

Tesis Doctoral

Mecanismos moleculares que regulan la sensibilidad de células
tumoraes de mama a la apoptosis por TRAIL

Gustavo Ortiz Ferrón

Instituto de Parasitología y Biomedicina de Granada
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Granada, mayo 2005

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE	1
II. ABREVIATURAS.....	5
III. RESUMEN.....	9
IV.-INTRODUCCIÓN.....	13
1. Apoptosis.....	15
1.1 Generalidades	15
1.2 Otros tipos de muerte celular.....	16
2. Caspasas.....	18
2.1 Características principales	18
2.2 Inhibidores de caspasas: IAPs y FLIP	20
3. Vías de activación de la apoptosis.....	21
3.1 Clasificación	21
3.2 Ruta intrínseca de apoptosis	23
3.2.1 La mitocondria	23
3.2.2 Familia de proteínas bcl-2. BID	28
3.3 Ruta de los receptores de muerte o ruta extrínseca de apoptosis.	35
3.3.1 TRAIL y sus receptores de muerte:	37
4. Proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK).....	39
4.1 Vía de ERK.....	41
5. Ciclo celular, Quinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs) y cáncer	43
6. Agentes que afectan a los microtúbulos (AAMs) y cáncer	49
V. OBJETIVOS	57
VI.-MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
VII. RESULTADOS	71
1.- La activación de la ruta de MAPK inhibe la apoptosis inducida por TRAIL disminuyendo la localización mitocondrial de tBid en células tumorales de mama MCF-7	73
1.1- La activación de la ruta de MAPK/ERK/2 inhibe la apoptosis inducida por TRAIL en un paso posterior al corte de BID por la caspasa-8.	73
1.2- La vía MAPK/ERK1/2 inhibe la apoptosis inducida por TRAIL independientemente de la síntesis de proteínas en células MCF-7.	76
1.3- La activación de la ruta MAPK/ERK reduce la localización mitocondrial de Bid provocada por TRAIL y TNF α , pero no afecta al procesamiento de Bid.	79
1.4- La localización mitocondrial de BID truncado es revertida en presencia de un activador de la vía de MAPK/ERK.	81
1.5- La activación de la ruta de MAPK/ERK inhibe la liberación de citocromo-c de la mitocondria disparada por tBID-recombinante.	85
2.-Roscovitina sensibiliza a células tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL.....	87
2.1-Roscovitina sensibiliza a diferentes líneas tumorales de cáncer de mama a la apoptosis inducida por TRAIL.	87
2.2-El tratamiento con roscovitina aumenta la activación de caspasa-8 tras el tratamiento con TRAIL, pero no produce ningún cambio en la expresión en superficie de los receptores de TRAIL.	91
2.3-El reclutamiento de la caspasa-8 y FADD al DISC de TRAIL se ve aumentado en células MDA-MB-231 tras su tratamiento con roscovitina.	92
2.4-El tratamiento con roscovitina reduce los niveles de cFLIPL y cFLIPS a nivel de ARNm y de proteína	95
3.-Agentes que afectan a los microtúbulos sensibilizan a la apoptosis inducida por TRAIL en células tumorales de mama.....	98

3.1-La parada del ciclo en G2/M por diferentes drogas provoca una sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL.	98
3.2-El tratamiento con nocodazol o taxol reduce los niveles celulares de la proteína cFLIP en células MDA-MB-231.	98
3.3-La falta de adhesión de las células al sustrato no las sensibiliza a la apoptosis inducida por TRAIL.	102
3.4-El tratamiento de células MDA-MB-231 con nocodazol o taxol aumenta la activación de la caspasa-8, liberación de citocromo-c, y la translocación de BAX a la mitocondria disparada por TRAIL.	102
3.5-Nocodazol o taxol no afectan a la expresión de los receptores pro-apoptóticos ni a la formación del DISC de TRAIL en la superficie celular.	104
VIII. DISCUSIÓN.....	107
IX. CONCLUSIONES.....	123
X. BIBLIOGRAFÍA.....	127

II. ABREVIATURAS

AAMs: agentes que afectan a los microtúbulos
ADN: ácido desoxirribonucleico
ANT: transportador de nucleótidos de adenina
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ATP: Adenosina 5'-trifosfato
BH: dominio de homología de las proteínas de la familia Bcl-2 (*Bcl-2 homology*)
CARD: dominio reclutador de caspasas (*caspase recruitment domain*)
CDK: ciclina dependiente de quinasa
CHX: cicloheximida.
CRD: dominio rico en cisteína, de la región extracelular de receptores de muerte (*cystein rich domain*).
DD: dominio de muerte (*death domain*).
DED: dominio efector de muerte (*death effector domain*).
DEPC: dietilpirocarbonato.
DISC: complejo de señalización e inducción de muerte (*death inducing signaling complex*).
DXR: doxorubicina
ERK: quinasas activadas por señales extracelulares (*extracellular signal-regulated kinase*)
FBS: suero fetal bovino (*foetal bovine serum*)
IAP: familia de proteínas que inhiben la activación de caspasas(*inhibitor of apoptosis*)
JNK: *c-JUN-N-terminal Kinase*
MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógeno (*mitogne-activated protein kinases*)
Nz: nocodazol
PARP: poli(ADP-ribosa)polimerasa.
PBS: tampón fosfato.
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.
PMME: permeabilización de la membrana mitocondrial externa
PS: fosfatidilserina
PTP: poro de transición de permeabilidad (*permeability transition pore*)
Rb: proteína del retinoblastoma
TNF: factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*).
TRAIL: *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*.

Tx: taxol

VDAC: porina, canal iónico dependiente de voltaje de la membrana mitocondrial
(*Voltaje-Dependent Anion Channel*)

III. RESUMEN

TRAIL es un ligando de la familia de TNF α con un gran potencial terapéutico debido fundamentalmente a su capacidad de inducir apoptosis en diferentes tumores humanos tanto *in vitro* como *in vivo*, sin que afecte a células normales. Sin embargo, a pesar de ello, se ha encontrado que algunas células tumorales, especialmente células tumorales de mama, son resistentes a TRAIL por razones poco conocidas. De hecho, se conoce muy poco acerca del mecanismo que regula la sensibilidad de las células tumorales a la apoptosis inducida por TRAIL. En esta tesis se ha tratado de aportar algo de luz sobre la regulación de la apoptosis inducida por TRAIL en células tumorales de mama.

Se conoce que un alto porcentaje de tumores de mama tienen una actividad de la vía MAPK aumentada. En esta tesis se ha estudiado el impacto de la activación de la vía de MAPK/Erk1/2 en la regulación de la apoptosis inducida por TRAIL tomando como modelo la línea tumoral MCF-7. Se encontró que cuando se activaba la ruta de MAPK, la apoptosis inducida por TRAIL era inhibida de manera independiente de la síntesis de nuevas proteínas. Utilizando una construcción Full-Bid-GFP se observó que aunque TRAIL inducía el corte de Bid en presencia del activador de la ruta de MAPK, la localización mitocondrial del Bid-GFP cortado era reducida. Se examinó la translocación de tBid a la mitocondria con una proteína de fusión GFP-tBid y se encontró que la localización mitocondrial era inhibida, al menos parcialmente, cuando la vía de MAPK era activada. La localización mitocondrial de la proteína GFP-tBid con un dominio BH3 truncado estaba también reducida tras la activación de MAPK. Más aún, en células permeabilizadas con digitonina, la liberación de citocromo-c de la mitocondria inducida por tBid recombinante era también reducida tras la activación de MAPK. Estos datos indican que la vía de MAPK/Erk1/2 inhibe la apoptosis inducida por TRAIL en células MCF-7 inhibiendo la localización de tBid en la mitocondria.

Por otra parte, se ha intentado sensibilizar diferentes líneas tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL utilizando para ello diferentes drogas y se ha tratado de dilucidar el mecanismo que provoca dicha sensibilización. Se observó mediante citometría de flujo que el tratamiento con roscovitina, un inhibidor de CDKs actualmente testado en ensayos clínicos como terapéutico contra el cáncer, sensibilizó a casi todas las líneas tumorales de mama testadas, incluso aquellas altamente resistentes a TRAIL. Se detectó mediante Western-blot que el pre-tratamiento con roscovitina provocaba un aumento en la activación de la caspasa-8 producida por TRAIL, lo cual

sugiere que la sensibilización ocurre en eventos apicales de la señalización por este receptor de muerte. Esta sensibilización no tiene nada que ver con cambios en la superficie celular de los receptores de TRAIL, una de las formas que se ha descrito que las células pueden ser sensibilizadas. Sin embargo, el pre-tratamiento con roscovitina facilita la formación del DISC de TRAIL y además descende los niveles de FLIP tanto a nivel de proteína como de ARNm (detectado mediante RT-PCR), lo cual favorece la activación de la caspasa-8. Estos datos indican que roscovitina sensibiliza a células tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL facilitando la formación del DISC y provocando una bajada en la expresión de la proteína anti-apoptótica FLIP.

Por último, se ha descrito en esta tesis que agentes que afectan a los microtúbulos como el nocodazol o el taxol, también sensibilizan a la apoptosis inducida por TRAIL. Mediante estudios de inmunodetección se observó que estos agentes provocan un aumento en la activación de caspasa-8, un descenso de los niveles de proteína de FLIP y un aumento de la translocación de Bax a la mitocondria así como una mayor liberación de citocromo-c de la misma. La activación de caspasa-8 se ve aumentada, lo cual sugiere que, al igual que roscovitina, los AAMs están afectando eventos apicales en la señalización de la apoptosis por TRAIL, sin embargo, no se vio ningún efecto en los receptores de TRAIL en membrana, ni en la formación del DISC. Tampoco se observaron cambios en proteínas implicadas en la señalización/regulación de la señal apoptótica a parte de FLIP. Probablemente la bajada de los niveles de FLIP facilite la activación de la caspasa-8 e incremente la respuesta apoptótica a TRAIL.

IV.-INTRODUCCIÓN

1. Apoptosis

1.1 Generalidades

Todos los organismos metazoos, para eliminar las células que ya no son necesarias, o bien las que han sido dañadas o infectadas, han desarrollado un mecanismo programado de muerte celular denominado apoptosis (Kerr, Wyllie et al. 1972). Este proceso, que está genéticamente controlado, es vital durante el desarrollo (ontogénesis), para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos y también para mantener un sistema inmune efectivo. De media en un humano adulto, de 50 a 70 millones de células sufren el proceso de apoptosis cada día (Reed 1999), otras nuevas ocuparán su lugar (por ejemplo, en la renovación de los tejidos). No es sorprendente, por tanto, que defectos en la regulación del programa apoptótico estén implicados en numerosos procesos patológicos: un exceso de células apoptóticas podría participar en enfermedades como el SIDA o en patologías o neurodegenerativas, mientras que la falta de apoptosis puede llevar a anomalías, enfermedades autoinmunes o a patogénesis tumoral. (Cory and Adams 2002; Cory, Huang et al. 2003). En cáncer estos defectos en la apoptosis permiten a las células neoplásicas sobrevivir más allá de su vida media normal, haciéndolas independientes de factores de supervivencia exógenos, de la hipoxia y del estrés oxidativo conforme la masa tumoral se expande, y dando tiempo para la acumulación de alteraciones genéticas que disregulan la proliferación celular, interfieren en la diferenciación, promueven angiogénesis, y aumentan la movilidad e invasividad durante la progresión tumoral (Reed 1999; Tschopp, Martinon et al. 1999; Ionov, Yamamoto et al. 2000; Frisch and Sreaton 2001; Green and Evan 2002). Finalmente, defectos en la apoptosis asociados al cáncer juegan un papel en la quimioresistencia y en la radioresistencia, aumentando el umbral de la muerte celular y por tanto, también las dosis requeridas para eliminar el tumor (Makin and Hickman 2000). Por todo esto, el estudio de los defectos de la regulación de la apoptosis es un aspecto fundamental en la biología del cáncer.

