mediante la reducción de NAD⁺ a NADH. El ensayo de actividad GAPDH se basa en el seguimiento por espectrofluorimetría de dicha reducción puesto que el NADH difiere de su forma oxidada en que tiene un máximo de absorción a 340 nm y un máximo de emisión a 465 nm.

D-Gliceraldehído-3-fosfato + NAD⁺ → 1,3-bifosfoglicerato + NADH

En el ensayo de actividad de GAPDH se procedió a la búsqueda de inhibidores mediante el cribado de la quimioteca Prestwick. Para ello, en placas de 96 pocillos de fondo plano negras, fue adicionado, el compuesto a diferentes concentraciones (50, 25, 12.5, 6.5, 3.0, 1.5, 0.6 y 0.3 μ M), junto con 0.01-0.03 unidades de GAPDH recombinante en una solución de composición, 13 mM tetrasodio pirofosfato, 26 mM arsenato de sodio, 3.3 mM DTT pH 8.5, en un volumen final de 70 μ l, e incubado a 30°C durante 15 minutos. Por último, se añadió 30 μ l de la mezcla de sustratos compuesta por 5 mM NAD⁺, 5 mM D-gliceraldehído-3-fosfato. El incremento de la fluorescencia se midió a 340 nm, cada 10 segundos durante 5 minutos usando el espectrofluorímetro Wallac Victor 1420.

5.1.2.7. Ensayos de inhibición de LDH

La lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la conversión de lactato a piruvato, y NAD⁺ es reducido a NADH; el índice de incremento de la absorbancia, debido a la formación del NADH, es proporcional a la actividad de LDH.



En resumen, en placas de 96 pocillos de fondo plano negras, fue adicionado, el compuesto a diferentes concentraciones (50, 25, 12.5, 6.5, 3.0, 1.5, 0.6 y 0.3 μM), junto con 0.05 unidades de LDH en un volumen final de 70 μl de una solución de composición, 13 mM tetrasodio pirofosfato, 26 mM arsenato de sodio, 3.3 mM DTT pH 8.5 e incubado a 30°C durante 15 minutos. Finalmente, se añadió 30 μl del sustrato compuesto por 30 mM lactato de Sodio y 3 mM NAD⁺. El incremento de la fluorescencia se midió a 340 nm, cada 10 segundos durante 5 minutos usando el espectrofluorímetro Wallac Victor 1420.

5.2. Técnicas de biología molecular y manipulación de cultivos de *Escherichia coli*

5.2.1. Materiales

5.2.1.1. Oligonucleótidos

Oligonucleótido	Secuencia
Ciclina A2 humana (<i>sentido</i>)	CGGTCCCATGGGATTGGGCAACTCTGC GCCGGGCCTG
Ciclina A2 humana (<i>antisentido</i>)	CAGGACTCGAGCAGATTTAGTGTCTCTGGTGGGTTG
Mutante NQM de Ciclina A2 (<i>sentido</i>)	GACTTAGCTGCTCCAACAGTAGCGGGTTTCTTACCAATACTTTCTG
Mutante NQM de Ciclina A2 (<i>antisentido</i>)	CAGAAAGTATTGGGTAAGAAAACGCCCTACTGTTGGAGCAGCTAAGTC
Mutante QNT de Ciclina A2 (<i>sentido</i>)	GCTCCAACAGTAAATCAGTTTCTTGC GAATACTTTCTGCATCAGCAGCC
Mutante QNT de Ciclina A2 (<i>antisentido</i>)	GGCTGCTGATGCAGAAAGTATTGCGCAAGAACTGATTTACTGTTGGAGC
Ciclina A3 bovina (<i>sentido</i>)	CGGTCCCATGGTGAGTGTTAATGAAGTACCAGACTACC
Ciclina A3 bovina (<i>antisentido</i>)	CAGCGACTCGAGCAGATTTAGTGTCTCTGGTGGGTTG

5.2.1.2. Plásmidos

Nombre del Plásmido	Vector	Tamaño	Antibiótico de resistencia
Ciclina A2 humana	pET28a	5369	kanamicina
Mutante NQM de Ciclina A2	pET28a	5369	kanamicina
Mutante QNT de Ciclina A2	pET28a	5369	kanamicina
Ciclina A3 bovina	pET21d	5440	ampicilina

5.2.1.3. Cepas de *E. coli*

Cepa <i>E. coli</i>	Referencia	Antibiótico de resistencia
DH5 α	18265-017 Invitrogen	-
BL21 (DE3) ³	C6000-03 Invitrogen	-
BL21 pLysS (DE3) ³	C6060-03 Invitrogen	cloranfenicol

5.2.1.4. Kits

- i) QIAprep Spin Miniprep Kit (27106, Quiagen)
- ii) QuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (200518, Stratagene)

5.2.2. Métodos

5.2.2.1. Clonación y mutagénesis

a) Obtención de plásmidos, para la obtención de plásmidos se sembraron cultivos de 10 ml en medio LB, que se dejaron crecer toda la noche a 37°C en agitación. Posteriormente, las células fueron recolectadas mediante centrifugación 5 minutos a 3000 revoluciones por minuto (rpm) y su DNA plasmídico extraído siguiendo las instrucciones del Kit “QIAprep Spin Miniprep”. El DNA fue enviado a servicio de secuenciación del CIPF para para contrastar la secuencia de las construcciones, utilizando oligonúcleotidos específicos (apartado 5.2.1.1).

b) Ciclina A2 humana y mutantes, el gen que codifica para ciclina A2 humana fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos de ciclina A2 humana sentido y antisentido descritos en el apartado 5.2.1.1 y subclonado en el vector de expresión bacteriano pET28a (apartado 5.2.1.2) entre los sitios de restricción NcoI y XhoI. Este plásmido incorpora una cola de 6-Histidinas en el extremo N-terminal de la proteína.

Tras la clonación de ciclina A2 humana en el vector pET28a se realizaron 2 mutantes triples de esta proteína, los residuos originales de la secuencia fueron sustituidos por alanina. En el primer mutante denominado NQM los residuos Asn312, Gln313 y Met334 fueron sustituidos por alanina y en el segundo mutante denominado QNT los residuos mutados fueron, la Gln228, la Asn229 y la Thr316. Para realizar estas mutagénesis se utilizó el kit de mutagénesis “Quickchange mutagenesis kit”, siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando los oligonúcleotidos NQM y QNT que se describen en apartado 5.2.1.1.

c) Ciclina A3 bovina, un fragmento que codifica para ciclina A bovina (región Val171 a Leu432) se encuentra clonado en el vector de expresión bacteriano pET21d (apartado 5.2.1.2) entre los sitios de restricción NcoI y XhoI (Novogen, Madison, WI) (Brown *et al.*, 1995). Este plásmido incorpora seis residuos de

histidina consecutivos en el extremo C-terminal de la proteína. La construcción recombinante fue analizada mediante secuenciación para comprobar la correcta inserción del fragmento correspondiente a ciclina A3 bovina.

5.2.2.2. Condiciones de cultivo y manipulación de *E.coli*

5.2.2.2.1. Transformación de células *DH5α*, *BL21 (DE3)* y *BL21 pLysS (DE3)*

Las cepas de *E. coli*. *DH5α*, *BL21 (DE3)* y *BL21 pLysS (DE3)* se transformaron utilizando 1-50 ng del plásmido (apartado 5.2.1.2) y 30 μ l de *E. coli*, siguiendo el método de choque térmico. Brevemente, este consistió en incubar las células y el DNA durante 30 minutos en hielo. Las células se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 45 segundos. A continuación las células se mantuvieron 2 minutos en hielo y se añadieron 4 volúmenes de medio Luria Bertani (LB) atemperado para, seguidamente incubar a 37°C durante 1 hora en agitación. 100 μ l de células se sembraron en un medio en placas de agar LB con el antibiótico de elección de las células (apartado 5.2.1.3) y del plásmido (apartado 5.2.1.2).

5.2.2.3. Purificación de proteínas Recombinantes

a) Purificación de ciclina A2 humana y mutantes, la expresión de la construcción de ciclina A humana y sus mutantes fue inducida en células *E. coli* *BL21-(DE3)* en medio Terrific Broth (TB, 11.8 g/L Triptona, 23.6 g/L extracto de levadura, 2.2 g/L dihidrógeno fosfato de potasio, 9.4 g fosfato dipotásico, 100 μ g/ml de kanamicina y 0,5% glucosa). Las células se crecieron hasta llegar a la fase logarítmica (densidad óptica 0.7) y se indujo la expresión de la proteína mediante la adición de 0.1 mM isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 4 horas a 25°C. Las bacterias fueron recolectadas por centrifugación y resuspendidas en tampón B (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glicerol, 10 mM β -mercaptoetanol, 10 μ g/ml leupeptina, 10 μ g/ml peptatina A, 100 μ M fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 mg/ml de lisozima) en el que se incubaron durante 30 minutos en hielo. Para completar la lisis las células se sonicaron en un sonicador digital BRANSON S-450D al 60%

de amplitud, durante 3 minutos con pausas en hielo cada minuto para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. Finalmente, el lisado se centrifugó a 6.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante de esta centrifugación fue sometido a cromatografía de afinidad utilizando una columna de níquel-agarosa, equilibrada en tampón B. La elución de la proteína se llevó a cabo utilizando un tampón que contenía imidazol (20 mM Tris HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 10% glicerol, 10 mM β -mercaptoetanol y 150 mM imidazol). Las diferentes fracciones obtenidas de la cromatografía de afinidad se identificaron mediante SDS-PAGE y aquellas que contenían ciclina A se unificaron. Para evitar la agregación de la proteína se añadió 100 mM MgCl₂. Posteriormente se realizó una cromatografía de intercambio iónico equilibrada con tampón B (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl). La elución de la proteína, se realizó en tampón C (20 mM Tris pH 8.0, 1000 mM NaCl). Las fracciones correspondientes a la ciclina, se agruparon y se determinó su concentración mediante espectroscopía (La ciclina A humana tiene un coeficiente de extinción de 41830 M⁻¹ cm⁻¹ y un peso molecular de 48500 Da).

El procedimiento para expresar los mutantes NQM (coeficiente de extinción de 41830 M⁻¹ cm⁻¹ y peso molecular 49199 Da) fue el mismo que para la purificación de ciclina A2 humana. En el caso del mutante QNT, se realizaron diversos cambios en el protocolo para tratar de optimizar el proceso. Sin embargo tras evaluar la expresión en diferentes cepas de *E. coli*, diferentes tiempos, temperaturas de inducción y diferentes concentraciones de IPTG la purificación del mutante QNT no se logró conseguir.

b) Purificación de Ciclina A3 Bovina, para purificar ciclina A bovina se siguió el protocolo recomendado por Brown, 1995 (Brown *et al.*, 1995). Brevemente, la expresión de dicha proteína se realizó en la cepa de *E. coli* BL-21 pLys-S en medio LB, en presencia de 100 μ g/ml ampicilina y 100 μ g/ml cloranfenicol. Las células fueron crecidas hasta alcanzar la fase logarítmica (densidad óptica 0.7) y se indujo la expresión de la proteína mediante la adición

de 0.1 mM IPTG, seguido de una primera incubación a 37°C durante 30 minutos y una segunda incubación durante 3 horas a 30°C. El pellet celular se recolectó mediante centrifugación se resuspendió en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.01% monotioglicerol, 10 µg/ml leupeptina, 10 µg/ml pestatina, 100 µM PMSF, 20 µg/ml DNAsa, 20 µg/ml RNAsa, 0.1% Triton X-100, 10 mM MgCl₂, 0.01% NaN₃). La lisis celular se realizó mediante tres rondas de congelación/descongelación y los lisados se incubaron en hielo durante 30 minutos. El lisado se centrifugó a 2.200 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue sometido a cromatografía de afinidad utilizando una columna de Niquel-agarosa, equilibrada en tampón N (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.01% monotioglicerol, 0.01% NaN₃). La elución se realizó utilizando un gradiente lineal de imidazol (0-500 mM) en tampón N. Las fracciones que contenían ciclina A bovina fueron identificadas mediante SDS-PAGE y unificadas. Para evitar la agregación de la proteína se añadió una concentración final de 100 mM MgCl₂. Posteriormente se realizó una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna de cromatografía Superdex 200 equilibrada con 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 100 mM MgCl₂, 0.01% monotioglicerol, 0.01% NaN₃. Ciclina A-3 eluyó en dos picos, el primero correspondiente a agregados oligoméricos y el segundo a la proteína monómerica. Las fracciones correspondientes al último pico, se agruparon y se determinó su concentración mediante espectroscopía (coeficiente de extinción de 34965 M⁻¹ cm⁻¹ y peso molecular de 30807 Da).