La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos (Wyllie 1980) (Fig.1) como son la condensación del citoplasma y compactación de la cromatina dando lugar a la formación de densos agregados que se deslocalizan para

situarse junto a la membrana nuclear. Posteriormente, sobre la cromatina actúan una serie de endonucleasas que cortan el ADN en una serie de fragmentos oligonucleosomales (180pb) o múltiplos de éstos, si bien, en ciertos tipos de muerte celular similar a la apoptosis no se produce una condensación total de la cromatina ni se fragmenta el ADN (Leist and Jaattela 2001). Otra característica de la apoptosis es la dilatación del retículo endoplasmático que origina la formación de vesículas que tienden a unirse a la membrana plasmática adquiriendo una forma característica en “burbujas”

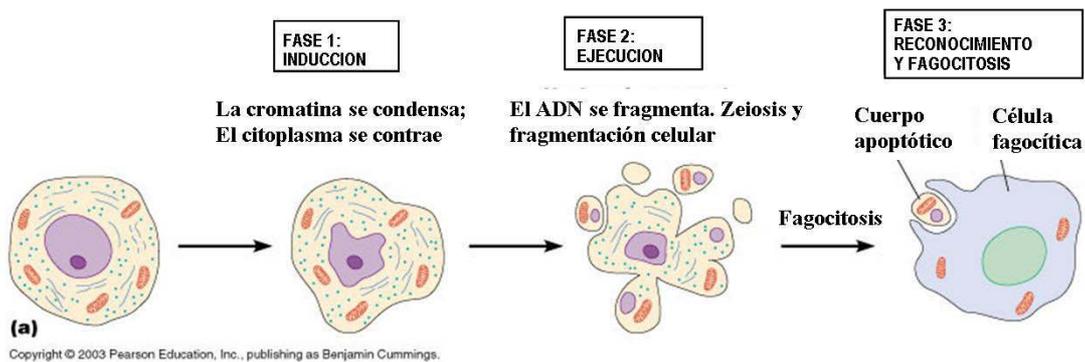


Figura 1. Esquema de la muerte por apoptosis

(zeiosis). Finalmente, la célula se fragmenta en los llamados cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos, debido a la exposición de marcadores de fagocitosis en la superficie celular, como la fosfatidilserina, (Hengartner 2000), son rápidamente reconocidos y fagocitados por macrófagos y otras células vecinas impidiendo así la exposición del material intracelular al sistema inmune que podría desencadenar una respuesta inflamatoria.

1.2 Otros tipos de muerte celular

Se han numerado anteriormente las características típicas de la apoptosis, sin embargo, existen otros tipos de muerte celular, a veces, con características parecidas a las de la apoptosis, pero que no se ajustan totalmente a ellas (Fig.2). Así se puede hablar de:

-Muerte celular programada parecida a apoptosis: es un tipo de muerte programada en la que la cromatina se condensa menos que en la apoptosis y las formas geométricas observadas son también menos complejas. Los marcadores de fagocitosis

en la membrana plasmática se muestran tras la lisis celular. Otras características de la apoptosis se pueden dar en diferentes grados. La mayoría de estas formas de muerte celular son independientes de caspasas, como por ejemplo la autofagia, donde, estructuras de membrana simple rodean a organelas del citoplasma tales como mitocondria, retículo endoplasmático y aparato de Golgi, formándose así vacuolas autofagosómicas que se fusionan con lisosomas. El contenido de estas vacuolas se degrada por hidrolasas de los lisosomas (Schwartz, Smith et al. 1993).

Otra muerte que estaría en este grupo es la denominada “muerte negra” (dark cell death), observada por ejemplo, en el desarrollo de la enfermedad de Huntington. Es una muerte neuronal lenta caracterizada por una gran condensación del citoplasma, cromatina agrupada, y una membrana celular arrugada, pero sin la formación de las “burbujas” típicas de la apoptosis ni en la membrana plasmática ni en el núcleo.

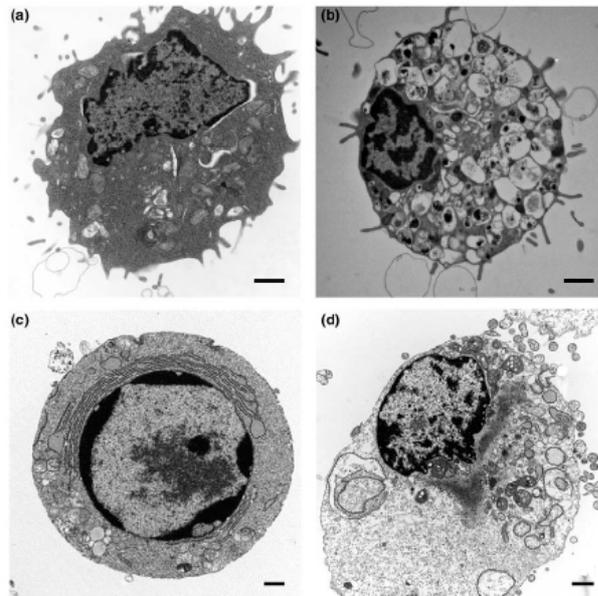


Figura 2. Otros tipos de muerte celular. a) Normal b) Autofagia c) Apoptosis d) Necrosis. La vacuolización del citoplasma se observa en autofagia (b) y en necrosis (d). Por el contrario los niveles de ATP se mantienen en células normales (a) y apoptóticas (c) concordando con el número limitado de vacuolas en sus citoplasmas. (Adaptado de (Edinger and Thompson 2004))

-Muerte celular programada parecida a la necrosis: se caracteriza por una ausencia de la condensación de la cromatina, con variaciones en diferentes grados de otras características apoptóticas que pueden ocurrir después de la lisis. Normalmente suelen ser independientes de caspasas (Leist and Jaattela 2001).

-Necrosis: es la muerte celular típicamente opuesta a la apoptosis y es provocada por un daño intenso en la célula, ya sea físico, químico u osmótico, como resultado por ejemplo de la exposición a detergentes, oxidantes, ionóforos o determinados fármacos. Las células necróticas se hinchan en ausencia de las burbujas típicas de la apoptosis en la membrana plasmática, provocando la rotura de la membrana celular y la liberación de

su contenido al medio extracelular desencadenando respuestas inflamatorias locales (Thompson 1998).

2. Caspasas

2.1 Características principales

Los cambios morfológicos observados en las células apoptóticas descritos anteriormente, son iniciados por la activación de una serie de proteasas denominadas caspasas, por cysteine asparsyl-specific proteases (Cryns and Yuan 1998; Thornberry and Lazebnik 1998). Las caspasas están constitutivamente expresadas en la célula como zimógenos (procaspasas) con ninguna o muy poca actividad (Thornberry and Lazebnik 1998). Poseen una subunidad larga y una corta precedidas por un prodominio N-terminal (Fig.3).

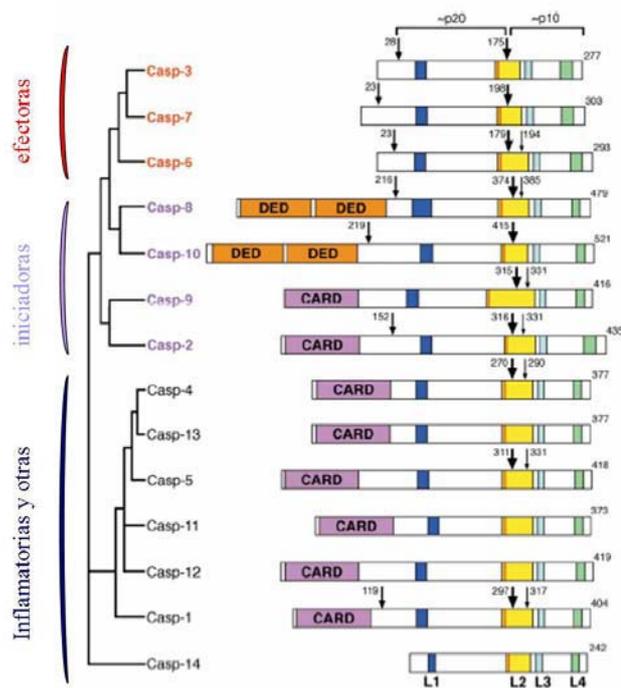


Figura 3. Caspasas en mamíferos. (Adaptado de (Shi 2002))

(Wolf and Green 1999) .Una vez activas, las caspasas son capaces de cortar varios cientos de sustratos celulares.

Hasta la fecha han sido descritas 11 caspasas en humanos, caspasa-1,-2,-3,-4,-5,-6,-7,-8,-9,-10 y-14 (Alnemri, Livingston et al. 1996; Pistrutto, Jost et al. 2002). La

terminal (Fig.3). Para ser activas, las caspasas son proteolizadas. Esta proteólisis ocurre secuencialmente en residuos de aspártico (Asp): primero se separa de la subunidad pequeña la subunidad grande junto con el prodominio, y posteriormente el prodominio es eliminado. Estudios cristalográficos han revelado que la caspasa activa es un tetrámero formado por dos subunidades largas y dos cortas conteniendo así, dos sitios activos de catálisis

enzima denominada inicialmente caspasa-13 fue posteriormente identificada como un homólogo bovino de la caspasa-4 humana (Koenig, Eckhart et al. 2001), y las caspasas-11 y -12 son enzimas murinas que representan los homólogos de las caspasas-4 y -5 humanas (Lamkanfi, Declercq et al. 2002).

Basándose en su función dentro de la cascada apoptótica (Degterev, Boyce et al. 2003) las caspasas se pueden clasificar en dos grupos: Las caspasas iniciadoras y las caspasas efectoras o ejecutoras.

-caspasas iniciadoras: Son las que primero se activan tras un estímulo apoptótico. Poseen prodominios largos que contienen unos motivos de interacción proteína-proteína característicos: dominios efectores de muerte (DED) y dominios de activación y reclutamiento de caspasas (CARD). Por medio de ellos, pueden interactuar con proteínas adaptadoras que presenten dominios homólogos. Dentro de este grupo se encuentran la caspasa-8, -9, -10, -2, -1, -4 y -5. Las caspasas -1, -4 y -5 forman una subclase dentro de este grupo que están implicadas en apoptosis y además en el control de ciertas respuestas inflamatorias, en concreto, de la maduración de citoquinas.

Al principio, y como hemos dicho anteriormente, se postuló que las caspasas iniciadoras se activaban por un mecanismo de autocatálisis de proximidad, lo cual podría explicarse por ejemplo con el reclutamiento de la caspasa-8 o -10 en el DISC (complejo inductor de señales de muerte) y de la caspasa-9 en el apoptosoma (Salvesen and Dixit 1999). Sin embargo, otro modelo ha sido propuesto: el “modelo unificado” el cual propone que la homodimerización de los zimógenos monoméricos de las caspasas es necesaria y suficiente para la activación de las caspasas iniciadoras (Boatright, Renatus et al. 2003; Donepudi, Mac Sweeney et al. 2003). Esta dimerización permite una reorganización estructural de manera que el sitio catalítico adquiere una conformación activa, independientemente de cualquier corte proteolítico (Riedl and Shi 2004). Más estudios son necesarios para dilucidar cuál de los mecanismos sería el válido.

-caspasas efectoras: En este grupo se incluyen las caspasas encargadas de cortar múltiples sustratos celulares necesarios para la supervivencia de la célula como proteínas del citoesqueleto (ej. Actina, fodrina y plectina), proteínas reguladoras de la reparación del ADN (como la PARP), proteínas del ciclo celular (ej. MDM2), etcétera. A diferencia de las iniciadoras, estas caspasas poseen un prodominio corto y no contienen dominios DED o CARD. Caspasas ejecutoras son la caspasa-3, -6 y -7. Son normalmente procesadas y activadas por las caspasas iniciadoras. Aunque no se conoce

totalmente el mecanismo de activación de las caspasas efectoras, se sabe que el corte proteolítico en la unidad catalítica es absolutamente necesario. Tras el corte, su actividad catalítica es aumentada varios órdenes de magnitud (Riedl and Shi 2004).

2.2 Inhibidores de caspasas: IAPs y FLIP

Aunque las caspasas se expresan como zimógenos, y además pueden ser reguladas transcripcional y post-traduccionalmente (Earnshaw, Martins et al. 1999), una vez activadas también hay mecanismos que las regulan, como por ejemplo, por medio de su degradación en el proteasoma (Huang, Joazeiro et al. 2000) o mediante proteínas que regulan su actividad como son los IAPs o FLIP.

IAPs - esta familia de proteínas fue identificada en primer lugar en baculovirus, por su habilidad para impedir la apoptosis en la célula infectada mediante la inactivación de la actividad caspasa (Deveraux and Reed 1999). Hasta la fecha, se han identificado 8 proteínas IAP en mamíferos, entre las que se encuentran XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ML-IAP y survivina. Los IAPs son inhibidores directos de caspasas, y son las únicas proteínas endógenas conocidas capaces de regular la actividad tanto de las caspasas efectoras como de las iniciadoras. La capacidad de unión a caspasas y de inhibición reside en los llamados dominios BIR (Baculoviral IAP Repeat) que consisten en aproximadamente 80 aminoácidos plegados alrededor de un átomo de zinc. Los IAPs también poseen dominios RING, que actúan como ubiquitín-ligasas induciendo la autodegradación del IAP (Yang, Fang et al. 2000), y posiblemente también la degradación de la caspasa unida a él. También poseen dominios CARD que pueden permitir la regulación de la degradación de caspasas por interacción entre dominios de este tipo.

cFLIP- cFLIP es una proteína inhibidora de la activación de caspasas-8/10 (Bertin, Armstrong et al. 1997; Hu, Vincenz et al. 1997; Irmiler, Thome et al. 1997; Thome, Schneider et al. 1997). A pesar de que existen varias formas de cFLIP a nivel de ARNm, solo algunas de ellas se han detectado a nivel de proteína, fundamentalmente la llamada forma larga (FLIPL) y la corta (FLIPS) (Hu, Vincenz et al. 1997; Scaffidi, Schmitz et al. 1999). FLIPS solo contiene dos de los llamados dominios efectores de muerte (DED) muy similares a los de los prodominios de las caspasas-8/10. Sin embargo, FLIPL es idéntico en tamaño con la caspasa-8, y también contiene el tandem N-terminal de DEDs, pero su dominio caspasa está modificado, de manera que es

inactivo (Rasper, Vaillancourt et al. 1998). FLIPL por lo tanto, tiene la clásica estructura de un inhibidor dominante negativo: un dominio de interacción proteína-proteína intacto unido a un dominio enzimático inactivo. FLIPL se uniría a la proteína adaptadora FADD en el complejo proteico de los receptores de muerte conocido como DISC (complejo inductor de señales de muerte) y es cortado por la caspasa-8, pero, al no tener ésta actividad proteasa, el corte no es recíproco y el resultado final es una inhibición de la activación de la caspasa-8 y por ende de la apoptosis (Krueger, Schmitz et al. 2001). Por tanto, la hipótesis prevalente es que FLIPL actúa solamente como inhibidor de la apoptosis, impidiendo la activación de la caspasa-8 en el DISC. Sin embargo, FLIPL parece tener un “lado oscuro”, ya que se han observado una serie de hechos que no cuadran con su actividad anti-apoptótica: se ha visto que es expresado virtualmente en todos los tipos celulares independientemente de su sensibilidad a la apoptosis inducida por receptores de muerte. Además, el ratio 1:100 que suele existir entre FLIPL y caspasa-8 en las células parece incoherente con que FLIPL actúe como inhibidor de caspasa-8. Y por último, en trabajos recientes se ha descrito que bajo ciertas circunstancias, dependiendo de la concentración intracelular de la proteína, FLIPL puede actuar como activador de la caspasa-8 y la caspasa-10 (Chang, Xing et al. 2002; Micheau, Thome et al. 2002; Boatright, Deis et al. 2004). FLIPS, sin embargo, no parece tener esta “doble vida” y solo se le conoce actividad inhibidora de la apoptosis.

3. Vías de activación de la apoptosis

3.1 Clasificación

Existen dos vías canónicas de activación de caspasas y por tanto de la muerte celular: **1)** la ruta mitocondrial o ruta intrínseca, inducida por diferentes formas de estrés, y **2)** la ruta de los receptores de muerte o ruta extrínseca, disparada por la activación de los miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) en la superficie celular (Fig.4). Por cualquiera de las dos rutas, la activación de las caspasas iniciadoras se produce a través de la formación de un complejo proteico inicial en el cual se reclutan caspasas iniciadoras que se autoactivan por aproximación.

A parte de estas dos vías clásicas de activación, existen otras como **3)** la vía de activación de caspasas vinculada al estrés en el retículo endoplasmático (Cryns and Yuan 1998; Hacki, Egger et al. 2000; Wei, Zong et al. 2001), aunque son necesarios más estudios en este campo para dilucidar el papel concreto de este orgánulo en la apoptosis. **4)** Una vía de inducción de la apoptosis específica de células T y NK (natural

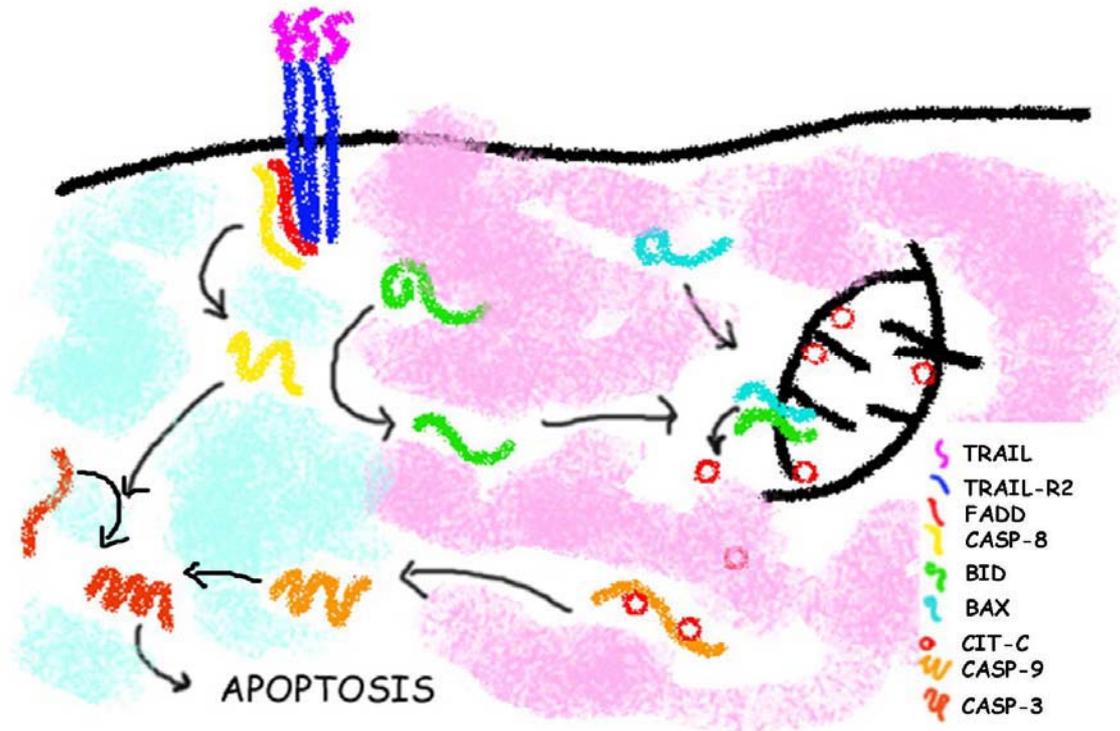


Figura 4. Vías intrínseca y extrínseca de apoptosis: La parte morada definiría la ruta intrínseca que implica a la mitocondria. La parte de citoplasma azul define la ruta extrínseca que implica a los receptores de muerte.

killer), las cuales utilizan una vía de exocitosis de gránulos para la eliminación de células infectadas por virus. Estos gránulos contienen serin-proteasas conocidas como granzimas, como la granzima B, que una vez dentro de la célula diana, pueden cortar sustratos en residuos de aspártico incluidos varias caspasas y algunos sustratos de caspasas. **5)** Finalmente, podría existir una vía nuclear para la regulación de la apoptosis centrada en orgánulos nucleares llamados cuerpos nucleares (nuclear bodies) o dominios oncogénicos Pml (PODs). La eliminación del gen *pml* en ratones da como resultado resistencia general a la apoptosis a través de un mecanismo desconocido. Varias proteínas que pueden promover la apoptosis como por ejemplo Daaz, la quinasa Zip, o Par4, han sido localizadas en los PODs. Defectos de ensamblaje de estas estructuras nucleares se han visto en diversos cánceres (Salomoni and Pandolfi 2002). Cómo los PODs están relacionados con las vías de activación de caspasas se desconoce.

Las caspasas, como hemos dicho antes, juegan un papel fundamental en la muerte celular programada. Sin embargo, a parte de las caspasas, existen otras proteasas que también son capaces de desencadenar el proceso de muerte celular, entre otras encontramos, a parte de las granzimas mencionadas anteriormente, otras como por ejemplo cathepsinas, calpaínas, serin-proteasas o proteasas del complejo proteasómico. Más aún, muchas proteasas no-caspasas son capaces de cortar algunos de los sustratos clásicos de las caspasas, indicando que también pueden mimetizar los efectos celulares de las caspasas. Muchas de estas proteasas darían lugar a una muerte celular independiente de caspasas

3.2 Ruta intrínseca de apoptosis.

3.2.1 La mitocondria

La mitocondria tiene un rol principal en la ruta intrínseca de apoptosis, que es inducida por diferentes estímulos. Numerosas moléculas señalizadoras de la apoptosis así como estímulos patológicos convergen en la mitocondria induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (PMME) y la liberación de proteínas que normalmente se encuentran en el espacio intermembrana de la mitocondria. Antes, durante, o después de la PMME ocurre, normalmente, la disipación del potencial de la membrana interna mitocondrial. El mecanismo a través del cual ocurre la permeabilización de la membrana mitocondrial externa durante la apoptosis, es todavía un tema controvertido. Se pueden proponer dos clases de mecanismos que podrían funcionar en circunstancias diferentes: aquellos en las que la membrana mitocondrial interna participa y aquellos en los que no lo hace (Fig.5).