5.3. Manipulación de células Eucariotas

5.3.1. Materiales

5.3.1.1 Líneas celulares y medios

Las líneas celulares utilizadas se obtuvieron de la ATCC (American type cell culture) y se resumen en la siguiente tabla:

Tipo celular (Número ATCC®)	Procedencia	Medio de crecimiento y condiciones	Características
MDA-MB-468 (HTB-132)	Adenocarcinoma de mama (<i>Homo sapiens</i>)	Leibovitz's L-15 (Invitrogen, 11415-064) con 10% SFB, a 37°C sin CO2	Celulas epiteliales adherentes
MDA-MB-231 (HTB-26)	Adenocarcinoma de mama (<i>Homo sapiens</i>)	Leibovitz's L-15 (Invitrogen, 11415-064) con 10% SFB, a 37°C sin CO2	Celulas epiteliales adherentes
MCF-7 (HTB-22)	Adenocarcinoma de mama (<i>Homo sapiens</i>)	DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle", Invitrogen, 41966-052) con 10% SFB, a 37°C con CO2	Celulas epiteliales adherentes
SkBr3 (HTB-30)	Adenocarcinoma de mama (<i>Homo sapiens</i>)	McCoy's 5A (Invitrogen, 26600-023) con 10% SFB, a 37°C con 5% CO2	Celulas epiteliales adherentes
A549 (CCL-185)	Carcinoma de pulmón (<i>Homo sapiens</i>)	DMEM (Invitrogen, 41966-052) con 10% SFB, a 37°C con CO2	Celulas epiteliales adherentes
Jurkat (TIB-152)	Leucemia de celulas T (<i>Homo sapiens</i>)	RPMI 1640 ("Rowell Park Memorial Institute", Invitrogen, 21875-091) con 10% SFB, a 37°C con CO2	Linfoblastos en suspensión
Saos-2 (HTB-85)	Osteosarcoma (<i>Homo sapiens</i>)	DMEM (Invitrogen, 41966-052) con 10% SFB, a 37°C con CO2	Celulas epiteliales adherentes
HL-60 (CCL-240)	Leucemia promielítica (<i>Homo sapiens</i>)	RPMI 1640 (Invitrogen, 21875-091) con 10% SFB, a 37°C con CO2	Mieloblastos en suspensión
LLC-PK1 (CL-101)	Túbulo proximal porcino (<i>Sus scrofa</i>)	Medio 199 (Invitrogen, 31150-022) con 3% SFB, a 37°C con CO2	Celulas epiteliales adherentes

Para ensayos de silenciamiento y sobreexpresión de proteínas se utilizó el medio Opti-MEM (Opti-MEM® *Reduced Serum Medium* (3198, Invitrogen)).

5.3.1.2. Compuestos

Erlotinib fue inicialmente suministrado por Genentech y luego fue adquirido de LC Laboratories (E-4007). TAT-NBI1 fue sintetizado como se describe en Canela, et al, 2006 (Canela *et al.*, 2006) y también está disponible en Calbiochem (238808). Roscovitina (R7772), etoposido (E1383), el inhibidor de calpaina I (ALLN, A6185) y doxorubicina (D1515) se obtuvieron de Sigma, necrostatina-1 de Enzo Life Sciences (AP-309-C020) y zVAD-fmk de Tocris bioscience (2163).

5.3.1.3. Reactivos

Para los ensayos de silenciamiento y expresión de proteínas: Lipofectamine 2000 (11668, life technologies). Para el ensayo de viabilidad: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT; M5655, Sigma) y el colorante azul de tripán (diluido al 0.004%; 1106934, invitrogen). Para el análisis del ciclo celular: yoduro de propidio (P4864, Sigma). Para las inmunofluorescencias: medio de montaje con DAPI ("Mounting Medium with DAPI"; H-1200, Vector Laboratories). Para el ensayo de actividad caspasa-3: sustrato fluorogénico de caspasa-3 (Ac-DEVD-AFC; P-409, Biomol). Para revelar los western Blot: ECL Western Blotting Detection Reagents (RPN2209, GE Healthcare).

5.3.1.4. RNA de interferencia

siRNA	Casa comercial	# catalogo	Concentración
siRNA de Caspasa-2 humana	Thermo Scientific	835	50 nM
siRNA de Caspasa-8 humana	Thermo Scientific	841	60 nM
siRNA de Caspasa-10 humana	Cell signaling	6357	50 nM
siRNA de LRDD/PIDD humano	Thermo Scientific	55367	70 nM
siRNA de p35 humano	Santa Cruz biotechnology	sc-36153	70 nM
siRNA Ciclina I humana	Santa Cruz biotechnology	sc-35141	80 nM
Control siRNA (Random)	Cell signaling	6568	50 nM

5.3.1.5. Plásmidos

Plásmido	Casa comercial	# catalogo
Cdk5-DN-HA	Addgene	1873
Cdk5-HA	Addgene	1872

5.3.1.6. Anticuerpos primarios

ANTICUERPO	Casa comercial	# catalogo	Secundario	Peso molecular	Dilución WB/IFI
Bad	Cell signaling	9292	conejo	23 kDa	1:1000
Bax	Cell signaling	2772	conejo	20 kDa	1:1000
Bcl-2 (50E3)	Cell signaling	2870	conejo	26 kDa	1:1000
Bcl-Xl (54H6)	Cell signaling	2764	conejo	30 kDa	1:1000
BID	Cell signaling	2002	conejo	15 y 22 kDa	1:1000
BIM	Cell signaling	2819	conejo	23 ,15 y 12 kDa	1:1000
Caspasa-10	MBL	M059-3	ratón	58, 57, 43, 30 kDa	1:1000
Caspase 2	Millipore	MAB3507	rata	50, 18 y 12 kDa	1:1000
Caspase-3	Cell signaling	9662	conejo	35 ,19 y 17 kDa	1:1000
Caspase-8 (1C12)	Cell signaling	9748	ratón	57, 43 y 18 kDa	1:1000
Caspase-9 (C9)	Cell signaling	9508	ratón	47, 37 y 35 kDa	1:1000
CDK5	Cell signaling	2506	conejo	35 kDa	1:1000
Chk1 fosforilado	Cell signaling	23425	conejo	56 kDa	1:1000/ 1:150
Chk1 TOTAL	Cell signaling	2360	ratón	56 KDa	1:1000
Ciclina I	Santa Cruz Biotechnology	sc-5547	conejo	47 kDa	1:2000
ERK1/2 fosforilado	Santa Cruz Biotechnology	sc-7383	ratón	44 y 42 kDa	1:1000
GAPDH (14C10)	Cell signaling	2018	conejo	37kDa	1:1000
H2AX(Ser139) fosforilado	Cell signaling	9718S	conejo	15 kDa	1:1000/ 1:150
IAP1-c	Cell signaling	4952	conejo	62 kDa	1:1000
Mcl-1	Cell signaling	4572	conejo	40 kDa	1:1000
p35/p25	Santa Cruz Biotechnology	sc-820	conejo	35 y 35 kDa	1:2000
PIDD	Enzo Life Scieces	ALX-804-387	ratón	90, 51, 48 y 37kDa	1:1000
Tubulina α	Sigma	T8203	ratón	50 kDa	1:3000

5.3.1.7. Anticuerpos secundarios

ANTICUERPO	Casa comercial	# catalogo	Dilución WB/IFI
Anti conejo, IgG-HRP	GE Healthcare	NA934	1:3000 -WB
Anti ratón, IgG-HRP	GE Healthcare	NA931	1:3000 - WB
Anti rata, IgG-HRP	GE Healthcare	NA935	1:3000 - WB
Alexa Fluor® 555 F(ab') ₂	Invitrogen™	A-21430	1:200 - IFI

5.3.1.8. Kits

- i) *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I* (556547, BD Pharmingen).
- ii) *Innocyte™ Flow Cytometric Cytochrome c Release* (CBA077, Calbiochem).
- iii) *Pierce BCA Protein Assay Kit* (23225, Thermo Scientific).

5.3.2. Métodos

5.3.2.1. Tratamientos celulares

5.3.2.1.1. Tratamientos con los compuestos

Las células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos o 6 pocillos, en una densidad celular determinada previamente, de acuerdo a la línea celular y a la técnica a realizar (Tabla 5.1). Para llevar a cabo los tratamientos, tras la adhesión de las células por 12 horas, las células fueron tratadas con los compuestos a las concentraciones indicadas en cada caso (apartado 5.3.1.2) e incubadas durante 24, 48 o 72 horas. Posteriormente son recolectadas según se indica en cada uno de los diferentes protocolos. En el caso de LLC-PK1 los procedimientos experimentales se detallan en el apartado 5.3.2.1.3. En todos los casos los compuestos fueron disueltos en DMSO, salvo la doxorrubicina y el TAT-NBI1 que se disolvieron en PBS.

Tabla 5.1. Densidad celular por línea celular

Tipo celular	Número de Pocillos	
	96	6
	100 μ l	2000 μ l
MDA-MB-468	12500	250000
MDA-MB-231	12500	250000
MCF-7	5000	130000
SkBr3	5000	130000
A549	5000	50000
Jurkat	5000	180000
Saos-2	5000	160000
HL-60	5000	140000
LLC-PK1	8000	400000

Las placas de 96 pocillos son utilizadas para el ensayo de MTT y las placas de 6 pocillos para los demás ensayos, según se especifica en cada una de las técnicas.

5.3.2.1.2. Silenciamiento de genes mediante RNA de interferencia y sobreexpresión de proteínas mediante transfección génica

En este trabajo se realizaron las transfecciones génicas y de RNA de interferencia (siRNA) por medio de lipofección. Esta técnica consiste en la formación de pequeños liposomas que contienen el DNA o RNA que se pretende introducir en la célula. Para ello, se utilizó el reactivo lipídico catiónico Lipofectamine 2000, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos según se indica en la Tabla 5.1 y tras alcanzar una confluencia del 50%, se lavaron con PBS estéril añadiendo tras los lavados 800 μ l de medio Opti-MEM. Se realizó una dilución de lipofectamina 2000 de 50 pmol o 100 pmol en 100 μ l de Opti-MEM para transfección de DNA o siRNA respectivamente. De forma paralela se diluyeron 2 μ g de plásmido (apartado 5.3.1.5) ó 50-100 nM de siRNA (apartado 5.3.1.5) en 100 μ l de Opti-MEM, cada dilución se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar dicha incubación, la solución de lipofectamina y de plásmido o siRNA fueron mezcladas e incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente. Dicha mezcla (200 μ l) se añadió a cada

pocillo y se incubaron las células durante 4 horas. Al terminar el tiempo de incubación se retiró el Opti-MEM y los pocillos fueron lavados con PBS y se añadieron 2 ml de medio. Los tratamientos (apartado 5.3.2.1.1 y para el caso del línea LLC-PK1 apartado 5.3.2.1.3) siempre se han llevado a cabo después de 24 horas de silenciamiento o sobreexpresión y se mantuvieron durante 24-72 horas según se indica en cada caso. La eficacia de la sobreexpresión o silenciamiento se comprobó mediante Western blot.

5.3.2.1.3. Modelo celular de isquemia/reperfusión

Con el fin de simular el proceso de isquemia reperfusión, las células LLC-PK1 fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una concentración de 400.000 células por pocillo y se dejaron adherir a la placa durante 12 horas. Posteriormente, fueron incubadas durante 24 horas en condiciones de hipoxia (1.5 % oxígeno) e hipercapnia (18% CO₂). Pasado este tiempo, las células se trataron con los compuestos y finalmente fueron incubadas 24 horas más en condiciones de normoxia (37°C con 21% de oxígeno y 5% CO₂) (Fig. 5.2). El proceso global es por tanto un proceso de Hipoxia-Hipercapnia y Normoxia (Hx-Hp/Nx).

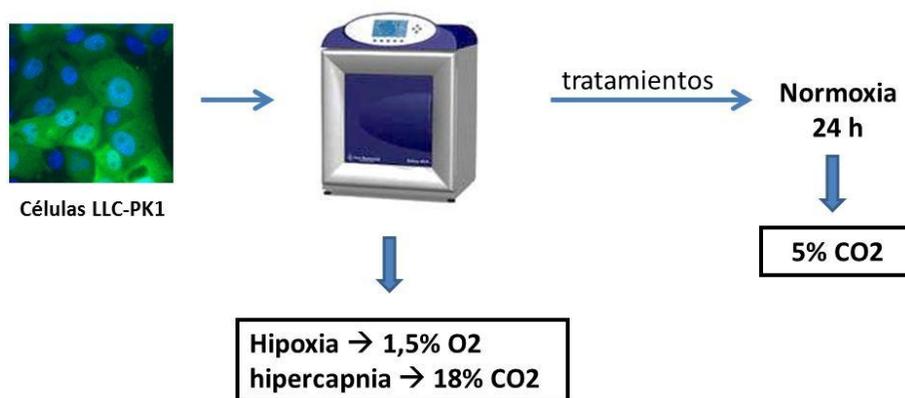


Figura 5.2. Representación esquemática del modelo isquemia reperfusión.

5.3.2.1.4. Inmunofluorescencia

Las células son sembradas en cubreobjetos redondos (4 cubreobjetos (10 mm) por pocillo) en placas de 6 pocillos según cada tipo celular como se detalla en la Tabla 5.1. Después de los diferentes tratamientos, que se detallan en cada sección, las células fueron fijadas con 4% paraformaldehído en PBS durante 15 minutos y permeabilizadas con 0.3% Triton X-100 (v/v) en PBS durante 15 minutos. A continuación, fueron incubadas en solución de bloqueo (0.2% gelatina, 0.3% Triton X-100 en PBS) a temperatura ambiente, durante 1 hora. Posteriormente, fueron incubadas en la solución de bloqueo que contenía el anticuerpo primario en las diluciones que se indican en el apartado 5.3.1.6 a 4°C, durante toda la noche. Después de tres lavados con PBS las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, en solución de bloqueo, a temperatura ambiente, durante 2 horas en la oscuridad, utilizando las diluciones que se detallan en el apartado 5.3.1.7. A continuación, las células se lavaron 3 veces con PBS y los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con 5 µl de solución de montaje (1 parte de DAPI (VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI) por 1000 partes de mowiol). Se dejaron secar durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se tomaron fotografías con un microscopio invertido de fluorescencia (Leica DM 6000) acoplado a una cámara digital (Leica DC-500).

5.3.2.2. Ensayos de determinación de viabilidad y muerte celular:

5.3.2.2.1. Ensayos de Viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular después de los diferentes tratamientos, se utilizaron ensayos de valoración de la actividad mitocondrial, así como ensayos de exclusión del colorante vital azul de tripán, con conteo en cámara de Neubauer, los cuales se describen a continuación.

a) Ensayos de actividad mitocondrial por MTT, se utilizó la sonda MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) para evaluar la integridad mitocondrial. El ensayo de MTT se basa en la reducción metabólica

del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, a formazán un compuesto de color azul (Fig. 5.3). Esta reducción permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas, de tal forma que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Denizot y Lang, 1986; Mosmann, 1983).