La **primera** clase de mecanismo es un modelo hipotético y consistiría en un poro que se abre en la membrana interna, permitiendo el paso de agua y moléculas de hasta aproximadamente 1.5kD. Este poro, el poro de permeabilidad transitoria (PT), postula un papel para el transportador de nucleótidos de adenina (ANT) en la membrana interna y del canal de aniones voltaje dependiente (VDAC) en la membrana externa (Mattson and Kroemer 2003). Evidencias recientes han mostrado que el poro PT puede formarse en ausencia de ANT (Kokoszka, Waymire et al. 2004) y modelos alternativos han sido propuestos (He and Lemasters 2002). La apertura del poro PT puede ser producida por

diferentes estímulos y conduce a: i) la pérdida del potencial de membrana ya que a través de esta membrana se produce el equilibrio iónico, y ii) al hinchamiento de la matriz mitocondrial debido a la entrada de agua, llevando, en caso de un hinchamiento suficiente, a la rotura de la membrana mitocondrial externa y por tanto dando lugar a la

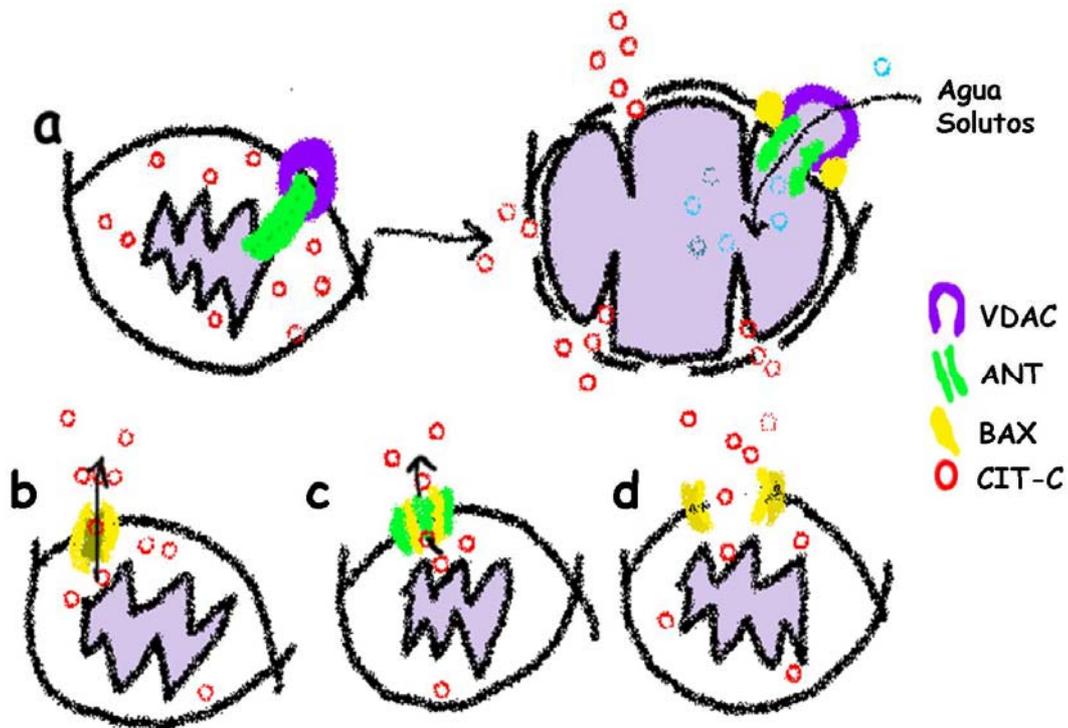


Figura 5. Mecanismos propuestos para la PMME. a) Apertura del PT; b) Canal de Bax; c) Canal Bax/VDAC; d) Poro lipídico o complejo proteolipídico. La figura a) pertenece a mecanismos de la primera clase, que implican al PT y a la membrana mitocondrial interna. Las figuras b), c) y d) pertenecen a la segunda clase de mecanismos, donde ni PT ni la membrana mitocondrial interna están implicados

PMME. Hay que hacer notar, sin embargo, que aunque la pérdida del potencial de membrana acompaña siempre a la PT, otros muchos procesos pueden producir esta pérdida. La pérdida del potencial no es suficiente para demostrar la implicación del PT. Sin embargo, el uso de inhibidores de constituyentes del poro PT que inhiben la PMME directamente indicaría la implicación de la PT en la PMME.

En la **segunda** clase de mecanismo, ni el poro PT ni la membrana mitocondrial interna tienen un papel importante. Dicho mecanismo parece estar mediado por proteínas reguladoras de la apoptosis pertenecientes a la familia de Bcl-2 y que actúan directamente en la membrana mitocondrial externa. Miembros anti-apoptóticos de esta familia bloquearían la PMME, mientras que miembros pro-apoptóticos la promoverían. Estos miembros pro-apoptóticos generarían aperturas que podrían consistir en canales

proteicos formados por su homo o heterodimerización, ya que se ha visto que dicha familia de proteínas se parece estructuralmente a la toxina diftérica, una molécula localizada en membrana y formadora de poros. O bien la apertura consistiría en la formación de largos poros lipídicos compuestos por dichas proteínas Bcl-2 y lípidos (Green and Kroemer 2004).

Otro mecanismo podría ser aquel en el que miembros de la familia Bcl-2 interactúan con proteínas del poro PT para producir la PMME. En concreto, se ha visto, en ensayos basados en liposomas, que Bax podría cooperar con VDAC para formar conductos permeables a citocromo c en la membrana mitocondrial externa (Shimizu, Narita et al. 1999). Más aún, Bax podría interactuar con ANT para formar canales iónicos en la membrana interna mitocondrial (Marzo, Brenner et al. 1998).

De una manera u otra, la PMME precipita la célula a la muerte a través de al menos tres mecanismos:

1) *Desbaratamiento de la cadena de transporte de electrones, de la fosforilación oxidativa, y de la producción de ATP.* Durante décadas, el desbaratamiento de la cadena de transporte de electrones se ha reconocido como un signo claro de muerte celular. Una consecuencia de la pérdida del transporte electrónico sería una caída en la producción de ATP. Sin embargo, aunque dicha caída se ha observado en la apoptosis, a menudo ocurre relativamente tarde en dicho proceso (Bossy-Wetzel, Newmeyer et al. 1998). De hecho, parece ser que el ATP es necesario para eventos tardíos en apoptosis (Eguchi, Shimizu et al. 1997).

2) *Alteración del potencial reducción-oxidación (redox) de la célula.* La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) es capaz de producir apoptosis. La mitocondria es la mayor fuente de producción de anión superóxido en la célula. Los superóxidos y la peroxidación de lípidos aumentan durante la apoptosis inducida por una variedad de estímulos (Bredesen 1995).

3) *Liberación de proteínas del espacio intermembranal de la mitocondria:* liberación de proteínas capaces de activar los programas de apoptosis directamente. Dichas proteínas inducen apoptosis bien activando caspasas y nucleasas o bien neutralizando inhibidores citosólicos de este proceso. Algunas de estas proteínas son (Fig.6):

Citocromo c: Durante la apoptosis el citocromo c es liberado de la mitocondria e induce la activación de caspasas. Diversos estímulos apoptóticos pueden ejercer sus

efectos sobre la mitocondria y provocar la liberación del citocromo c. Una vez liberado al citosol, el citocromo c se une a la proteína Apaf-1, permitiendo la unión del nucleótido dATP o ATP. La unión de este nucleótido al complejo Apaf-1 – citocromo c provoca su oligomerización para formar el llamado apoptosoma, el cual recluta a la procaspasa-9. La unión de la procaspasa-9 al apoptosoma forma la holoenzima caspasa-9 que es capaz de cortar y activar caspasas efectoras, como la caspasa-3. Por tanto, la liberación del citocromo c de la mitocondria lleva a la célula a la muerte bien rápidamente por apoptosis mediante un mecanismo que implica la activación de caspasas por medio de Apaf-1, como acabamos de describir, o bien lentamente por un proceso de necrosis debido al colapso de la cadena de transporte de electrones, lo cual ocurre cuando el citocromo c es eliminado de la mitocondria, dando como resultado una serie de secuelas incluyendo la generación de radicales libres de oxígeno y un descenso en la producción de ATP.(Wang 2001; van Loo, Saelens et al. 2002).

AIF (Apoptosis Inducing Factor): AIF es un flavoproteína que posee una señal de localización mitocondrial y otra nuclear, aunque normalmente está confinada en el espacio intermembrana de la mitocondria, pero que se transloca al núcleo en respuesta a estímulos apoptogénicos produciendo fragmentación del ADN y condensación periférica de la cromatina. AIF también da como resultado cambios característicos de la apoptosis como disipación del potencial de membrana o exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular. Sin embargo, ninguno de estos efectos producidos por AIF son dependientes de caspasas. AIF actúa de manera independiente al apoptosoma.(Susin, Lorenzo et al. 1999; Susin, Daugas et al. 2000; Joza, Susin et al. 2001).

Smac/DIABLO: La proteína XIAP es capaz de unirse y secuestrar a la caspasa-3 activa, así como a la caspasa-9 en el apoptosoma, inhibiendo de esta manera la activación de las caspasas y bloqueando la cascada proteolítica (Bratton, Walker et al. 2001). Uno de los antagonistas de XIAP es la proteína mitocondrial Smac/DIABLO, la cual se transloca al citosol tras la activación del mecanismo de apoptosis. Smac/DIABLO también es capaz de unirse e inactivar otras proteínas IAPs (ej. c-IAP1, c-IAP2, survivina y Op-IAP) (Du, Fang et al. 2000; Verhagen, Ekert et al. 2000). Igualmente es capaz de inducir apoptosis independientemente de su capacidad para unirse a los IAPs. Se ha visto que una variante de Smac llamada Smac β que carece de la señal de localización mitocondrial y de la habilidad de unirse a IAPs es capaz de inducir apoptosis, aunque el mecanismo es aun desconocido (Roberts, Merrison et al. 2001).

Omi/HtrA2: Es una serin-proteasa que reside en el espacio intermembrana de la mitocondria y que tras un estímulo apoptótico como anti-FAS, TRAIL, estaurosporina o radiación UV, es capaz de salir de la mitocondria e interactuar con las proteínas IAPs citosólicas de manera similar a como lo hace Smac/DIABLO (Suzuki, Imai et al. 2001; Hegde, Srinivasula et al. 2002). Es, por tanto, capaz de promover la activación de caspasas como la -3 o la -9. Sin embargo, al igual que Smac/DIABLO, Omi posee la capacidad de inducir apoptosis independientemente de la activación de las caspasas o de

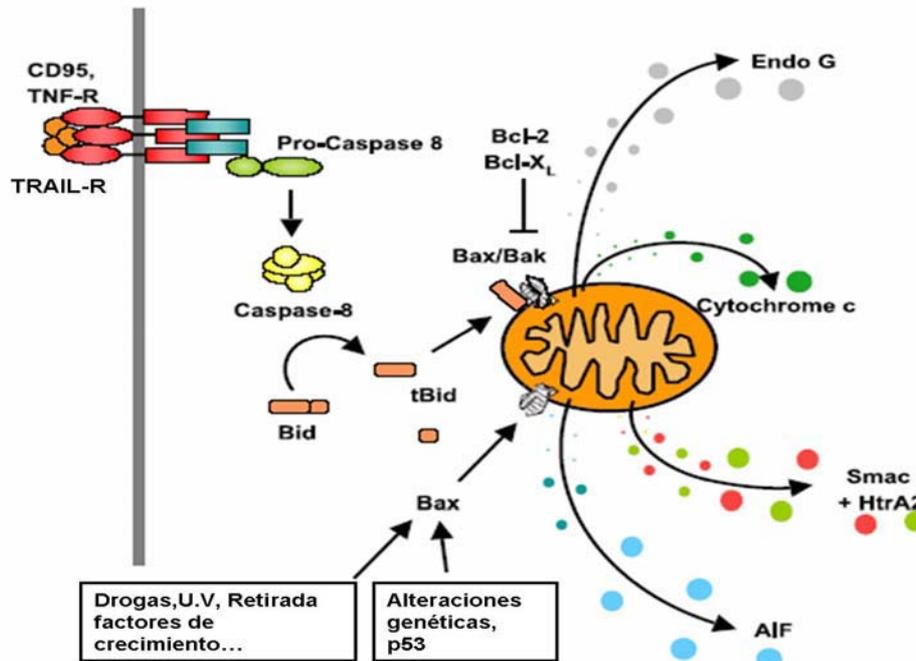


Figura 6. Liberación de proteínas de la mitocondria tras PMME. Adaptado de Sharpe, J.C. et al Bioch Biophy Acta 2003.

su interacción con proteínas IAPs. Dicha capacidad reside en su dominio catalítico serin-proteasa (Verhagen, Silke et al. 2002). Se ha propuesto además, otro mecanismo de acción diferente de los dos anotados anteriormente, y que tendría relación con la posesión, en su extremo carboxi-terminal, de un dominio PDZ (Faccio, Fusco et al. 2000).

Endonucleasa G: Esta es otra proteína liberada de la mitocondria durante la apoptosis inducida por TNF, anticuerpos anti-Fas o radiación UV, y que se transloca al núcleo donde se ha visto involucrada en la fragmentación del ADN. Dicha fragmentación se ha visto que es independiente de la activación de caspasas (Li, Luo et al. 2001). Es probable que dicha proteína necesite de otras nucleasas o cofactores para llevar a cabo su función (Thomson 2001).

A parte de las citadas, otras proteínas también liberadas de la mitocondria, al menos en ciertos tipos celulares, y que pueden contribuir al proceso apoptótico son por ejemplo procaspasas (-2,-3,-8,-9) y caspasas activas como la -7.

La liberación al citosol de todas o algunas de estas proteínas residentes en el espacio intermembrana de la mitocondria, ocurre tras la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, y no está claro si todas son liberadas simultáneamente. Es posible que dichas proteínas sean diferencialmente secuestradas en el espacio intermembrana y que eventos secundarios sean necesarios para la liberación de algunas de ellas (Ott, Robertson et al. 2002; Scorrano, Ashiya et al. 2002).

3.2.2 Familia de proteínas bcl-2. BID

Los miembros de la familia Bcl-2 (B leukemia/lymphoma 2) la componen alrededor de 20 proteínas homólogas en mamíferos. Estudios genéticos y bioquímicos en diferentes organismos incluidos mamíferos, *D.melanogaster* y *C.elegans* indican que estas proteínas son reguladores esenciales de la apoptosis. Sin embargo, cómo estas proteínas regulan la apoptosis es todavía objeto de estudio.

Los miembros de Bcl-2 se caracterizan por que poseen al menos uno de los dominios de homología de Bcl-2 conocidos como dominios BH y se pueden clasificar en tres grupos (Fig.7):

1.Clase 1: miembros anti-apoptóticos.

Poseen de tres a cuatro de los llamados dominios BH, los cuales son necesarios para su función anti-apoptótica. A este grupo pertenecen las proteínas Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1/Bfl-1, Boo/Diva/Bcl-B y Mcl-1. Los dominios BH1-BH4 intervienen en las interacciones con otras proteínas de la familia y con moléculas que están localizadas en la cara citoplasmática de las membranas intracelulares, como por ejemplo, la membrana mitocondrial externa, el retículo endoplasmático y la envuelta nuclear. Los dominios BH1-BH3 forman un surco hidrofóbico, mientras que el BH4 N-terminal estabilizaría dicha estructura (Petros, Medek et al. 2001). Este surco hidrofóbico puede unir la α -hélice del dominio BH3 de un proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2 (Sattler, Liang et al. 1997). En condiciones fisiológicas normales, no todas las proteínas con un BH3 pueden interactuar con el surco hidrofóbico de los Bcl-2 anti-apoptóticos, es necesario que los miembros “solo BH3” y los “tipo Bax” (ver más adelante) expongan

su dominio BH3 tras una modificación post-traducciona l y/o un cambio conformacional. Los Bcl-2 antiapoptóticos, sin embargo, mantienen este dominio como una parte integral del surco hidrofóbico (Conus, Kaufmann et al. 2000).

A pesar de que los miembros anti-apoptóticos son fundamentalmente inhibidores de la apoptosis, es posible que, como respuesta a ciertos estímulos apoptóticos, los factores Bcl-2 de esta clase puedan ser convertidos en proteínas pro-apoptóticas tras por ejemplo eliminación por proteólisis de dominio BH4 N-terminal (Cheng, Kirsch et al. 1997; Lindenboim, Yuan et al. 2000) o tras un cambio conformacional provocado tras su unión a otras proteínas (Lin, Kolluri et al. 2004) . Existen también especulaciones sobre el posible rol de la proteína Bcl-2 en la regulación de la activación de varias caspasas iniciales como la caspasa-2 que parece que actúa por encima o independientemente de la liberación de citocromo c de la mitocondria (Cory and Adams 2002).

2. Clase 2: miembros pro-apoptóticos tipo Bax.

Estos miembros Bcl-2 juegan un papel fundamental en la señalización de la apoptosis. Estudios en los que se han utilizado modelos animales o cultivos celulares, demuestran que la disminución o inactivación de los miembros pro-apoptóticos tipo Bax es común en varios tipos de tumores humanos (Bargou, Wagener et al. 1996; Beerheide, Tan et al. 2000; Kondo, Shinomura et al. 2000). Los miembros tipo Bax contienen los dominios BH1-BH3. Son exclusivamente pro-apoptóticos y a esta clase pertenecen las proteínas Bax, Bak, y Bok/Mtd. Mientras que el patrón de expresión de Bax y Bak es amplio (Krajewski, Krajewska et al. 1994; Krajewski, Krajewska et al. 1996), la expresión de Bok parece estar restringida a tejidos reproductores (Hsu, Kaipia et al. 1997). Estudios genéticos en ratones muestran que Bax o Bak son esenciales para la apoptosis en muchos tipos celulares (Lindsten, Ross et al. 2000; Zong, Lindsten et al. 2001). Los ratones deficientes para *bax* o *bak* se desarrollan normalmente y no presentan efectos obvios en la muerte celular (Knudson, Tung et al. 1995; Lindsten, Ross et al. 2000). Sin embargo, ratones doble deficientes para *bax* y *bak*, muestran múltiples defectos en el desarrollo (Lindsten, Ross et al. 2000), y células que carecen de ambas proteínas no sufren apoptosis inducida por miembros tipo solo BH3 (Zong, Lindsten et al. 2001). La presencia por tanto, de Bax o Bak es fundamental para la apoptosis en muchos tipos celulares. Probablemente, ambas proteínas tengan una redundancia funcional, aunque algunos autores postulan que dichas proteínas no tienen

la misma función y podrían ser más o menos importantes en función del estímulo apoptótico sufrido por la célula (Cartron, Juin et al. 2003).

En cuanto a su mecanismo de acción, se sabe que la cola C-terminal de Bax está plegada hacia atrás en el bolsillo hidrofóbico, evitando así la inserción de Bax en membranas, y la retracción de esta cola C-terminal tras un estímulo apoptótico resulta en la translocación de Bax a la mitocondria (Nechushtan, Smith et al. 1999). Por otra parte, Bak y Bok están siempre unidos a membranas en células sanas por lo que no necesitan translocarse (Griffiths, Dubrez et al. 1999). Una vez adheridos en la membrana mitocondrial, los miembros pro-apoptóticos tipo Bax, sufren un cambio conformacional que los activa y que los lleva a insertarse de manera estable en la membrana (Borner 2003) . Una vez insertadas, estas proteínas formarían canales o interaccionarían con proteínas formadoras de canales (ver más arriba) para aumentar la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa, aunque éste es todavía un tema controvertido. La oligomerización de los miembros de esta familia para ejercer su función pro-apoptótica es también aún materia de debate (Borner 2003).

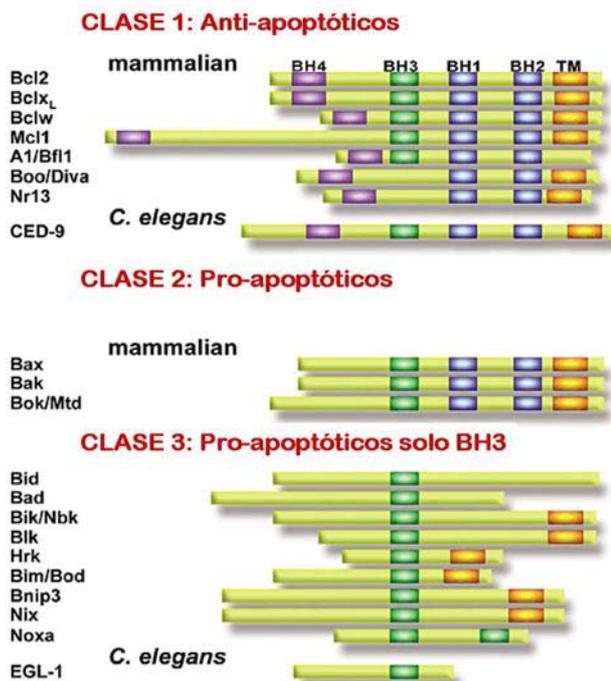


Figura 7. Miembros de la familia Bcl-2. Adaptado de Korsmeyer, S. Nature Genetics jun 2001.

Se ha observado otro papel para Bax y Bak en la homeostasis del Ca²⁺ en el retículo endoplasmático (RE) (Scorrano, Oakes et al. 2003). Ambas moléculas se localizan también en el RE y median en la apoptosis disparada en respuesta a agentes que liberan Ca²⁺ del RE. Bcl-2 también se ha visto que se localiza en el RE lo que sugiere que podría regular la función de Bax y Bak en este orgánulo.

Bax y Bak también se han visto implicados en apoptosis mediada por receptores de muerte. En concreto, se ha visto que TRAIL (miembro de la familia de TNF) induce liberación de citocromo c y apoptosis en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) salvajes, *bid*^{-/-}, *bax*^{-/-}, o *bak*^{-/-} pero no en MEF doble deficientes para *bax* y *bak*. Es interesante, sin embargo, que, al contrario que

con citocromo c, la liberación de Smac/DIABLO inducida por TRAIL estaba bloqueada en MEF *bid*^{-/-}, *bax*^{-/-}, *bak*^{-/-} o doble deficientes para *bax* y *bak*, sugiriendo que Bak y Bax regulan de manera diferente la liberación de citocromo c y Smac/DIABLO de la mitocondria (Kandasamy, Srinivasula et al. 2003).

Como se ha explicado anteriormente, los miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, a pesar de que el mecanismo de acción sigue siendo objeto de estudio, actuarían provocando la permeabilización de la membrana mitocondrial, posiblemente tras su oligomerización (Borner 2003), bien tras la formación de un canal nuevo (Schlesinger, Gross et al. 1997), aumentando la permeabilidad del poro PT (Tsujimoto and Shimizu 2000; Zamzami and Kroemer 2001) o formando aperturas supramacromoleculares en la membrana mitocondrial externa distintos de los canales proteicos discretos (Kuwana, Mackey et al. 2002).

3. Clase 3: miembros pro-apoptóticos solo BH3

Estos miembros de la familia Bcl-2 solamente comparten, entre ellos mismos y con otros miembros de la familia, el dominio BH3. Unos 10 miembros han sido identificados en mamíferos entre ellos Bad, Bik, Bim, Bid, Blk y Hrk (Huang and Strasser 2000). Las proteínas solo BH3 actúan por encima de los miembros pro-apoptóticos tipo Bax, ya que no son capaces de inducir muerte celular en ausencia de estos últimos (Zong, Lindsten et al. 2001). Los solo BH3 han sido descritos como sensores y mediadores de la apoptosis, ya que podrían transmitir señales de muerte diferentes y específicas a los miembros de la familia Bcl-2 que poseen varios dominios BH. Por ejemplo, Bim es importante para la muerte de linfocitos tras la privación de citoquinas (Bouillet, Metcalf et al. 1999), Bmf es necesario en anoikis (Puthalakath, Villunger et al. 2001), y Noxa y Puma parecen mediar en la apoptosis inducida por p53 como consecuencia de un daño al ADN (Oda, Ohki et al. 2000; Nakano and Vousden 2001).

Con la excepción de Bid y probablemente también de Bim, se piensa que su forma de actuar es uniéndose y neutralizando a los miembros anti-apoptóticos de Bcl-2 (Cory and Adams 2002). Bid podría también podría actuar inactivando a estos miembros anti-apoptóticos, pero además, podría directamente activar a Bax y Bak en la señalización de la apoptosis para la liberación de citocromo c (Wei, Lindsten et al. 2000; Grinberg, Sarig et al. 2002). Los resultados sobre Bim son contradictorios, ya que se ha visto que es capaz de interactuar y antagonizar la función de Bcl-2 y Bcl-x_L,

pero parece que no es capaz de interactuar con Bax o Bak, aunque el dominio BH3 aislado del resto de la proteína Bim, es capaz de inducir la oligomerización de Bax y Bak para la liberación de citocromo c, de la misma forma en que lo hace por ejemplo el dominio BH3 de Bid (Letai, Bassik et al. 2002). Además, se ha sugerido que Bim podría actuar interactuando y activando directamente VDAC (Sugiyama, Shimizu et al. 2002) o dañando, junto con Bax, la membrana mitocondrial directamente (Yamaguchi and Wang 2002).