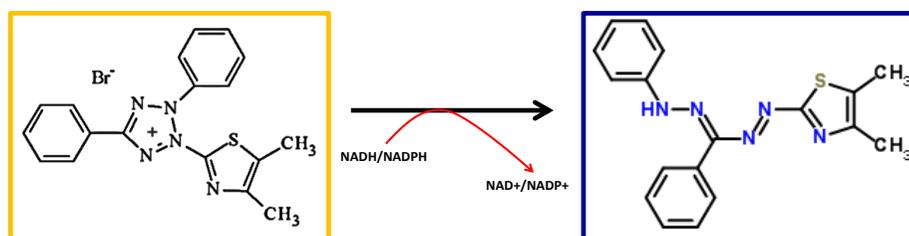


Figura 5.3. Esquema del ensayo de MTT. Reducción de metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol a formazán. La formación de los cristales de formazán puede ser evaluada por absorbancia a 562 nm tras la disolución de los cristales en DMSO.

Brevemente, tras sembrar las células en placas de 96 pocillos (Tabla 5.1), se dejaron adherir a la placa durante la noche. Posteriormente, se incubaron con los diferentes tratamientos y 4 horas antes de finalizar el tiempo de tratamiento, se añadieron 20 μl de MTT a una concentración de 5 mg/ml de PBS. Tras 4 horas de incubación a 37°C con el MTT, el medio celular fue eliminado y los cristales de formazán se solubilizaron con 100 μl de dimetilsulfoxido (DMSO). Se midió entonces la absorbancia total a 562 nm usando el espectrofluorímetro Wallac Victor 1420 (PerkinElmer). Los resultados de esta lectura se expresan como porcentaje de disfunción mitocondrial de las muestras tratadas frente a las muestras control que carecen de tratamiento.

$$\% \text{ disfunción mitocondrial: } [1 - (\text{Células tratadas} / \text{Células control}) * 100]$$

b). Ensayos de viabilidad celular por exclusión del colorante vital azul de tripán, esta técnica, permite la evaluación de la viabilidad de un cultivo celular mediante la tinción celular con azul de tripán, se basa en el hecho de que este colorante es excluido de forma activa de las células vivas, aunque es capaz de teñir las células muertas o aquellas en la que la membrana celular ha sido fragmentada.

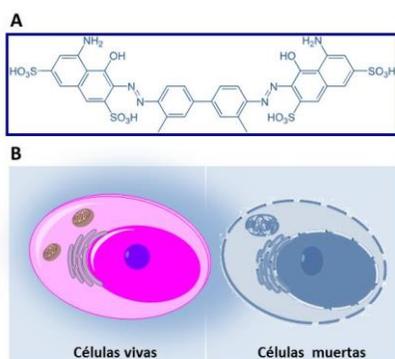


Figura 5.4. Ensayo de exclusión del colorante vital azul de tripán. A. Estructura del azul de tripán. B. Esquema de la exclusión del azul de tripan en células vivas y la tinción de las células muertas.

Para llevar a cabo este ensayo, tras los diferentes tratamientos las células fueron recolectadas mediante tratamiento con tripsina y centrifugadas a 1.300 rpm durante 5 minutos. Posteriormente el precipitado celular es resuspendido en medio completo. A continuación se separó una alícuota y se realizó una dilución de 1:2 con azul de tripán. 10 μ l de la dilución se colocaron en la cámara de Neubauer, procediendo al recuento de las células vivas (refringentes) y muertas (azules) utilizando un microscopio óptico (Fig. 5.4).

5.3.2.2.2. Detección de células apoptóticas por tinción con Anexina V/yoduro de propidio

El método de detección de células apoptóticas mediante tinción con anexina V/yoduro de propidio (AnnV/IP) se basa en la detección de la fosfatidilserina

(PS), que en células apoptóticas se transloca del interior al exterior de la membrana plasmática. La AnnV es una proteína anticoagulante vascular que posee una gran afinidad por la PS. Por ello, unida a un fluorocromo adecuado, permite la identificación de las células apoptóticas tras su unión a la PS localizada en su superficie celular. Sin embargo, la AnnV también es capaz de unirse a la PS en el interior de aquellas células que no tienen intacta su membrana plasmática, consideradas como necróticas. Por ello, junto con la AnnV, simultáneamente las células son incubadas con IP un marcador que se internaliza sólo en células muertas que poseen la membrana dañada y se intercala en su DNA emitiendo fluorescencia. Este ensayo permite distinguir entre células viables (AnnV-/IP-), en apoptosis temprana (AnnV+/IP-), en apoptosis tardía/ necrosis (AnnV+/IP+) y en necrosis (AnnV-/IP+) (Fig 5.5).

Para llevar a cabo estos ensayos las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos según se indica en la Tabla 5.1 para los distintos tipos celulares. Tras los tratamientos, que se indican en cada sección, fueron recolectadas y se procedió a su marcaje siguiendo las instrucciones del fabricante ("*Annexin V-FITC Apoptosis Detección Kit I*"). Brevemente, por cada 100.000 células se agregaron 5 µl de AnnV y 5 µl de IP en 90 µl de tampón de unión, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y se añadieron 400 µL de tampón de unión. Por último, se analizaron los resultados mediante citometría de flujo (Cytomics FC de Beckman Coulter) utilizando un láser de argón a 488 nm. La señal de la AnnV-FITC se detectó a 518 nm y la señal del IP a 620 nm. Los datos fueron analizados utilizando el programa WinMDI 2.8.

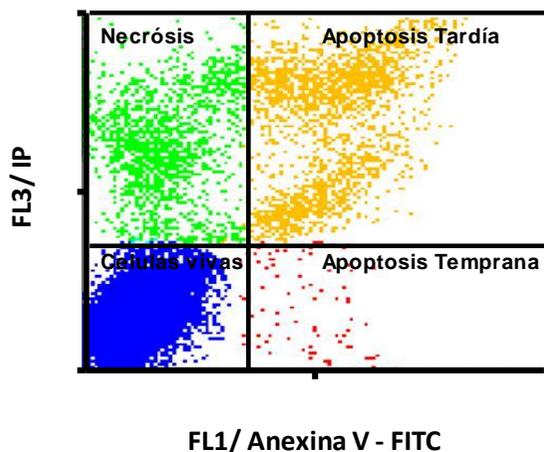


Figura 5.5. Análisis de células apoptóticas por AnnV/IP por citometría de flujo.

5.3.2.2.3. Análisis de ciclo celular

Para estudiar, dentro de una población de células, el porcentaje de ellas que se encuentra en las distintas fases del ciclo celular, las células (previamente fijadas y permeabilizadas) fueron incubadas con PI. Este agente como hemos descrito se intercala en el DNA y lo hace de forma estequiométrica emitiendo fluorescencia cuando es excitado con luz de una determinada longitud de onda. La célula incorpora una cantidad de colorante proporcional a su contenido de DNA de tal forma que, en la fase G0 y G1, la célula tiene un contenido diploide ($2n$) de DNA, correspondiente a 23 pares de cromosomas, que se observa como un primer pico; durante la fase S o de síntesis, la célula duplica su contenido en DNA convirtiéndose en tetraploide (paso de $2n$ a $4n$), esta región no muestra un pico, sino un intervalo de canales que corresponde a una cantidad de DNA variable entre $2n$ y $4n$; y en la fase G2, y al inicio de la mitosis, la célula mantiene este doble contenido de DNA hasta que se divide en dos hijas de contenido diploide. La fase G2/M muestra un pico, situado en un canal doble del correspondiente al pico G0/G1, ya que se debe a células tetraploides. La región que se encuentra en los canales más bajos del espectro, llamada subG1,

corresponde a células con el núcleo fragmentado, es decir, células que se encuentran en apoptosis (Fig. 5.6).

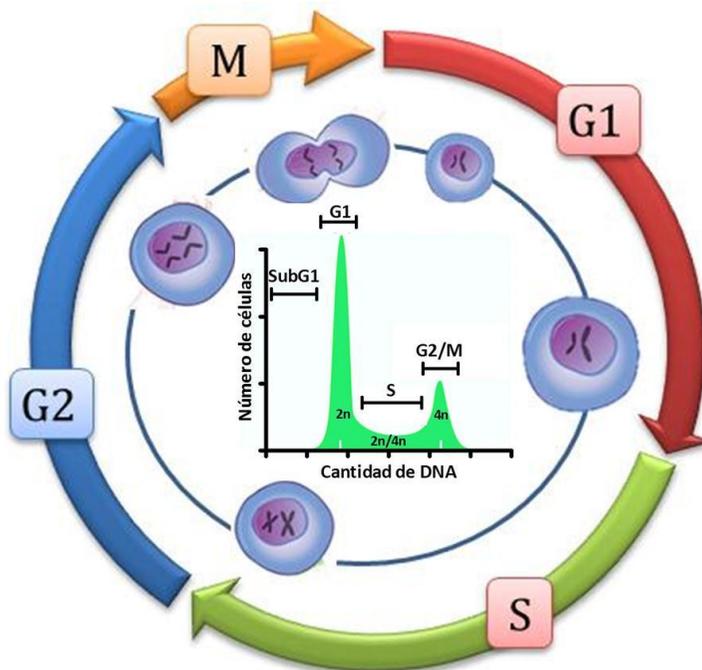


Figura 5.6. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.

Brevemente, las células se cultivaron en placas de 6 pocillos, el número de células por pocillo varió dependiendo de la línea celular según se especifica en la Tabla 5.1. Tras los tratamientos, las células se recolectaron mediante tratamiento con tripsina, se lavaron con PBS y se fijaron con 1:1 de etanol (80%):PBS durante 12 horas a -20°C . Posteriormente, el sedimento celular fue resuspendido en $300\ \mu\text{l}$ de PBS con $50\ \mu\text{g/ml}$ PI en presencia de $500\ \mu\text{g/ml}$ RNasa A. Fue incubado primero durante 30 minutos a 37°C en oscuridad y posteriormente 30 minutos a 4°C . La incorporación de IP en las células fue evaluada mediante citometría de flujo (Cytomics FC de Beckman Coulter). El IP se excita con luz de $480\ \text{nm}$ y emite fluorescencia a $620\ \text{nm}$. Los datos fueron analizados utilizando el programa WinMDI 2.8.

5.3.2.2.4. Ensayos de evaluación de liberación de citocromo c al citoplasma

El citocromo c es una proteína que se encuentra normalmente asociada a la membrana mitocondrial interna y en el espacio intermembrana mitocondrial, participando en el transporte de electrones que tiene lugar durante la respiración mitocondrial. Sin embargo, ante determinadas señales proapoptóticas, el citocromo c se libera al espacio citosólico dónde mediante su interacción con otras proteínas, desencadena el proceso de apoptosis. Por tanto, la aparición de citocromo c en el citoplasma se considera como marcador apoptótico, indicando además una implicación mitocondrial en el proceso.

La técnica que se ha utilizado para el estudio de la liberación del citocromo c al citosol se basa en la permeabilización selectiva de la membrana celular. Esta permeabilización, permite la liberación de los componentes citosólicos dejando intacta la membrana mitocondrial. Las células viables muestran tinción del citocromo c mitocondrial, mientras que las células que han iniciado el proceso de apoptosis y por tanto, han liberado citocromo c al citosol no se tiñen. Para la detección del citocromo c, se utilizó el kit *"Innocyte™ Flow Cytometric Cytochrome c Release"*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, las células se sembraron en placas de 6 pocillos según se indica en la Tabla 5.1 y fueron tratadas como se detalla en cada sección. Tras los tratamientos, se recolectaron mediante tratamiento con tripsina y después de 2 lavados con PBS, el sedimento celular fue resuspendido en solución de permeabilización durante 10 minutos en hielo. Posteriormente, fueron fijadas durante 20 minutos en 8%, de paraformaldehído en PBS y centrifugadas a 1.200 rpm durante 5 minutos. El sedimento celular fue bloqueado durante 1 hora en tampón de bloqueo (provisto por el kit) e incubado durante 1 hora con anticuerpo anticitocromo c (dilución 1:500). Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a FITC (dilución 1:300), en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, las células se resuspendieron en 350 µl de solución de lavado. La liberación de

citocromo c fue entonces evaluada mediante citometría de flujo (Cytomics FC de Beckman Coulter). Los datos fueron analizados utilizando el programa WinMDI 2.8.

5.3.2.2.5. Ensayo Actividad Caspasa -3/7

Para la determinación de la actividad caspasa -3/7 se ha utilizado un ensayo fluorométrico (Fearnhead, 2001). Las caspasas son cisteín-proteasas caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas a nivel de un residuo de aspártico. En este ensayo, la caspasa-3/7 proveniente del lisado celular hidroliza el sustrato Acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-trifluorometil-coumarina (Ac-DEVD-AFC), liberando el AFC, que es un marcador fluorogénico. La liberación de AFC en función del tiempo nos permite evaluar la actividad caspasa-3/7 en cada muestra.

Para realizar este ensayo, las células se sembraron en placas de 6 pocillos según se indica en la Tabla 5.1 y después de los correspondientes tratamientos, se resuspendieron mediante la adición de 5 mM de EDTA/PBS. El sedimento celular fue lavado con PBS frío, resuspendido con 30 μ l de tampón de extracción (50 mM PIPES pH 7.0, 50 mM KCl, 5 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$), e incubado durante 5 minutos en hielo. Este tampón hipotónico permite liberar el contenido citosólico sin romper completamente las células. Tras esta incubación se realizaron 3 rondas de congelación/descongelación en nitrógeno líquido/agua fría, con agitación en un vibromixer después de cada ronda. Tras centrifugar a 13.200 rpm durante 7 minutos a 4°C, se recogió el extracto citosólico (sobrenadante). Al sobrenadante se le cuantificó la concentración de proteína total mediante el método colorimétrico del ácido bicinónico (BCA, *Pierce BCA Protein Assay Kit*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Como proteína patrón se utilizaron concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA). En placas de 96 pocillos de fondo plano negro, se agregaron 50 μ g de proteína, completando con tampón de extracción hasta alcanzar un volumen final de 30 μ l. Se añadieron 200 μ l de 2 μ l/ml de Ac-

DEVD-AFC diluido en 10% glicerol en PBS con 2 mM de DTT. La liberación de AFC, se analizó usando el espectrofluorímetro Wallac Victor 1420; utilizando longitudes de onda de excitación/emisión de 390/510 nm, en un ensayo cinético que se evaluó durante 1 hora a 37°C.