En células de mamífero sanas, las proteínas solo BH3 permanecen inactivas (Cory and Adams 2002), y en respuesta a una señal pro-apoptótica, aumenta su transcripción y/o se modifican post-traduccionalmente, o relocalizan, para ganar su actividad pro-apoptótica. Bad es regulado por fosforilación: Bad fosforilado es secuestrado por proteínas 14-3-3 y solo cuando es desfosforilado puede interactuar con miembros anti-apoptóticos Bcl-2 e inhibir su acción (Wang, Pathan et al. 1999). La proteína Bik también es regulada por fosforilación. Por otra parte, Bim y Bmf permanecen inactivos debido a que están secuestrados en el citoesqueleto (Puthalakath, Huang et al. 1999; Puthalakath, Villunger et al. 2001). Tras la retirada de citoquinas (Bim) o la falta de matriz extracelular (Bmf) estas moléculas son liberadas del citoesqueleto permitiendo la unión e inactivación de los factores antiapoptóticos Bcl-2.

BID (BH3 interacting domain death agonist)

Bid es un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 (Wang, Yin et al. 1996) que en condiciones normales se localiza en el citoplasma o como proteína periférica de la membrana mitocondrial y que tras su corte por diferentes proteasas se trasloca a la mitocondria. Como hemos dicho, Bid puede ser activado por múltiples proteasas como la caspasa-8 (Luo, Budihardjo et al. 1998), la caspasa-3 (Woo, Hakem et al. 1999; Engels, Stepczynska et al. 2000), proteasas lisosomales (Stoka, Turk et al. 2001), calpaina (Chen, He et al. 2001) y por granzima B (Heibein, Goping et al. 2000) en respuesta a varios estímulos de muerte, dando como resultado un fragmento C-terminal de 15kDa o de 13kDa (Li, Zhu et al. 1998; Slee, Keogh et al. 2000). Parece ser que el fragmento N-terminal de 7kDa que queda también tras el corte, estaría actuando de alguna manera inhibiendo la actividad proapoptótica de BID (Tan, Tan et al. 1999), ya que se ha visto que el fragmento p15 tiene muchísima más capacidad de inducir liberación de citocromo c que la proteína completa. Sin embargo, estudios de resonancia magnética nuclear multidimensional indican que el BID cortado y el no cortado tienen aproximadamente la misma conformación en solución sugiriendo que los fragmentos p7

y p15 permanecen juntos formando un complejo no covalente tras el corte (Chou, Li et al. 1999). Experimentos con BID recombinante cortado con caspasa-8 *in vitro* (Zha, Weiler et al. 2000) apoyan esta teoría. De cualquier manera, una vez cortado, cBID (de Bid cortado) se transloca a la mitocondria provocando la permeabilización de la misma y la liberación de factores apoptogénicos como citocromo c y Smac/DIABLO (van Gurp, Festjens et al. 2003).

BID está formado por 8 α -hélices: dos centrales hidrofóbicas (H6 y H7) potenciales formadoras de poros, rodeadas por 6 hélices anfipáticas. El dominio BH3 estaría fijado por enlaces hidrofóbicos a las hélices H1 y H8. Se ha visto que su dominio BH3 es fundamental para la unión a miembros pro y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 y para su función pro-apoptótica. Sin embargo, no es necesario para su translocación a la mitocondria: solo las hélices H4, H5 y H6 son necesarias para su inserción en la mitocondria (Lutter, Fang et al. 2000). Aunque Bid se ha encontrado en otros orgánulos celulares como retículo endoplasmático o envuelta nuclear (Gajkowska, Wojewodzka et al. 2004), fundamentalmente se transloca a la mitocondria tras un estímulo apoptótico. En concreto, se ha visto que tiene preferencia por los sitios de contacto mitocondriales (Lutter, Perkins et al. 2001), aunque no solo se encuentra en estos sitios (Kim, Zhao et al. 2004). La cardiolipina es un fosfolípido ácido característico de estos sitios de contacto (Ardail, Privat et al. 1990). Se ha visto que la cardiolipina podría jugar un papel fundamental en la localización de cBid en la mitocondria (Lutter, Fang et al. 2000; Zha, Weiler et al. 2000; Lutter, Perkins et al. 2001; Epanand, Martinou et al. 2002).

Una vez en la mitocondria, cBid provocaría la liberación de citocromo c y Smac/DIABLO. Cómo ocurre esto, es aún un tema muy controvertido. Debido a que BID puede interactuar, a través de su dominio BH3, con otros miembros de la familia Bcl-2, se ha propuesto que podría actuar inhibiendo la actividad de los miembros anti-apoptóticos de la familia como Bcl-2 o Bcl-x_L (Wang 2001). También su interacción con los miembros apoptóticos Bax (Wang, Yin et al. 1996; Desagher, Osen-Sand et al. 1999; Eskes, Desagher et al. 2000) o Bak (Wei, Lindsten et al. 2000), llevaría a la activación de éstos, a su oligomerización y, por último a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, liberándose los factores apoptogénicos. Sin embargo, actualmente se propone que cBID no provoca él sólo la oligomerización de Bax, si no que es necesario otro factor proteico mitocondrial para dicha oligomerización (Roucou, Montessuit et al. 2002; Roucou, Rostovtseva et al. 2002). Otro posible mecanismo de acción de cBID sería la formación de canales en la membrana mitocondrial externa por

homologomerización del propio BID, aunque dicho mecanismo solo se ha visto *in vitro* (Grinberg, Sarig et al. 2002). También se ha postulado el que BID pueda provocar una reorganización de la membrana mitocondrial desestabilizando su estructura en bicapa y favoreciendo así la liberación de los productos del espacio intermembrana (Gong, Choi et al. 2004; Kim, Zhao et al. 2004; Oh, Barbuto et al. 2005). Probablemente el mecanismo de acción de BID implique tanto a proteínas de la familia Bcl-2 como a los lípidos mitocondriales, tal como describe T. Kuwana y col. que sugiere que la liberación de proteínas de la mitocondria durante la apoptosis podría estar mediada por la formación de complejos supramacromoleculares en la membrana mitocondrial externa, promovidos por interacciones BH3/Bax/lípidos y directamente inhibidos por Bcl-x_L (Kuwana, Mackey et al. 2002).

Bid es importante en la homeostasis así como en la supresión tumoral (Zinkel, Ong et al. 2003). Es necesario también para la apoptosis disparada por receptores de muerte en hepatocitos (Yin, Wang et al. 1999; Li, Zhao et al. 2002). Además, probablemente Bid necesite de Bax o Bak para ejercer su efecto pro-apoptótico disparado por diferentes estímulos, tal como demuestran ensayos con células deficientes para Bax y Bak (Wei, Zong et al. 2001).

La regulación, por tanto, de la función apoptótica de Bid es un elemento fundamental en el organismo. El gen Bid está regulado por p53 (Sax, Fei et al. 2002), indicando que Bid podría ser un gen “quimiosensible” que aumentaría la muerte celular en respuesta a quimioterapia, ya que p53 tiene un papel fundamental en la supresión de tumores en parte debido a su habilidad de regular la transcripción de genes tras estrés celular o genotóxico (Ryan, Phillips et al. 2001). Se sabe que la proteína Bid posee al menos 4 formas diferentes de ajuste con diferentes capacidades apoptóticas (Renshaw, Dempsey et al. 2004). Aparte de esta posible forma de regulación por ajuste, la forma más conocida de regular la actividad de Bid es a través del corte de la proteína completa inactiva, en otra cortada y activa. También es conocido que cBid, tras su ubiquitinación es degradado en el proteasoma (Breitschopf, Zeiher et al. 2000). Otras modificaciones post-traduccionales incluyen la miristilación de un residuo de glicina en una secuencia consenso que se desenmascara tras el corte por caspasa-8 y que provoca su translocación a la mitocondria así como un aumento de su actividad pro-apoptótica *in vivo* (Zha, Weiler et al. 2000). También la fosforilación de Bid podría jugar un papel en la regulación de su actividad apoptótica: las enzimas casein quinasa I y II se ha visto que son capaces de fosforilar Bid en los residuos próximos al sitio de corte por caspasas

u otras proteasas impidiendo o dificultando así su corte por estas proteasas (Desagher, Osen-Sand et al. 2001; Degli Esposti, Ferry et al. 2003).

En resumen, el balance entre factores pro y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 parece ser determinante para el destino de la célula. Y por lo tanto, la desregulación de los miembros de la familia Bcl-2 ha sido asociada fuertemente a la tumorigénesis (Strasser, Huang et al. 1997). Todos los miembros anti-apoptóticos de Bcl-2 parecen funcionar como oncoproteínas, y los pro-apoptóticos pueden actuar como supresores tumorales. El desarrollo de terapias antitumorales cuya diana sean los miembros de la familia Bcl-2 es el objetivo de muchos grupos de investigación. Sus trabajos siguen principalmente tres estrategias: i) la disminución de los niveles de los miembros anti-apoptóticos mediante interferencia con sus ARNm; ii) Inhibir la función a nivel de proteína de los miembros anti-apoptóticos a través del uso de compuestos que se unan a estos Bcl-2; iii) inducción de apoptosis mediante la introducción de moléculas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2 o péptidos mimetizadores del dominio BH3 (Letai, Bassik et al. 2002; Walensky, Kung et al. 2004). Se ha propuesto que el bloqueo funcional de los miembros Bcl-2 anti-apoptóticos o la sobre-expresión de los pro-apoptóticos podría restaurar la maquinaria apoptótica en células tumorales y/o sensibilizar dichos tumores a quimio y radioterapias.

3.3 Ruta de los receptores de muerte o ruta extrínseca de apoptosis.

Los receptores de muerte son proteínas transmembrana tipo I que conectan señales extracelulares inductoras de muerte con la apoptosis intracelular. Pertenecen a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) (Fig.8). Se caracterizan porque en la parte intracelular contienen un dominio de interacción con otras proteínas denominado dominio de muerte (DD). Dicho dominio consta de unos 80 aminoácidos y es fundamental para la transmisión del impulso apoptótico, y sirven de anclaje para una serie de proteínas señalizadoras que también poseen un dominio DD. Otros de los miembros de la superfamilia no poseen este dominio DD, y por ello, pueden funcionar como inhibidores de la función apoptótica de los receptores de muerte. El sistema resulta aún más complicado cuando se comprueba la existencia de receptores solubles de esta familia, que presumiblemente funcionan también como inhibidores (Gruss y Dower, 1995).

Además del DD en la parte intracelular, los receptores de muerte poseen, en su parte extracelular, entre dos y cuatro dominios ricos en cisternas (CRDs) a los que se les unen los ligandos específicos. Los ligandos de estos receptores, llamados ligandos de muerte, también pertenecen a la superfamilia de TNF y se caracterizan porque son proteínas de membrana tipo II (extremo C-terminal en el espacio intracelular). Se unen a sus receptores a través de una región de unos 150 aa en el extremo C-terminal

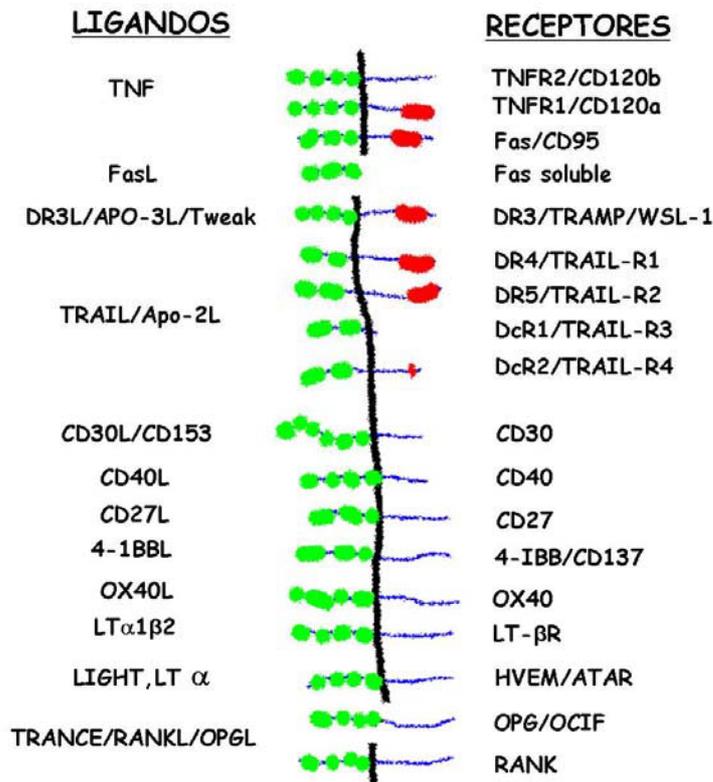


Figura 8. Ligandos y receptores de la familia de TNF. En verde se representan los dominios ricos en cisternas (CRDs) y en rojo los dominios de muerte

denominada dominio de homología a TNF (THD) (Bodmer, Schneider et al. 2002). La mayoría de los ligandos de muerte pueden existir como solubles y ser funcionales.

Los receptores o ligandos de muerte son funcionales cuando están acoplados formando un multímero a través de puentes disulfuro entre los CRDs o los THD (Banner, D'Arcy et al. 1993). La unión de los ligandos a los receptores provoca su activación, y aunque los receptores de muerte pueden inducir proliferación e incluso movilidad e invasividad al menos bajo ciertas circunstancias (Algeciras-Schimmich, Barnhart et al. 2002; Barnhart, Legembre et al. 2004), la capacidad de estos receptores de inducir apoptosis es crucial en diferentes enfermedades.

3.3.1 TRAIL y sus receptores de muerte:

TRAIL pertenece a la familia de citoquinas de TNF. Al contrario que otros miembros de la familia cuya expresión es muy restringida, el ARNm de TRAIL se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos humanos (Wiley, Schooley et al. 1995). Existen grandes esperanzas depositadas en el uso de TRAIL como agente terapéutico contra el cáncer ya que se ha visto que TRAIL es capaz de inducir la muerte en distintos tipos de células tumorales y no en células normales (Walczak, Miller et al. 1999).

Los receptores de TRAIL son 5: uno soluble (Osteoprotegerina) y 4 de membrana. De estos 4 de membrana, 2 de ellos tienen DD: TRAIL-R1 y TRAIL-R2 (DR4 y DR5). Los otros dos (uno transmembrana, TRAIL-R4, y otro unido mediante glicofosfatidilinositol, TRAIL-R3), son incapaces de transmitir señales de muerte, por tener un DD truncado (R4) o no tener región citosólica (R3).

Apoptosis disparada por TRAIL

Cuando los homotrímeros de TRAIL se unen a sus receptores proapoptóticos, éstos se agregan formando homo o heterodímeros (Kischkel, Lawrence et al. 2000; Sprick, Weigand et al. 2000). La trimerización permite el reclutamiento de proteínas citoplasmáticas específicas en el DD intracelular del receptor, formando el complejo inductor de señales de muerte (DISC). En el DISC se reclutan la proteína adaptadora FADD a través de su DD. FADD a su vez posee otro dominio de interacción proteína-proteína en el extremo N-terminal denominado dominio efector de muerte (DED). Dicho dominio es necesario para el reclutamiento de la caspasa-8 o 10 a través de sus dominios DED. Las caspasas en el DISC son capaces de activarse, y una vez activas pueden activar directamente caspasas efectoras (caspasa-3 y -7) o cortar a Bid para activar la ruta mitocondrial de apoptosis (Sprick, Weigand et al. 2000). Así, se puede decir que las células sensibles a TRAIL se pueden clasificar en tipo I o II en función de que necesiten la ruta mitocondrial de apoptosis o no para inducir muerte celular. En general, se han definido dos tipos de células en función de que sea necesaria la activación de la ruta mitocondrial para la inducción efectiva de la muerte celular tras la activación de receptores de muerte. Las células tipo I no necesitarían de la ruta mitocondrial. En las tipo II, sí sería necesario (Scaffidi, Fulda et al. 1998). En células sensibles a TRAIL, si necesitan la vía mitocondrial, la caspasa-8 activada es capaz de cortar y activar a Bid, que se transloca a la mitocondria y induce la liberación de

receptores señuelo y la resistencia a TRAIL. Existen otros mecanismos intracelulares inhibidores de la apoptosis inducida por este ligando. Algunos ejemplos de inhibidores intracelulares de la apoptosis son los miembros anti-apoptóticos de Bcl-2 (Ruiz de Almodovar, Ruiz-Ruiz et al. 2001; Fulda, Meyer et al. 2002), cFLIP (Thome, Schneider et al. 1997; Griffith, Chin et al. 1998; MacFarlane, Harper et al. 2002; Siegmund, Hadwiger et al. 2002) o los IAPs (MacFarlane, Merrison et al. 2002; Leverkus, Sprick et al. 2003). Las señales antiapoptóticas inducidas por NF- κ B (Oya, Ohtsubo et al. 2001; Ravi, Bedi et al. 2001), PKB/Akt (Yuan and Whang 2002), PKCs (Guo and Xu 2001; Sarker, Ruiz-Ruiz et al. 2001) o MAPK (Tran, Holmstrom et al. 2001) también están implicadas en la resistencia a la apoptosis inducida por TRAIL. Por tanto, el estudio de cómo estas rutas están regulando la apoptosis por TRAIL es fundamental para el abordaje del tratamiento en patologías tales como el cáncer.

4. Proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK)

La proliferación celular y la apoptosis son dos procesos íntimamente ligados. Las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) son clave en la transmisión de señales implicadas tanto en apoptosis como en proliferación.

Las MAPK son una familia de proteínas quinasas cuya función y regulación se ha conservado durante la evolución desde organismos unicelulares, como la levadura de la cerveza, hasta organismos más complejos, como el ser humano (Widmann, Gibson et al. 1999). Las MAPK fosforilan específicamente serinas y treoninas de proteínas sustrato y se encargan de regular gran cantidad de funciones celulares como expresión de genes, mitosis, movimiento, metabolismo, y apoptosis. La fosforilación de un determinado sustrato por parte de las MAPK hace que la actividad de dicha proteína se induzca o reprima. Sustratos de MAPK son por ejemplo, otras proteínas quinasas, fosfolipasas, factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto.

Las MAPK son activadas por fosforilación de dos sitios específicos cerca del bolsillo catalítico de la enzima. La eliminación de estos fosfatos mediante la acción de las MAP quinasas fosfatasas (MKPs), devuelve las MAPK a su estado inactivo. La duración y el grado de activación de las MAPK dependen del delicado balance entre señales de activación y de mecanismos de inactivación.

En organismos multicelulares existen tres subfamilias de MAPK bien caracterizadas (Fig. 10). Son las quinasas reguladas por señales extracelulares ERK1 y ERK2; las quinasas c-Jun NH₂-terminal, JNK1, JNK2, JNK3 y JNK4; y las cuatro enzimas p38: p38 α , p38 β , p38 γ y p38 δ . La activación de las quinasas JNK y p38 está generalmente asociada con la inducción de apoptosis. Otras MAPK, como ERK5 y ERK7, han sido identificadas pero todavía no están bien caracterizadas (Johnson and Lapadat 2002).

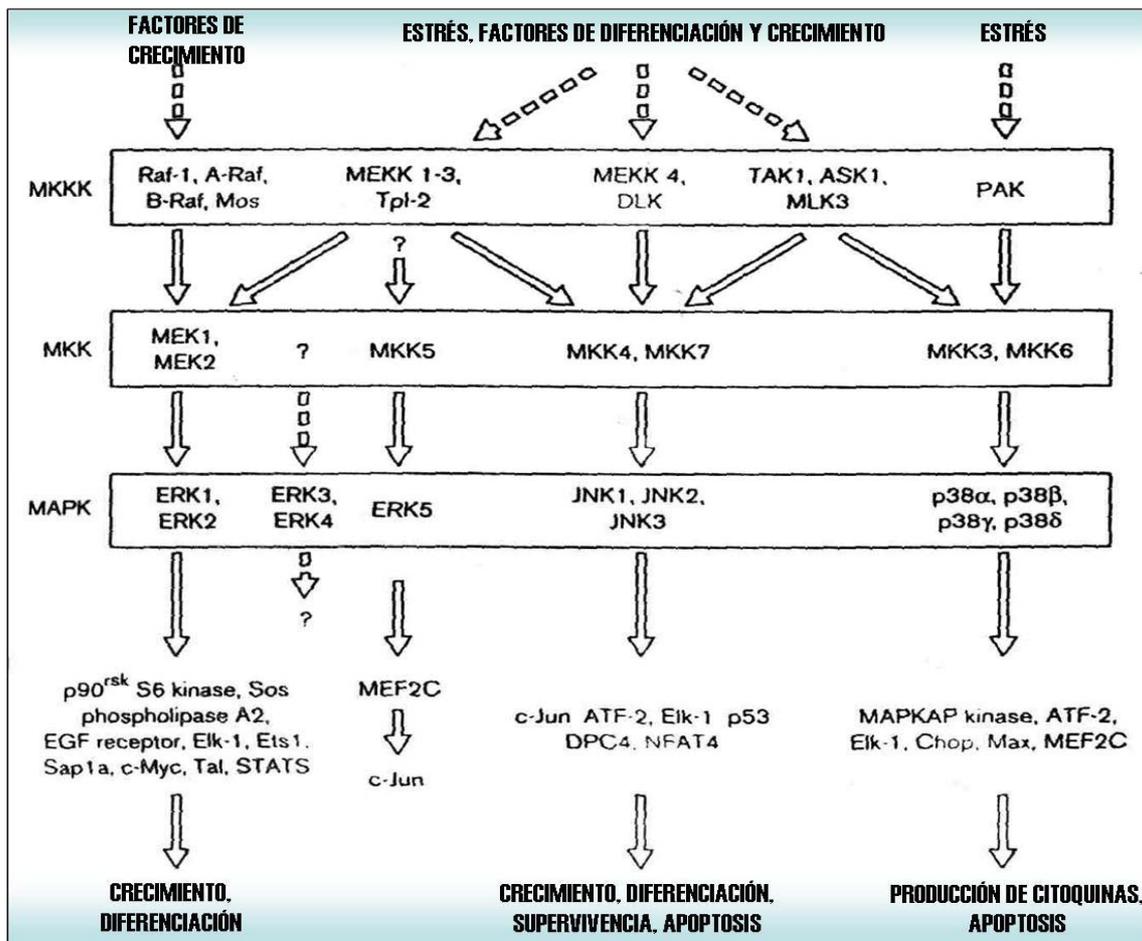


Figura 10. Clasificación de las principales rutas de MAPK. Adaptado de Garrington T. et al, Current Opinion in Cell Biology 1999, 11:211-218.