5.3.2.3. Análisis de proteínas en extractos celulares.

5.3.2.3.1. Extractos proteicos totales

Después de los diferentes tratamientos las células, se resuspendieron mediante tratamiento con tripsina y tras centrifugar, el sedimento celular, fue lavado con PBS frío y resuspendido en solución de lisis (25 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% SDS, 10 µg/ml leupeptina, 100 µM PMSF y 10 µg/ml pepstatina A). Los extractos fueron incubados durante 10 minutos en hielo y a 95°C durante 5 minutos. Se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos para eliminar restos celulares. El sobrenadante de esta centrifugación representa el extracto proteico. La concentración de proteína total fue determinada mediante el método colorimétrico del ácido bicinónico, BCA.

5.3.2.3.2. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Los extractos proteicos obtenidos en solución de lisis (80 µg de proteína) fueron suspendidos en tampón de carga (60 mM Tris pH 6,8, 10% glicerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol y 0.1% azul de bromofenol), hervidos durante 5 minutos a 95°C, y por último fueron centrifugados a 13.000 rpm durante 1 minuto.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, 10-12%), utilizando el sistema de electroforesis vertical (Mini Protean-3, Bio-Rad Laboratories) y un tampón compuesto por 25 mM de Tris pH 8.0, 200 mM glicina y 0,1% SDS. Así mismo, se utilizó un marcador de peso molecular (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas). Una vez terminada la electroforesis, los geles se fijaron y tiñeron con azul de

Coomassie, o bien se sometieron a electrotransferencia e inmunodetección (técnica de Western blot).

5.3.2.3.3. Tinción de geles con azul de Coomassie

Los geles de poliacrilamida se tiñeron con solución de azul de Coomassie (0.1% de azul de Coomassie, 50% metanol y 10% ácido acético) durante 30 minutos en agitación, a temperatura ambiente. A continuación, se destiñeron en una solución que contenía 20% metanol, 10% ácido acético, en agitación.

5.3.2.3.4. Inmunodetección de proteínas (Western blot)

Las proteínas separadas en geles de SDS-PAGE se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Nitrocellulose Membranes, 0.45 μ m, Bio-Rad) utilizando el sistema Mini-Transblot (Bio-Rad). El tampón de transferencia estaba compuesto por 25 mM Tris pH 7.5, 192 mM glicina y 20% de metanol. A continuación, las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora con 5% de leche en TBS-T ("*Tris-Buffered Saline*" compuesto por 20 mM Tris pH 8.0, 500 mM NaCl, 0,1% Tween-20). La incubación de las membranas con el anticuerpo primario (apartado 5.3.1.6) se llevó a cabo en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche. Tras lavar las membranas 3 veces con TBS-T, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (apartado 5.3.1.7) en solución de bloqueo, durante 1 hora, a temperatura ambiente. Después de lavar 3 veces con TBS-T, el Western blot se reveló, mediante ECL según las instrucciones del fabricante (ECL Western Blotting Detection Reagents), y las membranas se expusieron a una película Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare). Se utilizaron los anticuerpos anti α -tubulina y GAPDH como control de carga.

En ocasiones, algunas membranas de los Western blots se reutilizaron para incubarlas de nuevo con un anticuerpo primario distinto al inicial, por lo que fue necesario realizar "*stripping*" de las mismas. Para ello, las membranas se incubaron en un tampón compuesto por 10 mM Tris pH 2.3, 150 mM NaCl a

temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T y se realizó el Western blot como hemos indicado anteriormente.

5.4. Tratamiento estadístico de los resultados.

Todos los valores se expresaron como medias \pm la desviación estándar de al menos, tres experimentos independientes. La significatividad se determinó mediante análisis de varianza (ANOVA, "*Analysis of variance*") de 1 vía con un test Dunnett para comparar diferentes grupos con el grupo control. Así mismo se utilizó el test de la t-Student, para comparaciones entre dos grupos de valores. En todos los casos, un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas, T. and Dutta, A. (2009). "p21 in cancer: intricate networks and multiple activities." *Nat Rev Cancer* 9(6): 400-414.
- Abukhdeir, A. M. and Park, B. H. (2008). "P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance." *Expert Rev Mol Med* 10: e19.
- Adams, P. D., Sellers, W. R., Sharma, S. K., Wu, A. D., Nalin, C. M. and Kaelin, W. G., Jr. (1996). "Identification of a cyclin-cdk2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors." *Mol Cell Biol* 16(12): 6623-6633.
- Adjei, A. A. (2006). "Novel combinations based on epidermal growth factor receptor inhibition." *Clin Cancer Res* 12(14 Pt 2): 4446s-4450s.
- Andersen, G., Busso, D., Poterszman, A., Hwang, J. R., Wurtz, J. M., Ripp, R., Thierry, J. C., Egly, J. M. and Moras, D. (1997). "The structure of cyclin H: common mode of kinase activation and specific features." *EMBO J* 16(5): 958-967.
- Aressy, B. and Ducommun, B. (2008). "Cell cycle control by the CDC25 phosphatases." *Anticancer Agents Med Chem* 8(8): 818-824.
- Arteaga, C. L. (2011). "ERBB receptors in cancer: signaling from the inside." *Breast Cancer Res* 13(2): 304.
- Atkinson, G. E., Cowan, A., McInnes, C., Zheleva, D. I., Fischer, P. M. and Chan, W. C. (2002). "Peptide inhibitors of CDK2-cyclin A that target the cyclin recruitment-site: structural variants of the C-terminal Phe." *Bioorg Med Chem Lett* 12(18): 2501-2505.
- Aydemir, A., Abbasoglu, O., Topaloglu, S., Ertoy, D., Ayhan, A., Kilinc, K., Karabulut, E. and Sayek, I. (2002). "Protective effect of roscovitine on renal ischemia-reperfusion injury." *Transplant Proc* 34(6): 2027-2028.
- Bach, S., Knockaert, M., Reinhardt, J., Lozach, O., Schmitt, S., Baratte, B., Koken, M., Coburn, S. P., Tang, L., Jiang, T., et al. (2005). "Roscovitine targets, protein kinases and pyridoxal kinase." *J Biol Chem* 280(35): 31208-31219.
- Bagshaw, S. M. (2006). "The long-term outcome after acute renal failure." *Curr Opin Crit Care* 12(6): 561-566.
- Bao, Q. and Shi, Y. (2007). "Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases." *Cell Death Differ* 14(1): 56-65.
- Barnett, C. M. (2012). "Everolimus: targeted therapy on the horizon for the treatment of breast cancer." *Pharmacotherapy* 32(4): 383-396.
- Bartek, J. and Lukas, J. (2001). "Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage." *Curr Opin Cell Biol* 13(6): 738-747.
- Bartkova, J., Lukas, J., Guldborg, P., Alsnér, J., Kirkin, A. F., Zeuthen, J. and Bartek, J. (1996). "The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis." *Cancer Res* 56(23): 5475-5483.
- Baumli, S., Lolli, G., Lowe, E. D., Troiani, S., Rusconi, L., Bullock, A. N., Debreczeni, J. E., Knapp, S. and Johnson, L. N. (2008). "The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation." *EMBO J* 27(13): 1907-1918.
- Besson, A., Assoian, R. K. and Roberts, J. M. (2004). "Regulation of the cytoskeleton: an oncogenic function for CDK inhibitors?" *Nat Rev Cancer* 4(12): 948-955.
- Besson, A., Dowdy, S. F. and Roberts, J. M. (2008). "CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond." *Dev Cell* 14(2): 159-169.
- Biankin, A. V., Kench, J. G., Morey, A. L., Lee, C. S., Biankin, S. A., Head, D. R., Hugh, T. B., Henshall, S. M. and Sutherland, R. L. (2001). "Overexpression of p21(WAF1/CIP1) is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia." *Cancer Res* 61(24): 8830-8837.
- Biju, M. P., Akai, Y., Shrimanker, N. and Haase, V. H. (2005). "Protection of HIF-1-deficient primary renal tubular epithelial cells from hypoxia-induced cell death is glucose dependent." *Am J Physiol Renal Physiol* 289(6): F1217-1226.
- Bose, P., Perkins, E. B., Honeycut, C., Wellons, M. D., Stefan, T., Jacobberger, J. W., Kontopodis, E., Beumer, J. H., Egorin, M. J., Imamura, C. K., et al. (2012). "Phase I trial of the combination of flavopiridol and imatinib mesylate in patients with Bcr-Abl(+) hematological malignancies." *Cancer Chemother Pharmacol*.

- Bouchier-Hayes, L. and Green, D. R. (2012). "Caspase-2: the orphan caspase." *Cell Death Differ* 19(1): 51-57.
- Brand, T. M., Iida, M., Li, C. and Wheeler, D. L. (2011). "The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer." *Discov Med* 12(66): 419-432.
- Brandeis, M., Rosewell, I., Carrington, M., Crompton, T., Jacobs, M. A., Kirk, J., Gannon, J. and Hunt, T. (1998). "Cyclin B2-null mice develop normally and are fertile whereas cyclin B1-null mice die in utero." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8): 4344-4349.
- Bratton, S. B. and Salvesen, G. S. (2010). "Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome." *J Cell Sci* 123(Pt 19): 3209-3214.
- Brinkkoetter, P. T., Olivier, P., Wu, J. S., Henderson, S., Krofft, R. D., Pippin, J. W., Hockenbery, D., Roberts, J. M. and Shankland, S. J. (2009a). "Cyclin 1 activates Cdk5 and regulates expression of Bcl-2 and Bcl-XL in postmitotic mouse cells." *J Clin Invest* 119(10): 3089-3101.
- Brinkkoetter, P. T., Olivier, P., Wu, J. S., Henderson, S., Krofft, R. D., Pippin, J. W., Hockenbery, D., Roberts, J. M. and Shankland, S. J. (2009b). "Cyclin 1 activates Cdk5 and regulates expression of Bcl-2 and Bcl-XL in postmitotic mouse cells." *J Clin Invest*.
- Brinkkoetter, P. T., Pippin, J. W. and Shankland, S. J. (2010). "Cyclin I-Cdk5 governs survival in post-mitotic cells." *Cell Cycle* 9(9): 1729-1731.
- Britten, C. D., Finn, R. S., Bosserman, L. D., Wong, S. G., Press, M. F., Malik, M., Lum, B. L. and Slamon, D. J. (2009). "A phase I/II trial of trastuzumab plus erlotinib in metastatic HER2-positive breast cancer: a dual ErbB targeted approach." *Clin Breast Cancer* 9(1): 16-22.
- Brown, N. R., Lowe, E. D., Petri, E., Skamnaki, V., Antrobus, R. and Johnson, L. N. (2007). "Cyclin B and cyclin A confer different substrate recognition properties on CDK2." *Cell Cycle* 6(11): 1350-1359.
- Brown, N. R., Noble, M. E., Endicott, J. A., Garman, E. F., Wakatsuki, S., Mitchell, E., Rasmussen, B., Hunt, T. and Johnson, L. N. (1995). "The crystal structure of cyclin A." *Structure* 3(11): 1235-1247.
- Brown, N. R., Noble, M. E., Endicott, J. A. and Johnson, L. N. (1999). "The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases." *Nat Cell Biol* 1(7): 438-443.
- Brunelle, J. K. and Letai, A. (2009). "Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family." *J Cell Sci* 122(Pt 4): 437-441.
- Burness, M. L., Grushko, T. A. and Olopade, O. I. (2010). "Epidermal growth factor receptor in triple-negative and basal-like breast cancer: promising clinical target or only a marker?" *Cancer J* 16(1): 23-32.
- Canela, N., Orzaez, M., Fucho, R., Mateo, F., Gutierrez, R., Pineda-Lucena, A., Bachs, O. and Perez-Paya, E. (2006). "Identification of an hexapeptide that binds to a surface pocket in cyclin A and inhibits the catalytic activity of the complex cyclin-dependent kinase 2-cyclin A." *J Biol Chem* 281(47): 35942-35953.
- Carujo, S., Estanyol, J. M., Ejarque, A., Agell, N., Bachs, O. and Pujol, M. J. (2006). "Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a SET-binding protein and regulates cyclin B-cdk1 activity." *Oncogene* 25(29): 4033-4042.
- Carvajal, R. D., Tse, A., Shah, M. A., Lefkowitz, R. A., Gonen, M., Gilman-Rosen, L., Kortmansky, J., Kelsen, D. P., Schwartz, G. K. and O'Reilly, E. M. (2009). "A phase II study of flavopiridol (Alvocidib) in combination with docetaxel in refractory, metastatic pancreatic cancer." *Pancreatology* 9(4): 404-409.
- Cella, D., Wang, M., Wagner, L. and Miller, K. (2011). "Survival-adjusted health-related quality of life (HRQL) among patients with metastatic breast cancer receiving paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone: results from Eastern Cooperative Oncology Group Study 2100 (E2100)." *Breast Cancer Res Treat* 130(3): 855-861.
- Cerqueira, A., Santamaria, D., Martinez-Pastor, B., Cuadrado, M., Fernandez-Capetillo, O. and Barbacid, M. (2009). "Overall Cdk activity modulates the DNA damage response in mammalian cells." *J Cell Biol* 187(6): 773-780.

- Coller, H. A. (2007). "What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(8): 667-670.
- Connett, R. J., Honig, C. R., Gayeski, T. E. and Brooks, G. A. (1990). "Defining hypoxia: a systems view of VO₂, glycolysis, energetics, and intracellular PO₂." *J Appl Physiol* 68(3): 833-842.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J. (2003). "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." *FASEB J* 17(10): 1195-1214.
- Coqueret, O. (2003). "New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?" *Trends Cell Biol* 13(2): 65-70.
- Costa, D. B., Halmos, B., Kumar, A., Schumer, S. T., Huberman, M. S., Boggon, T. J., Tenen, D. G. and Kobayashi, S. (2007). "BIM mediates EGFR tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in lung cancers with oncogenic EGFR mutations." *PLoS Med* 4(10): 1669-1679; discussion 1680.
- Chatterjee, S. and Banerjee, D. K. (2002). "Preparation, isolation, and characterization of liposomes containing natural and synthetic lipids." *Methods Mol Biol* 199: 3-16.
- Chen, D. J. and Huerta, S. (2009). "Smac mimetics as new cancer therapeutics." *Anticancer Drugs* 20(8): 646-658.
- Chen, Y. N., Sharma, S. K., Ramsey, T. M., Jiang, L., Martin, M. S., Baker, K., Adams, P. D., Bair, K. W. and Kaelin, W. G., Jr. (1999). "Selective killing of transformed cells by cyclin/cyclin-dependent kinase 2 antagonists." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4325-4329.
- Cheng, G., Zielonka, J., Dranka, B. P., McAllister, D., Mackinnon, A. C., Jr., Joseph, J. and Kalyanaraman, B. (2012). "Mitochondria-targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death." *Cancer Res* 72(10): 2634-2644.
- Cheung, Z. H., Fu, A. K. and Ip, N. Y. (2006). "Synaptic roles of Cdk5: implications in higher cognitive functions and neurodegenerative diseases." *Neuron* 50(1): 13-18.
- Cheung, Z. H., Gong, K. and Ip, N. Y. (2008). "Cyclin-dependent kinase 5 supports neuronal survival through phosphorylation of Bcl-2." *J Neurosci* 28(19): 4872-4877.
- Child, E. S. and Mann, D. J. (2006). "The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability." *Cell Cycle* 5(12): 1313-1319.
- Chu, D. and Lu, J. (2008). "Novel therapies in breast cancer: what is new from ASCO 2008." *J Hematol Oncol* 1: 16.
- Chu, I. M., Hengst, L. and Slingerland, J. M. (2008). "The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy." *Nat Rev Cancer* 8(4): 253-267.
- Chuang, H. C., Kapuriya, N., Kulp, S. K., Chen, C. S. and Shapiro, C. L. (2012). "Differential anti-proliferative activities of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in triple-negative breast cancer cells." *Breast Cancer Res Treat.*
- Darding, M. and Meier, P. (2012). "IAPs: guardians of RIPK1." *Cell Death Differ* 19(1): 58-66.
- Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Ferri, K. F., Irinopoulou, T., Larochette, N., Prevost, M. C., Leber, B., Andrews, D., Penninger, J. and Kroemer, G. (2000). "Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis." *FASEB J* 14(5): 729-739.
- Day, P. J., Cleasby, A., Tickle, I. J., O'Reilly, M., Coyle, J. E., Holding, F. P., McMenamin, R. L., Yon, J., Chopra, R., Lengauer, C. and Jhoti, H. (2009). "Crystal structure of human CDK4 in complex with a D-type cyclin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(11): 4166-4170.
- Degterev, A., Hitomi, J., Gemscheid, M., Ch'en, I. L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G. D., Yuan, C., Wagner, G., et al. (2008). "Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins." *Nat Chem Biol* 4(5): 313-321.
- Delbridge, M. S., Shrestha, B. M., Raftery, A. T., El Nahas, A. M. and Haylor, J. L. (2007). "Reduction of ischemia-reperfusion injury in the rat kidney by FTY720, a synthetic derivative of sphingosine." *Transplantation* 84(2): 187-195.
- Denizot, F. and Lang, R. (1986). "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability." *J Immunol Methods* 89(2): 271-277.
- Dhariwala, F. A. and Rajadhyaksha, M. S. (2008). "An unusual member of the Cdk family: Cdk5." *Cell Mol Neurobiol* 28(3): 351-369.

- Dickens, L. S., Powley, I. R., Hughes, M. A. and Macfarlane, M. (2012). "The 'complexities' of life and death: Death receptor signalling platforms." *Exp Cell Res* 318(11): 1269-1277.
- Dickson, M. A., Rathkopf, D. E., Carvajal, R. D., Grant, S., Roberts, J. D., Reid, J. M., Ames, M. M., McGovern, R. M., Lefkowitz, R. A., Gonen, M., *et al.* (2011). "A phase I pharmacokinetic study of pulse-dose vorinostat with flavopiridol in solid tumors." *Invest New Drugs* 29(5): 1004-1012.
- Dickson, M. A. and Schwartz, G. K. (2009). "Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy." *Curr Oncol* 16(2): 36-43.
- Diehl, J. A. (2002). "Cycling to cancer with cyclin D1." *Cancer Biol Ther* 1(3): 226-231.
- Douarre, C., Gomez, D., Morjani, H., Zahm, J. M., O'Donohue M, F., Eddabra, L., Mailliet, P., Riou, J. F. and Trentesaux, C. (2005). "Overexpression of Bcl-2 is associated with apoptotic resistance to the G-quadruplex ligand 12459 but is not sufficient to confer resistance to long-term senescence." *Nucleic Acids Res* 33(7): 2192-2203.
- Echalier, A., Endicott, J. A. and Noble, M. E. (2010). "Recent developments in cyclin-dependent kinase biochemical and structural studies." *Biochim Biophys Acta* 1804(3): 511-519.
- Edinger, A. L. and Thompson, C. B. (2004). "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy." *Curr Opin Cell Biol* 16(6): 663-669.
- Ekstrand, A. J., Longo, N., Hamid, M. L., Olson, J. J., Liu, L., Collins, V. P. and James, C. D. (1994). "Functional characterization of an EGF receptor with a truncated extracellular domain expressed in glioblastomas with EGFR gene amplification." *Oncogene* 9(8): 2313-2320.
- Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., Lindeman, N., Gale, C. M., Zhao, X., Christensen, J., *et al.* (2007). "MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling." *Science* 316(5827): 1039-1043.
- Fan, Z., Lu, Y., Wu, X. and Mendelsohn, J. (1994). "Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells." *J Biol Chem* 269(44): 27595-27602.
- Fearnhead, H. O. (2001). "Cell-free systems to study apoptosis." *Methods Cell Biol* 66: 167-185.
- Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D. P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Hacker, G. and Leverkus, M. (2011). "cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms." *Mol Cell* 43(3): 449-463.
- Fiers, W., Beyaert, R., Boone, E., Cornelis, S., Declercq, W., Decoster, E., Denecker, G., Depuydt, B., De Valck, D., De Wilde, G., *et al.* (1995). "TNF-induced intracellular signaling leading to gene induction or to cytotoxicity by necrosis or by apoptosis." *J Inflamm* 47(1-2): 67-75.
- Flaherty, K. T., Lorusso, P. M., Demichele, A., Abramson, V. G., Courtney, R., Randolph, S. S., Shaik, M. N., Wilner, K. D., O'Dwyer, P. J. and Schwartz, G. K. (2012). "Phase I, dose-escalation trial of the oral cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor PD 0332991, administered using a 21-day schedule in patients with advanced cancer." *Clin Cancer Res* 18(2): 568-576.
- Fleming, I. N., Hogben, M., Frame, S., McClue, S. J. and Green, S. R. (2008). "Synergistic inhibition of ErbB signaling by combined treatment with seliciclib and ErbB-targeting agents." *Clin Cancer Res* 14(13): 4326-4335.
- Fu, H., Zhang, X. L., Xiao, Y., Liu, X. J., Long, C. and Hu, Y. D. (2012). "[Evaluation of gefitinib plus radiotherapy in non-small-cell lung cancer patients with brain metastases]." *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 92(8): 524-527.
- Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G. S. (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." *Biochem J* 384(Pt 2): 201-232.
- Fujita, N., Sato, S. and Tsuruo, T. (2003). "Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization." *J Biol Chem* 278(49): 49254-49260.
- Gallant, P. and Nigg, E. A. (1994). "Identification of a novel vertebrate cyclin: cyclin B3 shares properties with both A- and B-type cyclins." *EMBO J* 13(3): 595-605.
- Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Blagosklonny, M. V., Blomgren, K., Borner, C., *et al.* (2009a). "Guidelines for the use

- and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes." *Cell Death Differ* 16(8): 1093-1107.
- Galluzzi, L., Kepp, O. and Kroemer, G. (2009b). "RIP kinases initiate programmed necrosis." *J Mol Cell Biol* 1(1): 8-10.
- Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Buettner, S., Eisenberg, T., Vandenabeele, P., Madoe, F. and Kroemer, G. (2011). "Programmed necrosis from molecules to health and disease." *Int Rev Cell Mol Biol* 289: 1-35.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., *et al.* (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." *Cell Death Differ* 19(1): 107-120.
- Gao, H., Ouyang, X., Banach-Petrosky, W., Borowsky, A. D., Lin, Y., Kim, M., Lee, H., Shih, W. J., Cardiff, R. D., Shen, M. M. and Abate-Shen, C. (2004). "A critical role for p27kip1 gene dosage in a mouse model of prostate carcinogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(49): 17204-17209.
- Geley, S., Kramer, E., Gieffers, C., Gannon, J., Peters, J. M. and Hunt, T. (2001). "Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint." *J Cell Biol* 153(1): 137-148.
- Gerber, D. E. (2008). "EGFR Inhibition in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer." *Drug Dev Res* 69(6): 359-372.
- Giam, M., Huang, D. C. and Bouillet, P. (2008). "BH3-only proteins and their roles in programmed cell death." *Oncogene* 27 Suppl 1: S128-136.
- Giammarioli, A. M., Gambardella, L., Barbati, C., Pietraforte, D., Tinari, A., Alberton, M., Gnessi, L., Griffin, R. J., Minetti, M. and Malorni, W. (2012). "Differential effects of the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose on the activity of pro-apoptotic agents in metastatic melanoma cells, and induction of a cytoprotective autophagic response." *Int J Cancer* 131(4): E337-347.
- Galias, C. H., Charalabopoulos, A. and Charalabopoulos, K. (2004). "Cell proliferation and cell cycle control: a mini review." *Int J Clin Pract* 58(12): 1134-1141.
- Gondeau, C., Gerbal-Chaloin, S., Bello, P., Aldrian-Herrada, G., Morris, M. C. and Divita, G. (2005). "Design of a novel class of peptide inhibitors of cyclin-dependent kinase/cyclin activation." *J Biol Chem* 280(14): 13793-13800.
- Gong, X., Tang, X., Wiedmann, M., Wang, X., Peng, J., Zheng, D., Blair, L. A., Marshall, J. and Mao, Z. (2003). "Cdk5-mediated inhibition of the protective effects of transcription factor MEF2 in neurotoxicity-induced apoptosis." *Neuron* 38(1): 33-46.
- Grant, S. and Roberts, J. D. (2003). "The use of cyclin-dependent kinase inhibitors alone or in combination with established cytotoxic drugs in cancer chemotherapy." *Drug Resist Updat* 6(1): 15-26.
- Green, D. R. and Evan, G. I. (2002). "A matter of life and death." *Cancer Cell* 1(1): 19-30.
- Griffin, S. V., Olivier, J. P., Pippin, J. W., Roberts, J. M. and Shankland, S. J. (2006). "Cyclin I protects podocytes from apoptosis." *J Biol Chem* 281(38): 28048-28057.
- Guo, C., Liu, S. and Sun, M. Z. (2012). "Novel insight into the role of GAPDH playing in tumor." *Clin Transl Oncol*.
- Hanada, N., Lo, H. W., Day, C. P., Pan, Y., Nakajima, Y. and Hung, M. C. (2006). "Co-regulation of B-Myb expression by E2F1 and EGF receptor." *Mol Carcinog* 45(1): 10-17.
- Hara, M. R., Thomas, B., Cascio, M. B., Bae, B. I., Hester, L. D., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Sawa, A. and Snyder, S. H. (2006). "Neuroprotection by pharmacologic blockade of the GAPDH death cascade." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10): 3887-3889.
- Hartwell, L. H. and Kastan, M. B. (1994). "Cell cycle control and cancer." *Science* 266(5192): 1821-1828.
- Heitz, F., Morris, M. C., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Doree, M. and Divita, G. (1997). "Interactions of cyclins with cyclin-dependent kinases: a common interactive mechanism." *Biochemistry* 36(16): 4995-5003.

- Hellmich, M. R., Pant, H. C., Wada, E. and Battey, J. F. (1992). "Neuronal cdc2-like kinase: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22): 10867-10871.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* 407(6805): 770-776.
- Hidalgo, M., Siu, L. L., Nemunaitis, J., Rizzo, J., Hammond, L. A., Takimoto, C., Eckhardt, S. G., Tolcher, A., Britten, C. D., Denis, L., *et al.* (2001). "Phase I and pharmacologic study of OSI-774, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid malignancies." *J Clin Oncol* 19(13): 3267-3279.
- Hilton, G. D., Stoica, B. A., Byrnes, K. R. and Faden, A. I. (2008). "Roscovitine reduces neuronal loss, glial activation, and neurologic deficits after brain trauma." *J Cereb Blood Flow Metab* 28(11): 1845-1859.
- Hirao, A., Kong, Y. Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S. J. and Mak, T. W. (2000). "DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2." *Science* 287(5459): 1824-1827.
- Hirasawa, M., Ohshima, T., Takahashi, S., Longenecker, G., Honjo, Y., Veeranna, Pant, H. C., Mikoshiba, K., Brady, R. O. and Kulkarni, A. B. (2004). "Perinatal abrogation of Cdk5 expression in brain results in neuronal migration defects." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(16): 6249-6254.
- Hisanaga, S. and Endo, R. (2010). "Regulation and role of cyclin-dependent kinase activity in neuronal survival and death." *J Neurochem* 115(6): 1309-1321.
- Hisanaga, S., Ishiguro, K., Uchida, T., Okumura, E., Okano, T. and Kishimoto, T. (1993). "Tau protein kinase II has a similar characteristic to cdc2 kinase for phosphorylating neurofilament proteins." *J Biol Chem* 268(20): 15056-15060.
- Hitomi, J., Christofferson, D. E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R. J. and Yuan, J. (2008). "Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway." *Cell* 135(7): 1311-1323.
- Honda, R., Lowe, E. D., Dubinina, E., Skamnaki, V., Cook, A., Brown, N. R. and Johnson, L. N. (2005). "The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles." *EMBO J* 24(3): 452-463.
- Hotter, G., Palacios, L. and Sola, A. (2004). "Low O2 and high CO2 in LLC-PK1 cells culture mimics renal ischemia-induced apoptosis." *Lab Invest* 84(2): 213-220.
- Hsieh, W. S., Soo, R., Peh, B. K., Loh, T., Dong, D., Soh, D., Wong, L. S., Green, S., Chiao, J., Cui, C. Y., *et al.* (2009). "Pharmacodynamic effects of seliciclib, an orally administered cell cycle modulator, in undifferentiated nasopharyngeal cancer." *Clin Cancer Res* 15(4): 1435-1442.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R. and Dixit, V. M. (1997). "I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis." *J Biol Chem* 272(28): 17255-17257.
- Huang, W. C., Chen, Y. J., Li, L. Y., Wei, Y. L., Hsu, S. C., Tsai, S. L., Chiu, P. C., Huang, W. P., Wang, Y. N., Chen, C. H., *et al.* (2011). "Nuclear translocation of epidermal growth factor receptor by Akt-dependent phosphorylation enhances breast cancer-resistant protein expression in gefitinib-resistant cells." *J Biol Chem* 286(23): 20558-20568.
- Hung, L. Y., Tseng, J. T., Lee, Y. C., Xia, W., Wang, Y. N., Wu, M. L., Chuang, Y. H., Lai, C. H. and Chang, W. C. (2008). "Nuclear epidermal growth factor receptor (EGFR) interacts with signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in activating Aurora-A gene expression." *Nucleic Acids Res* 36(13): 4337-4351.
- Hunt, T. (1991). "Cell biology. Cell cycle gets more cyclins." *Nature* 350(6318): 462-463.
- Hunter, A. M., LaCasse, E. C. and Korneluk, R. G. (2007). "The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets." *Apoptosis* 12(9): 1543-1568.
- Huwe, A., Mazitschek, R. and Giannis, A. (2003). "Small molecules as inhibitors of cyclin-dependent kinases." *Angew Chem Int Ed Engl* 42(19): 2122-2138.
- Ishida, N., Hara, T., Kamura, T., Yoshida, M., Nakayama, K. and Nakayama, K. I. (2002). "Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export." *J Biol Chem* 277(17): 14355-14358.

- Ishitani, R., Tanaka, M., Sunaga, K., Katsube, N. and Chuang, D. M. (1998). "Nuclear localization of overexpressed glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured cerebellar neurons undergoing apoptosis." *Molecular pharmacology* 53(4): 701-707.
- Iyirhiaro, G. O., Brust, T. B., Rashidian, J., Galehdar, Z., Osman, A., Phillips, M., Slack, R. S., Macvicar, B. A. and Park, D. S. (2008). "Delayed combinatorial treatment with flavopiridol and minocycline provides longer term protection for neuronal soma but not dendrites following global ischemia." *J Neurochem* 105(3): 703-713.
- Jaganathan, S., Yue, P., Paladino, D. C., Bogdanovic, J., Huo, Q. and Turkson, J. (2011). "A functional nuclear epidermal growth factor receptor, SRC and Stat3 heteromeric complex in pancreatic cancer cells." *PLoS One* 6(5): e19605.
- Janicke, R. U. (2009). "MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3." *Breast Cancer Res Treat* 117(1): 219-221.
- Janssens, S. and Tinel, A. (2012). "The PIDDosome, DNA-damage-induced apoptosis and beyond." *Cell Death Differ* 19(1): 13-20.
- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J. and Pavletich, N. P. (1995). "Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex." *Nature* 376(6538): 313-320.
- Jeffrey, P. D., Tong, L. and Pavletich, N. P. (2000). "Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors." *Genes Dev* 14(24): 3115-3125.
- Johnson, B. A. and Weil, M. H. (1991). "Redefining ischemia due to circulatory failure as dual defects of oxygen deficits and of carbon dioxide excesses." *Crit Care Med* 19(11): 1432-1438.
- Johnson, D. G. and Walker, C. L. (1999). "Cyclins and cell cycle checkpoints." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 295-312.
- Johnson, L. N., De Moliner, E., Brown, N. R., Song, H., Barford, D., Endicott, J. A. and Noble, M. E. (2002). "Structural studies with inhibitors of the cell cycle regulatory kinase cyclin-dependent protein kinase 2." *Pharmacol Ther* 93(2-3): 113-124.
- Kaldis, P. (1999). "The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals." *Cell Mol Life Sci* 55(2): 284-296.
- Kim, D., Frank, C. L., Dobbin, M. M., Tsunemoto, R. K., Tu, W., Peng, P. L., Guan, J. S., Lee, B. H., Moy, L. Y., Giusti, P., et al. (2008). "Deregulation of HDAC1 by p25/Cdk5 in neurotoxicity." *Neuron* 60(5): 803-817.
- Kim, E. H., Kim, S. U., Shin, D. Y. and Choi, K. S. (2004). "Roscovitine sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by downregulation of survivin and XIAP." *Oncogene* 23(2): 446-456.
- Kim, J. W., Choi, E. J. and Joe, C. O. (2000). "Activation of death-inducing signaling complex (DISC) by pro-apoptotic C-terminal fragment of RIP." *Oncogene* 19(39): 4491-4499.
- Kim, R., Emi, M. and Tanabe, K. (2005). "Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage (Review)." *Oncol Rep* 14(3): 595-599.
- Kirkland, L. O. and McInnes, C. (2009). "Non-ATP competitive protein kinase inhibitors as anti-tumor therapeutics." *Biochem Pharmacol* 77(10): 1561-1571.
- Ko, J., Humbert, S., Bronson, R. T., Takahashi, S., Kulkarni, A. B., Li, E. and Tsai, L. H. (2001). "p35 and p39 are essential for cyclin-dependent kinase 5 function during neurodevelopment." *J Neurosci* 21(17): 6758-6771.
- Kontopidis, G., Wu, S. Y., Zheleva, D. I., Taylor, P., McInnes, C., Lane, D. P., Fischer, P. M. and Walkinshaw, M. D. (2005). "Structural and biochemical studies of human proliferating cell nuclear antigen complexes provide a rationale for cyclin association and inhibitor design." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(6): 1871-1876.
- Kosieradzki, M. and Rowinski, W. (2008). "Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention." *Transplant Proc* 40(10): 3279-3288.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P. H. and Kirchhoff, S. (2001). "Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex." *J Biol Chem* 276(23): 20633-20640.

- Kryston, T. B., Georgiev, A. B., Pissis, P. and Georgakilas, A. G. (2011). "Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis." *Mutat Res* 711(1-2): 193-201.
- Kumar, S. (2007). "Caspase function in programmed cell death." *Cell Death Differ* 14(1): 32-43.
- Kumar, S. (2009). "Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more?" *Nat Rev Cancer* 9(12): 897-903.
- Kundu, S. K. and Nestor, M. (2012). "Targeted therapy in head and neck cancer." *Tumour Biol* 33(3): 707-721.
- Kweon, M. H., Adhami, V. M., Lee, J. S. and Mukhtar, H. (2006). "Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate." *J Biol Chem* 281(44): 33761-33772.
- LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Plenchette, S., Baird, S. and Korneluk, R. G. (2008). "IAP-targeted therapies for cancer." *Oncogene* 27(48): 6252-6275.
- Lalioi, V., Muruais, G., Dinarina, A., van Damme, J., Vandekerckhove, J. and Sandoval, I. V. (2009). "The atypical kinase Cdk5 is activated by insulin, regulates the association between GLUT4 and E-Syt1, and modulates glucose transport in 3T3-L1 adipocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(11): 4249-4253.
- Lammerts van Bueren, J. J., Bleeker, W. K., Bogh, H. O., Houtkamp, M., Schuurman, J., van de Winkel, J. G. and Parren, P. W. (2006). "Effect of target dynamics on pharmacokinetics of a novel therapeutic antibody against the epidermal growth factor receptor: implications for the mechanisms of action." *Cancer Res* 66(15): 7630-7638.
- Landberg, G., Nilsson, K., Jirstrom, K., Ryden, L., Kitching, R., Burger, A. M. and Seth, A. (2005). "Cyclin I is expressed in human breast cancer and closely associated with VEGF and KDR expression." *Breast Cancer Res Treat* 89(3): 313-316.
- Le Tourneau, C., Faivre, S., Laurence, V., Delbaldo, C., Vera, K., Girre, V., Chiao, J., Armour, S., Frame, S., Green, S. R., et al. (2010). "Phase I evaluation of seliciclib (R-roscovitine), a novel oral cyclin-dependent kinase inhibitor, in patients with advanced malignancies." *Eur J Cancer* 46(18): 3243-3250.
- Lee, M. J., Ye, A. S., Gardino, A. K., Heijink, A. M., Sorger, P. K., Macbeath, G. and Yaffe, M. B. (2012). "Sequential application of anticancer drugs enhances cell death by rewiring apoptotic signaling networks." *Cell* 149(4): 780-794.
- Legrand, M., Mik, E. G., Johannes, T., Payen, D. and Ince, C. (2008). "Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney." *Mol Med* 14(7-8): 502-516.
- Leitch, A. E., Haslett, C. and Rossi, A. G. (2009). "Cyclin-dependent kinase inhibitor drugs as potential novel anti-inflammatory and pro-resolution agents." *Br J Pharmacol* 158(4): 1004-1016.
- Lemmon, M. A. (2009). "Ligand-induced ErbB receptor dimerization." *Exp Cell Res* 315(4): 638-648.
- Leong, C. L., Anderson, W. P., O'Connor, P. M. and Evans, R. G. (2007). "Evidence that renal arterial-venous oxygen shunting contributes to dynamic regulation of renal oxygenation." *Am J Physiol Renal Physiol* 292(6): F1726-1733.
- Lew, J., Beaudette, K., Litwin, C. M. and Wang, J. H. (1992). "Purification and characterization of a novel proline-directed protein kinase from bovine brain." *J Biol Chem* 267(19): 13383-13390.
- Li, B. S., Zhang, L., Takahashi, S., Ma, W., Jaffe, H., Kulkarni, A. B. and Pant, H. C. (2002). "Cyclin-dependent kinase 5 prevents neuronal apoptosis by negative regulation of c-Jun N-terminal kinase 3." *EMBO J* 21(3): 324-333.
- Li, J., Zhao, M., He, P., Hidalgo, M. and Baker, S. D. (2007). "Differential metabolism of gefitinib and erlotinib by human cytochrome P450 enzymes." *Clin Cancer Res* 13(12): 3731-3737.
- Lin, S. Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K. Y., Bourguignon, L. and Hung, M. C. (2001). "Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor." *Nat Cell Biol* 3(9): 802-808.
- Lindon, C. and Pines, J. (2004). "Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells." *J Cell Biol* 164(2): 233-241.

- Linkermann, A., Brasen, J. H., De Zen, F., Weinlich, R., Schwendener, R. A., Green, D. R., Kunzendorf, U. and Krautwald, S. (2012). "Dichotomy between RIP1- and RIP3-mediated necroptosis in tumor necrosis factor- α -induced shock." *Mol Med* 18(1): 577-586.
- Liu, D., Matzuk, M. M., Sung, W. K., Guo, Q., Wang, P. and Wolgemuth, D. J. (1998). "Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse." *Nat Genet* 20(4): 377-380.
- Liu, X., Kantarjian, H. and Plunkett, W. (2012). "Sapacitabine for cancer." *Expert Opin Investig Drugs* 21(4): 541-555.
- Lo, H. W. (2010). "Nuclear mode of the EGFR signaling network: biology, prognostic value, and therapeutic implications." *Discov Med* 10(50): 44-51.
- Lo, H. W., Cao, X., Zhu, H. and Ali-Osman, F. (2010). "Cyclooxygenase-2 is a novel transcriptional target of the nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 signaling axes." *Mol Cancer Res* 8(2): 232-245.
- Lo, H. W., Xia, W., Wei, Y., Ali-Seyed, M., Huang, S. F. and Hung, M. C. (2005). "Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer." *Cancer Res* 65(1): 338-348.
- Lockshin, R. A. and Zakeri, Z. (2001). "Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(7): 545-550.
- Lockshin, R. A. and Zakeri, Z. (2007). "Cell death in health and disease." *J Cell Mol Med* 11(6): 1214-1224.
- Lolli, G., Lowe, E. D., Brown, N. R. and Johnson, L. N. (2004). "The crystal structure of human CDK7 and its protein recognition properties." *Structure* 12(11): 2067-2079.
- Louis-Jeune, C., Andrade-Navarro, M. A. and Perez-Iratxeta, C. (2011). "Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra." *Proteins*.
- Lowe, E. D., Tews, I., Cheng, K. Y., Brown, N. R., Gul, S., Noble, M. E., Gamblin, S. J. and Johnson, L. N. (2002). "Specificity determinants of recruitment peptides bound to phospho-CDK2/cyclin A." *Biochemistry* 41(52): 15625-15634.
- Lu, W., Chen, L., Peng, Y. and Chen, J. (2001). "Activation of p53 by roscovitine-mediated suppression of MDM2 expression." *Oncogene* 20(25): 3206-3216.
- Mace, P. D., Shirley, S. and Day, C. L. (2010). "Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins." *Cell Death Differ* 17(1): 46-53.
- Mahaffey, C. M., Davies, A. M., Lara, P. N., Jr., Pryde, B., Holland, W., Mack, P. C., Gumerlock, P. H. and Gandara, D. R. (2007). "Schedule-dependent apoptosis in K-ras mutant non-small-cell lung cancer cell lines treated with docetaxel and erlotinib: rationale for pharmacodynamic separation." *Clin Lung Cancer* 8(9): 548-553.
- Malumbres, M. (2005). "Revisiting the "Cdk-centric" view of the mammalian cell cycle." *Cell Cycle* 4(2): 206-210.
- Malumbres, M. (2011). "Physiological relevance of cell cycle kinases." *Physiol Rev* 91(3): 973-1007.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2005). "Mammalian cyclin-dependent kinases." *Trends Biochem Sci* 30(11): 630-641.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." *Nat Rev Cancer* 9(3): 153-166.
- Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J. M., Manning, G., Morgan, D. O., Tsai, L. H. and Wolgemuth, D. J. (2009). "Cyclin-dependent kinases: a family portrait." *Nat Cell Biol* 11(11): 1275-1276.
- Martinou, J. C. and Youle, R. J. (2011). "Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics." *Dev Cell* 21(1): 92-101.
- McClue, S. J., Blake, D., Clarke, R., Cowan, A., Cummings, L., Fischer, P. M., MacKenzie, M., Melville, J., Stewart, K., Wang, S., *et al.* (2002). "In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine)." *Int J Cancer* 102(5): 463-468.

- McInnes, C., Andrews, M. J., Zheleva, D. I., Lane, D. P. and Fischer, P. M. (2003). "Peptidomimetic design of CDK inhibitors targeting the recruitment site of the cyclin subunit." *Curr Med Chem Anticancer Agents* 3(1): 57-69.
- Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J. P., Blow, J. J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J. G. and Moulinoux, J. P. (1997). "Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5." *Eur J Biochem* 243(1-2): 527-536.
- Meijer, L. and Raymond, E. (2003). "Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials." *Acc Chem Res* 36(6): 417-425.
- Meng, S., Zhou, Z., Chen, F., Kong, X., Liu, H., Jiang, K., Liu, W., Hu, M., Zhang, X., Ding, C. and Wu, Y. (2012). "Newcastle disease virus induces apoptosis in cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma A549 cells in vitro and in vivo." *Cancer Lett* 317(1): 56-64.
- Menn, B., Bach, S., Blevins, T. L., Campbell, M., Meijer, L. and Timsit, S. (2010). "Delayed treatment with systemic (S)-roscovitine provides neuroprotection and inhibits in vivo CDK5 activity increase in animal stroke models." *PLoS One* 5(8): e12117.
- Meyerson, M., Enders, G. H., Wu, C. L., Su, L. K., Gorke, C., Nelson, C., Harlow, E. and Tsai, L. H. (1992). "A family of human cdc2-related protein kinases." *EMBO J* 11(8): 2909-2917.
- Micheau, O. and Tschopp, J. (2003). "Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes." *Cell* 114(2): 181-190.
- Michelakis, E. D., Webster, L. and Mackey, J. R. (2008). "Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer." *Br J Cancer* 99(7): 989-994.
- Miller, V. A., Hirsh, V., Cadranet, J., Chen, Y. M., Park, K., Kim, S. W., Zhou, C., Su, W. C., Wang, M., Sun, Y., et al. (2012). "Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial." *Lancet Oncol*.
- Montagut, C., Dalmases, A., Bellosillo, B., Crespo, M., Pairet, S., Iglesias, M., Salido, M., Gallen, M., Marsters, S., Tsai, S. P., et al. (2012). "Identification of a mutation in the extracellular domain of the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer." *Nat Med* 18(2): 221-223.
- Morris, M. C., Gondeau, C., Tainer, J. A. and Divita, G. (2002). "Kinetic mechanism of activation of the Cdk2/cyclin A complex. Key role of the C-lobe of the Cdk." *J Biol Chem* 277(26): 23847-23853.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Muller-Tidow, C., Ji, P., Diederichs, S., Potratz, J., Baumer, N., Kohler, G., Cauvet, T., Choudary, C., van der Meer, T., Chan, W. Y., et al. (2004). "The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair." *Mol Cell Biol* 24(20): 8917-8928.
- Murphy, M., Stinnakre, M. G., Senamaud-Beaufort, C., Winston, N. J., Sweeney, C., Kubelka, M., Carrington, M., Brechot, C. and Sobczak-Thépot, J. (1997). "Delayed early embryonic lethality following disruption of the murine cyclin A2 gene." *Nat Genet* 15(1): 83-86.
- Murray, A. W. (2004). "Recycling the cell cycle: cyclins revisited." *Cell* 116(2): 221-234.
- Musacchio, A. and Salmon, E. D. (2007). "The spindle-assembly checkpoint in space and time." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5): 379-393.
- Nakamura, T., Sanokawa, R., Sasaki, Y. F., Ayusawa, D., Oishi, M. and Mori, N. (1995). "Cyclin I: a new cyclin encoded by a gene isolated from human brain." *Exp Cell Res* 221(2): 534-542.
- Nguyen, K. S., Kobayashi, S. and Costa, D. B. (2009). "Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway." *Clin Lung Cancer* 10(4): 281-289.
- Nguyen, L. T., Atobe, K., Barichello, J. M., Ishida, T. and Kiwada, H. (2007). "Complex formation with plasmid DNA increases the cytotoxicity of cationic liposomes." *Biol Pharm Bull* 30(4): 751-757.
- Nguyen, T. B., Manova, K., Capodici, P., Lindon, C., Bottega, S., Wang, X. Y., Refik-Rogers, J., Pines, J., Wolgemuth, D. J. and Koff, A. (2002). "Characterization and expression of mammalian cyclin b3, a prepachytene meiotic cyclin." *J Biol Chem* 277(44): 41960-41969.

- Niida, H. and Nakanishi, M. (2006). "DNA damage checkpoints in mammals." *Mutagenesis* 21(1): 3-9.
- Noble, M. E., Endicott, J. A., Brown, N. R. and Johnson, L. N. (1997). "The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control." *Trends Biochem Sci* 22(12): 482-487.
- Nurse, P. (2000). "A long twentieth century of the cell cycle and beyond." *Cell* 100(1): 71-78.
- Oliver, T. G., Meylan, E., Chang, G. P., Xue, W., Burke, J. R., Humpton, T. J., Hubbard, D., Bhutkar, A. and Jacks, T. (2011). "Caspase-2-mediated cleavage of Mdm2 creates a p53-induced positive feedback loop." *Mol Cell* 43(1): 57-71.
- Ortiz-Ferron, G., Yerbes, R., Eramo, A., Lopez-Perez, A. I., De Maria, R. and Lopez-Rivas, A. (2008). "Roscovitine sensitizes breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis through a pleiotropic mechanism." *Cell Res* 18(6): 664-676.
- Orzaez, M., Gortat, A., Mondragon, L., Bachs, O. and Perez-Paya, E. (2009). "ATP-noncompetitive inhibitors of CDK-cyclin complexes." *ChemMedChem* 4(1): 19-24.
- Osuga, H., Osuga, S., Wang, F., Fetni, R., Hogan, M. J., Slack, R. S., Hakim, A. M., Ikeda, J. E. and Park, D. S. (2000). "Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for stroke." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(18): 10254-10259.
- Pao, W., Miller, V. A., Politi, K. A., Riely, G. J., Somwar, R., Zakowski, M. F., Kris, M. G. and Varmus, H. (2005). "Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain." *PLoS Med* 2(3): e73.
- Paoletti, P., Vila, I., Rife, M., Lizcano, J. M., Alberch, J. and Gines, S. (2008). "Dopaminergic and glutamatergic signaling crosstalk in Huntington's disease neurodegeneration: the role of p25/cyclin-dependent kinase 5." *J Neurosci* 28(40): 10090-10101.
- Papandreou, I., Goliasova, T. and Denko, N. C. (2011). "Anticancer drugs that target metabolism: Is dichloroacetate the new paradigm?" *Int J Cancer* 128(5): 1001-1008.
- Park, H. H. and Wu, H. (2006). "Crystal structure of RAIDD death domain implicates potential mechanism of PIDDosome assembly." *J Mol Biol* 357(2): 358-364.
- Pelicano, H., Martin, D. S., Xu, R. H. and Huang, P. (2006). "Glycolysis inhibition for anticancer treatment." *Oncogene* 25(34): 4633-4646.
- Petrini, J. H. and Stracker, T. H. (2003). "The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators." *Trends Cell Biol* 13(9): 458-462.
- Qu, D., Rashidian, J., Mount, M. P., Aleyasin, H., Parsanejad, M., Lira, A., Haque, E., Zhang, Y., Callaghan, S., Daigle, M., et al. (2007). "Role of Cdk5-mediated phosphorylation of Prx2 in MPTP toxicity and Parkinson's disease." *Neuron* 55(1): 37-52.
- Rashidian, J., Iyirhiaro, G., Aleyasin, H., Rios, M., Vincent, I., Callaghan, S., Bland, R. J., Slack, R. S., During, M. J. and Park, D. S. (2005). "Multiple cyclin-dependent kinases signals are critical mediators of ischemia/hypoxic neuronal death in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(39): 14080-14085.
- Rashidian, J., Rousseaux, M. W., Venderova, K., Qu, D., Callaghan, S. M., Phillips, M., Bland, R. J., During, M. J., Mao, Z., Slack, R. S. and Park, D. S. (2009). "Essential role of cytoplasmic cdk5 and Prx2 in multiple ischemic injury models, in vivo." *J Neurosci* 29(40): 12497-12505.
- Rasper, D. M., Vaillancourt, J. P., Hadano, S., Houtzager, V. M., Seiden, I., Keen, S. L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., et al. (1998). "Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex." *Cell Death Differ* 5(4): 271-288.
- Rathkopf, D., Dickson, M. A., Feldman, D. R., Carvajal, R. D., Shah, M. A., Wu, N., Lefkowitz, R., Gonen, M., Cane, L. M., Dials, H. J., et al. (2009). "Phase I study of flavopiridol with oxaliplatin and fluorouracil/leucovorin in advanced solid tumors." *Clin Cancer Res* 15(23): 7405-7411.
- Ren, S. and Rollins, B. J. (2004). "Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit." *Cell* 117(2): 239-251.

- Rexer, B. N. and Arteaga, C. L. (2012). "Intrinsic and acquired resistance to HER2-targeted therapies in HER2 gene-amplified breast cancer: mechanisms and clinical implications." *Crit Rev Oncog* 17(1): 1-16.
- Riedl, S. J. and Salvesen, G. S. (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5): 405-413.
- Riely, G. J., Rizvi, N. A., Kris, M. G., Milton, D. T., Solit, D. B., Rosen, N., Senturk, E., Azzoli, C. G., Brahmer, J. R., Sirotnak, F. M., *et al.* (2009). "Randomized phase II study of pulse erlotinib before or after carboplatin and paclitaxel in current or former smokers with advanced non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* 27(2): 264-270.
- Riese, D. J., 2nd and Stern, D. F. (1998). "Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network." *Bioessays* 20(1): 41-48.
- Rixe, O., Franco, S. X., Yardley, D. A., Johnston, S. R., Martin, M., Arun, B. K., Letrent, S. P. and Rugo, H. S. (2009). "A randomized, phase II, dose-finding study of the pan-ErbB receptor tyrosine-kinase inhibitor CI-1033 in patients with pretreated metastatic breast cancer." *Cancer Chemother Pharmacol* 64(6): 1139-1148.
- Rodriguez-Enriquez, S., Marin-Hernandez, A., Gallardo-Perez, J. C., Carreno-Fuentes, L. and Moreno-Sanchez, R. (2009). "Targeting of cancer energy metabolism." *Mol Nutr Food Res* 53(1): 29-48.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. and Bonner, W. M. (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." *J Biol Chem* 273(10): 5858-5868.
- Russ, A. L., Haberstroh, K. M. and Rundell, A. E. (2007). "Experimental strategies to improve in vitro models of renal ischemia." *Exp Mol Pathol* 83(2): 143-159.
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J. and Pavletich, N. P. (1996). "Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex." *Nature* 382(6589): 325-331.
- Saikkonen, B., Pareek, T. K., Agarwal, N., Molinolo, A., Kriete, M. and Kulkarni, A. B. (2008). "Conditional deletion of cyclin-dependent kinase 5 in primary sensory neurons leads to atypical skin lesions." *Cell Cycle* 7(6): 750-753.
- Samelis, G. F., Ekmektzoglou, K., Tsiakou, A., Giannakaki, S. and Konstadoulakis, M. (2011). "Survival benefit with the combination of docetaxel, gemcitabine and erlotinib in advanced and/or metastatic pancreatic cancer patients." *Hepatogastroenterology* 58(110-111): 1776-1781.
- Santamaria, D., Barriere, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Caceres, J. F., Dubus, P., Malumbres, M. and Barbacid, M. (2007). "Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle." *Nature* 448(7155): 811-815.
- Satyanarayana, A. and Kaldis, P. (2009a). "A dual role of Cdk2 in DNA damage response." *Cell Div* 4: 9.
- Satyanarayana, A. and Kaldis, P. (2009b). "Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms." *Oncogene* 28(33): 2925-2939.
- Sawa, A., Khan, A. A., Hester, L. D. and Snyder, S. H. (1997). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: nuclear translocation participates in neuronal and nonneuronal cell death." *Proc Natl Acad Sci USA* 94(21): 11669-11674.
- Sawyers, C. L. (2003). "Opportunities and challenges in the development of kinase inhibitor therapy for cancer." *Genes Dev* 17(24): 2998-3010.
- Saxena, R. and Dwivedi, A. (2012). "ErbB family receptor inhibitors as therapeutic agents in breast cancer: current status and future clinical perspective." *Med Res Rev* 32(1): 166-215.
- Scott, F. L., Stec, B., Pop, C., Dobaczewska, M. K., Lee, J. J., Monosov, E., Robinson, H., Salvesen, G. S., Schwarzenbacher, R. and Riedl, S. J. (2009). "The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering." *Nature* 457(7232): 1019-1022.

- Schroeder, W., Biesterfeld, S., Zillessen, S. and Rath, W. (1997). "Epidermal growth factor receptor-immunohistochemical detection and clinical significance for treatment of primary breast cancer." *Anticancer Res* 17(4A): 2799-2802.
- Schulze-Gahmen, U., De Bondt, H. L. and Kim, S. H. (1996). "High-resolution crystal structures of human cyclin-dependent kinase 2 with and without ATP: bound waters and natural ligand as guides for inhibitor design." *J Med Chem* 39(23): 4540-4546.
- Semenza, G. L. (2000). "HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia." *J Appl Physiol* 88(4): 1474-1480.
- Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M. and Wang, G. L. (1994). "Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1." *J Biol Chem* 269(38): 23757-23763.
- Sequist, L. V., Besse, B., Lynch, T. J., Miller, V. A., Wong, K. K., Gitlitz, B., Eaton, K., Zacharchuk, C., Freyman, A., Powell, C., et al. (2010). "Neratinib, an irreversible pan-ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor: results of a phase II trial in patients with advanced non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol* 28(18): 3076-3083.
- Sharma, P. S., Sharma, R. and Tyagi, R. (2008). "Inhibitors of cyclin dependent kinases: useful targets for cancer treatment." *Curr Cancer Drug Targets* 8(1): 53-75.
- Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev* 13(12): 1501-1512.
- Singh, D., Chander, V. and Chopra, K. (2005). "Cyclosporine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys." *Toxicology* 207(3): 339-347.
- Sirover, M. A. (1999). "New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase." *Biochim Biophys Acta* 1432(2): 159-184.
- Smith, J., Tho, L. M., Xu, N. and Gillespie, D. A. (2010). "The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer." *Adv Cancer Res* 108: 73-112.
- Solit, D. B., She, Y., Lobo, J., Kris, M. G., Scher, H. I., Rosen, N. and Sirotnak, F. M. (2005). "Pulsatile administration of the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib is significantly more effective than continuous dosing for sensitizing tumors to paclitaxel." *Clin Cancer Res* 11(5): 1983-1989.
- Stacpoole, P. W., Kerr, D. S., Barnes, C., Bunch, S. T., Carney, P. R., Fennell, E. M., Felitsyn, N. M., Gilmore, R. L., Greer, M., Henderson, G. N., et al. (2006). "Controlled clinical trial of dichloroacetate for treatment of congenital lactic acidosis in children." *Pediatrics* 117(5): 1519-1531.
- Starostina, N. G. and Kipreos, E. T. (2011). "Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors." *Trends Cell Biol* 22(1): 33-41.
- Suda, K., Onozato, R., Yatabe, Y. and Mitsudomi, T. (2009). "EGFR T790M mutation: a double role in lung cancer cell survival?" *J Thorac Oncol* 4(1): 1-4.
- Sullivan, M. and Morgan, D. O. (2007). "Finishing mitosis, one step at a time." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11): 894-903.
- Swanton, C. (2004). "Cell-cycle targeted therapies." *Lancet Oncol* 5(1): 27-36.
- Takahashi, T., Boku, N., Murakami, H., Naito, T., Tsuya, A., Nakamura, Y., Ono, A., Machida, N., Yamazaki, K., Watanabe, J., et al. (2012). "Phase I and pharmacokinetic study of dacomitinib (PF-00299804), an oral irreversible, small molecule inhibitor of human epidermal growth factor receptor-1, -2, and -4 tyrosine kinases, in Japanese patients with advanced solid tumors." *Invest New Drugs*.
- Taniguchi, Y., Pippin, J. W., Hagmann, H., Krofft, R. D., Chang, A. M., Zhang, J., Terada, Y., Brinkkoetter, P. and Shankland, S. J. (2012). "Both cyclin I and p35 are required for maximal survival benefit of cyclin-dependent kinase 5 in kidney podocytes." *Am J Physiol Renal Physiol* 302(9): F1161-1171.
- Tarricone, C., Dhavan, R., Peng, J., Areces, L. B., Tsai, L. H. and Musacchio, A. (2001). "Structure and regulation of the CDK5-p25(nck5a) complex." *Mol Cell* 8(3): 657-669.
- Tatton, N. A. (2000). "Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease." *Exp Neurol* 166(1): 29-43.

- Tatton, W. G., Chalmers-Redman, R. M., Elstner, M., Leesch, W., Jagodzinski, F. B., Stupak, D. P., Sugrue, M. M. and Tatton, N. A. (2000). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegeneration and apoptosis signaling." *J Neural Transm Suppl*(60): 77-100.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P. and Martin, S. J. (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(3): 231-241.
- Tenev, T., Bianchi, K., Darding, M., Broemer, M., Langlais, C., Wallberg, F., Zachariou, A., Lopez, J., MacFarlane, M., Cain, K. and Meier, P. (2011). "The Ripoptosome, a signaling platform that assembles in response to genotoxic stress and loss of IAPs." *Mol Cell* 43(3): 432-448.
- Timsit, S. and Menn, B. (2007). "Cerebral ischemia, cell cycle elements and Cdk5." *Biotechnol J* 2(8): 958-966.
- Tinel, A. and Tschopp, J. (2004). "The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress." *Science* 304(5672): 843-846.
- Topaloglu, S., Abbasoglu, O., Ayhan, A., Sokmensuer, C. and Kilinc, K. (2003). "Antiapoptotic and protective effects of roscovitine on ischemia-reperfusion injury of the rat liver." *Liver Int* 23(4): 300-307.
- Tran, M. A., Watts, R. J. and Robertson, G. P. (2009). "Use of liposomes as drug delivery vehicles for treatment of melanoma." *Pigment Cell Melanoma Res* 22(4): 388-399.
- Tripathi, B. K., Stepp, M. A., Gao, C. Y. and Zelenka, P. S. (2008). "The Cdk5 inhibitor olomoucine promotes corneal debridement wound closure in vivo." *Mol Vis* 14: 542-549.
- Tristan, C., Shahani, N., Sedlak, T. W. and Sawa, A. (2011). "The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments." *Cell Signal* 23(2): 317-323.
- Ulukaya, E., Acilan, C. and Yilmaz, Y. (2011). "Apoptosis: why and how does it occur in biology?" *Cell Biochem Funct* 29(6): 468-480.
- Ullah, Z., Lee, C. Y. and Depamphilis, M. L. (2009). "Cip/Kip cyclin-dependent protein kinase inhibitors and the road to polyploidy." *Cell Div* 4: 10.
- Vakifahmetoglu-Norberg, H. and Zhivotovsky, B. (2010). "The unpredictable caspase-2: what can it do?" *Trends Cell Biol* 20(3): 150-159.
- Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., Guerin, C. J., Brunk, U. T., Declercq, W. and Vandenabeele, P. (2010). "Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features." *Cell Death Differ* 17(6): 922-930.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. and Kroemer, G. (2010). "Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(10): 700-714.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. and Thompson, C. B. (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." *Science* 324(5930): 1029-1033.
- Visentin, M., Biason, P. and Toffoli, G. (2010). "Drug interactions among the epidermal growth factor receptor inhibitors, other biologics and cytotoxic agents." *Pharmacol Ther* 128(1): 82-90.
- Vivi, A., Tassini, M., Ben-Horin, H., Navon, G. and Kaplan, O. (1997). "Comparison of action of the anti-neoplastic drug lonidamine on drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells: 31P and 13C nuclear magnetic resonance studies." *Breast Cancer Res Treat* 43(1): 15-25.
- von Minckwitz, G., Jonat, W., Fasching, P., du Bois, A., Kleeberg, U., Luck, H. J., Kettner, E., Hilfrich, J., Eiermann, W., Torode, J. and Schneeweiss, A. (2005). "A multicentre phase II study on gefitinib in taxane- and anthracycline-pretreated metastatic breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 89(2): 165-172.
- Wadia, J. S., Stan, R. V. and Dowdy, S. F. (2004). "Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis." *Nat Med* 10(3): 310-315.
- Wang, L., Du, F. and Wang, X. (2008). "TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways." *Cell* 133(4): 693-703.

- Wang, S. C., Nakajima, Y., Yu, Y. L., Xia, W., Chen, C. T., Yang, C. C., McIntush, E. W., Li, L. Y., Hawke, D. H., Kobayashi, R. and Hung, M. C. (2006). "Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability." *Nat Cell Biol* 8(12): 1359-1368.
- Wang, Y. N. and Hung, M. C. (2012). "Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family." *Cell Biosci* 2(1): 13.
- Washington, J. T. and Quintyne, N. J. (2012). "Dichloroacetate induces different rates of cell death in cancer and noncancer cell lines in vitro." *Tumori* 98(1): 142-151.
- Weber, C. H. and Vincenz, C. (2001). "The death domain superfamily: a tale of two interfaces?" *Trends Biochem Sci* 26(8): 475-481.
- Welz, P. S., Wullaert, A., Vlantis, K., Kondylis, V., Fernandez-Majada, V., Ermolaeva, M., Kirsch, P., Sterner-Kock, A., van Loo, G. and Pasparakis, M. (2011). "FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation." *Nature* 477(7364): 330-334.
- Whitmore, L. and Wallace, B. A. (2008). "Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases." *Biopolymers* 89(5): 392-400.
- Wick, W., Weller, M., Weiler, M., Batchelor, T., Yung, A. W. and Platten, M. (2011). "Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma." *Neuro Oncol* 13(6): 566-579.
- Wilson, K. J., Gilmore, J. L., Foley, J., Lemmon, M. A. and Riese, D. J., 2nd (2009). "Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer." *Pharmacol Ther* 122(1): 1-8.
- Wu, F. Y., Wang, S. E., Sanders, M. E., Shin, I., Rojo, F., Baselga, J. and Arteaga, C. L. (2006). "Reduction of cytosolic p27(Kip1) inhibits cancer cell motility, survival, and tumorigenicity." *Cancer Res* 66(4): 2162-2172.
- Wu, W., Liu, P. and Li, J. (2012a). "Necroptosis: an emerging form of programmed cell death." *Crit Rev Oncol Hematol* 82(3): 249-258.
- Wu, Y., Amonkar, M. M., Sherrill, B. H., O'Shaughnessy, J., Ellis, C., Baselga, J., Blackwell, K. L. and Burstein, H. J. (2011). "Impact of lapatinib plus trastuzumab versus single-agent lapatinib on quality of life of patients with trastuzumab-refractory HER2+ metastatic breast cancer." *Ann Oncol* 22(12): 2582-2590.
- Wu, Y., Chen, C., Sun, X., Shi, X., Jin, B., Ding, K., Yeung, S. C. and Pan, J. (2012b). "Cyclin-Dependent Kinase 7/9 Inhibitor SNS-032 Abrogates FIP1-like-1 Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha and Bcr-Abl Oncogene Addiction in Malignant Hematologic Cells." *Clin Cancer Res* 18(7): 1966-1978.
- Xiao, Z., Chen, Z., Gunasekera, A. H., Sowin, T. J., Rosenberg, S. H., Fesik, S. and Zhang, H. (2003). "Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents." *J Biol Chem* 278(24): 21767-21773.
- Yamasaki, F., Zhang, D., Bartholomeusz, C., Sudo, T., Hortobagyi, G. N., Kurisu, K. and Ueno, N. T. (2007). "Sensitivity of breast cancer cells to erlotinib depends on cyclin-dependent kinase 2 activity." *Mol Cancer Ther* 6(8): 2168-2177.
- Yau, T., Wong, H., Chan, P., Yao, T. J., Pang, R., Cheung, T. T., Fan, S. T. and Poon, R. T. (2012). "Phase II study of bevacizumab and erlotinib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma patients with sorafenib-refractory disease." *Invest New Drugs*.
- Youle, R. J. and Strasser, A. (2008). "The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(1): 47-59.
- Yuan, J., Adamski, R. and Chen, J. (2010). "Focus on histone variant H2AX: to be or not to be." *FEBS Lett* 584(17): 3717-3724.
- Zahorowska, B., Crowe, P. J. and Yang, J. L. (2009). "Combined therapies for cancer: a review of EGFR-targeted monotherapy and combination treatment with other drugs." *J Cancer Res Clin Oncol* 135(9): 1137-1148.
- Zhang, J., Krishnamurthy, P. K. and Johnson, G. V. (2002). "Cdk5 phosphorylates p53 and regulates its activity." *J Neurochem* 81(2): 307-313.

- Zhang, P., Liegeois, N. J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J. C., Silverman, A., Harper, J. W., DePinho, R. A. and Elledge, S. J. (1997). "Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome." *Nature* 387(6629): 151-158.
- Zhou, R., Vander Heiden, M. G. and Rudin, C. M. (2002). "Genotoxic exposure is associated with alterations in glucose uptake and metabolism." *Cancer Res* 62(12): 3515-3520.

“No llores porque ya se terminó... sonríe, porque sucedió”
Gabriel García Márquez