Como principio general, varias rutas de señalización diferentes pueden utilizar mecanismos análogos para amplificar sus señales biológicas y mediar diversos efectos en la función celular. Un excelente ejemplo de ello son las rutas de MAPK. Las MAPK constituyen un sistema en cascada que se va amplificando. En esta cascada están implicadas normalmente tres proteínas homólogas, una MAPKKK, una MAPKK y una MAPK. (Santen, Song et al. 2002)

4.1 Vía de ERK

Como hemos dicho anteriormente, las proteínas ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares) pertenecen a la familia de proteínas MAPK. Dentro de esta subclase encontramos dos proteínas, ERK1 y ERK2 que están expresadas ampliamente y se han visto implicadas en gran número de procesos celulares como mitosis, meiosis, funciones post-mitóticas, diferenciación, aprendizaje y memoria en SNC, apoptosis y angiogénesis (Hagemann and Blank 2001; Johnson and Lapadat 2002). Son activadas por diferentes estímulos incluidos factores de crecimiento, citoquinas, interacciones ligando-receptor, infecciones víricas y agentes transformantes y carcinógenos.

Como hemos dicho, los factores de crecimiento (por ejemplo EGF, IGF-1, insulina, o TGF α y β) u otras interacciones ligando-receptor (por ejemplo estrógenos y progesterona, de gran importancia en cáncer de mama) pueden activar la ruta de MAPK tras la unión a sus respectivos receptores. En general, los receptores de estos ligandos actúan a través de la proteína GTP-Ras que interacciona y activa la primera quinasa de la cascada: Raf. En la ruta ERK, la proteína Raf correspondería a la MAPKKK, MEK1 a la MAPKK y ERK1/2 a la MAPK propiamente dicha (Lee and McCubrey 2002; Santen, Song et al. 2002). La desregulación de la expresión de los ligandos o los receptores puede contribuir al desarrollo de neoplasias.

La ruta ERK también puede ser activada por la proteína quinasa C (PKC), la cual se ha visto es un potente activador de Raf-1 (Kolch, Heidecker et al. 1993). Raf-1 fosforila y activa a MEK1/2 que luego fosforila y activa a su vez a ERK1/2. Finalmente, ERK1/2 activa una serie de procesos, todavía no claros del todo, que llevan a la proliferación celular. Como sustratos de ERK1/2 encontramos la proteína quinasa ribosomal S6, la histona-3, HMG-14, estas dos últimas implicadas en el empaquetamiento del ADN en cromatina y que tras su fosforilación podrían hacer accesible determinados sitios del ADN a factores de transcripción. La activación de la ruta ERK puede llevar a la activación de factores de transcripción como CREB, AP-1, NF κ B o la familia Ets (Lee and McCubrey 2002).

La ruta ERK y cáncer

La actividad de la ruta de MAPK ERK1/2 esta aumentada en un gran número de tumores humanos, incluido el cáncer de mama. La hiperexpresión de esta ruta juega un

papel crítico en la iniciación así como en el potencial metastásico de varias formas de cáncer de mama humano (Sivaraman, Wang et al. 1997). Reguladores de la ruta como Ras (Janes, Daly et al. 1994; Li and Sparano 2003), Raf-1 (Callans, Naama et al. 1995) así como PKC (Mackay and Twelves 2003) han sido asociadas con el cáncer de mama. De hecho, la oncoproteína Ras se ha visto que está mutada en aproximadamente el 20% de todos los tumores humanos (Khleif, Abrams et al. 1999). Otros autores, sin embargo, apuntan que la activación anormal de la ruta de MAPK podría responder no solo a la mutación de Ras si no que también podría deberse a un aumento de los receptores de factores de crecimiento en la superficie celular (Xing and Imagawa 1999; Santen, Song et al. 2002).

Así pues, esta ruta de MAPK presenta nuevas oportunidades para el desarrollo de nuevas drogas contra el cáncer, que podrían presentar menos toxicidad frente a células no tumorales. Basándose en esto, diversos grupos han estudiado el papel de diferentes inhibidores de la ruta como potenciales agentes anticancerígenos. Por ejemplo, se han hecho estudios con pequeñas moléculas inhibitoras de la quinasa Raf, así como con inhibidores específicos de MEK como PD184352 o PD98059 que se ha visto que dañan no solo la proliferación celular, sino que también afectan a la diferenciación, la apoptosis y la angiogénesis (Sebolt-Leopold 2000). Algunos de estos compuestos están siendo probados en ensayos clínicos de fase I en pacientes con cáncer (Sebolt-Leopold 2000).

La forma en que la ruta ERK puede estar implicada en procesos tumorales no solo viene dada por su capacidad de promover proliferación celular, también, como se ha mencionado anteriormente, la ruta de MAPK ERK1/2 puede afectar negativamente al mecanismo de apoptosis. Se sabe que inhibe la apoptosis en respuesta a diferentes estímulos como hipoxia (Widmann, Gibson et al. 1998), retirada de factores de crecimiento (Buckley, Driscoll et al. 1999), H₂O₂ (Erhardt, Schremser et al. 1999), agentes quimioterapéuticos (Wang, Martindale et al. 1998), radiación ionizante (Shonai, Adachi et al. 2002) y receptores de muerte (Holmstrom, Schmitz et al. 2000; Sarker, Ruiz-Ruiz et al. 2001; Tran, Holmstrom et al. 2001; Sarker, Ruiz-Ruiz et al. 2002; Soderstrom, Poukkula et al. 2002). Se ha visto que la ruta es capaz de proteger frente a la radiación ionizante en células de leucemia linfocítica afectando al corte de la caspasa-8/Bid y la pérdida de potencial de membrana (Shonai, Adachi et al. 2002). Así mismo otros autores han demostrado el papel inhibitorio de esta ruta en la apoptosis disparada por receptores de muerte. Algunos de estos trabajos postulan que estaría afectando al

corte y activación de la caspasa-8 y Bid (Holmstrom, Schmitz et al. 2000; Tran, Holmstrom et al. 2001; Soderstrom, Poukkula et al. 2002) mientras que otros sugieren que la inhibición ocurriría después de esta activación caspasa8/Bid (Sarker, Ruiz-Ruiz et al. 2001; Sarker, Ruiz-Ruiz et al. 2002; Zhang, Borrow et al. 2003) pero en cualquier caso antes de la permeabilización mitocondrial y la liberación del citocromo c.

La activación de ERK1/2 también puede afectar a miembros de la familia Bcl-2, en concreto se ha visto que puede llevar a la fosforilación de BAD, el cual, tras ser fosforilado, es secuestrado por proteínas de la clase 14-3-3 en el citoplasma inhibiéndose así su actividad pro-apoptótica (Scheid, Schubert et al. 1999). Así mismo, se ha observado que las MAPK protegen tumores de páncreas de la apoptosis regulando la expresión de Bcl-2 (Boucher, Morisset et al. 2000). La misma proteína Bcl-2 se ha descrito que en presencia de nicotina puede ser fosforilada por ERK1/2 inhibiéndose así la apoptosis mediada por etopósido y cisplatino (Mai, May et al. 2003). Otra diana de ERK1/2 parece ser caspasa-9, ya que ERK es capaz de inhibir la apoptosis fosforilando directamente a la caspasa-9 (Allan, Morrice et al. 2003).

Así pues, la ruta de MAPK ERK1/2 se ha convertido en una diana clara para el tratamiento contra el cáncer, entre ellos el cáncer de mama. Sin embargo, aunque hay estudios que muestran un aumento de hasta 2,5 veces la actividad de las MAPK en cánceres de mama, elevaciones de la ruta han sido vistas solo en el 50% de los tumores. Parece ser que no toda célula tumoral tiene un aumento de la actividad MAPK (Santen, Song et al. 2002). Otras aproximaciones terapéuticas también se hacen pues necesarias.

5. Ciclo celular, Quinasas Dependientes de Ciclinas (CDKs) y cáncer

La regulación del ciclo celular es un proceso extremadamente complejo. Brevemente, en la regulación del ciclo celular está implicada la activación de las llamadas quinasas dependientes de ciclinas (CDK), como la CDK1, CDK2, CDK4/6, cuya abundancia es relativamente estable durante el ciclo celular. Las CDKs se encuentran asociadas a las proteínas ciclinas (ej. A, B, E, D1-3) llamadas así debido a que sus niveles varían de forma cíclica durante el ciclo celular. La unión de las ciclinas a las CDKs hace que se active el complejo CDK/ciclina, y esto lleva a la fosforilación, entre otros sustratos, de la proteína del retinoblastoma (Rb) en múltiples sitios (Fig. 11). La proteína Rb está expresada constitutivamente, y desfosforilada se encuentra

formando un complejo con la histona-deacetilasa-1 y el factor de transcripción E2F, de manera que inhibe sus actividades transcriptoras. Factores de crecimiento, a través de la activación de la vía ERK1/2, pueden provocar un aumento en la expresión de la ciclina D1, la cual se une y activa a las CDK4 y 6. Estas CDKs activas fosforilan a la proteína Rb, lo cual provoca la disociación del complejo de la histona-deacetilasa-1 y esto permite la acetilación de histonas lo cual facilita la transcripción de determinados genes, entre ellos de la ciclina E, que va a unirse y activar a la CDK2 y entonces ésta fosforila aún mas a la proteína Rb lo cual provoca la liberación del factor de transcripción E2F, que una vez liberado provoca la expresión de una gran variedad de genes necesarios para el paso del ciclo celular a la fase S. Entre estos genes se encuentran la ADN polimerasa A, dihidrofolato reductasa, timidilato sintasa, y ciclinas. (Sherr 2000).

La actividad de las CDKs, además de por la unión a las respectivas ciclinas, está regulada a otros niveles, incluyendo su localización subcelular y modificaciones post-traduccionales. La fosforilación de treoninas y tirosinas en su extremo N-terminal las

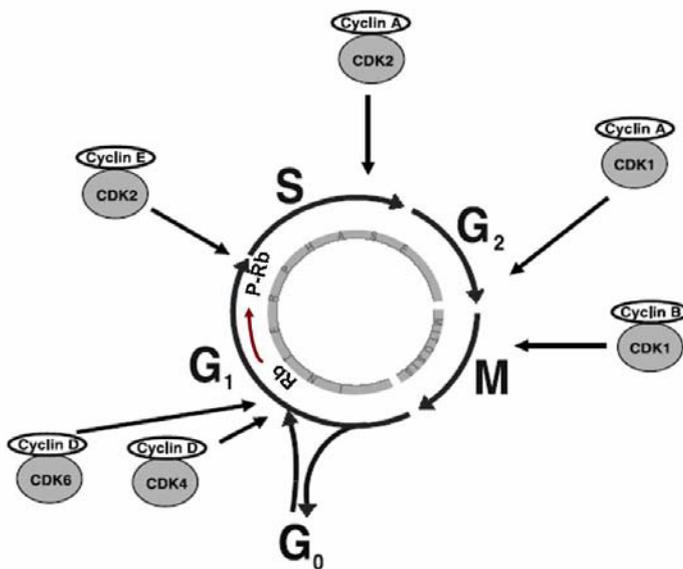


Figura 11. El ciclo celular y su regulación por CDKs/ciclinas.

Por el contrario, la fosforilación por medio de la CDK7-ciclina H de residuos de treoninas centrales, activa a las CDKs (Thr161 de la CDK1, Thr160 de la CDK2, Thr172 de la CDK4 y Thr177 de la CDK6) (Dai and Grant 2003). La defosforilación, por medio de fosfatasas de la familia cdc25, regula

también positivamente la actividad de las CDKs. Además, la actividad de las CDKs esta antagonizada por proteínas inhibidoras de bajo o alto peso molecular como p15, p16, p18, p19, p21, p27 y p57 que se unen a las CDKs e inhiben su actividad. Por tanto, la decisión de una célula de continuar a través del ciclo celular está determinada por una relación extremadamente compleja entre estas influencias positivas y negativas (Fig. 12) (Sherr 2000). En células normales la progresión del ciclo de una fase a la siguiente puede darse solo tras el paso a través de los puntos de control (checkpoints) donde se

comprueba que todos los pasos anteriores, como por ejemplo, la replicación correcta del ADN al final de la fase S, se han producido correctamente. Si estos pasos no han sido ejecutados correctamente, la célula sufre una parada del ciclo, e intenta arreglar estas posibles anomalías. Si esto no fuera posible, por ejemplo si el

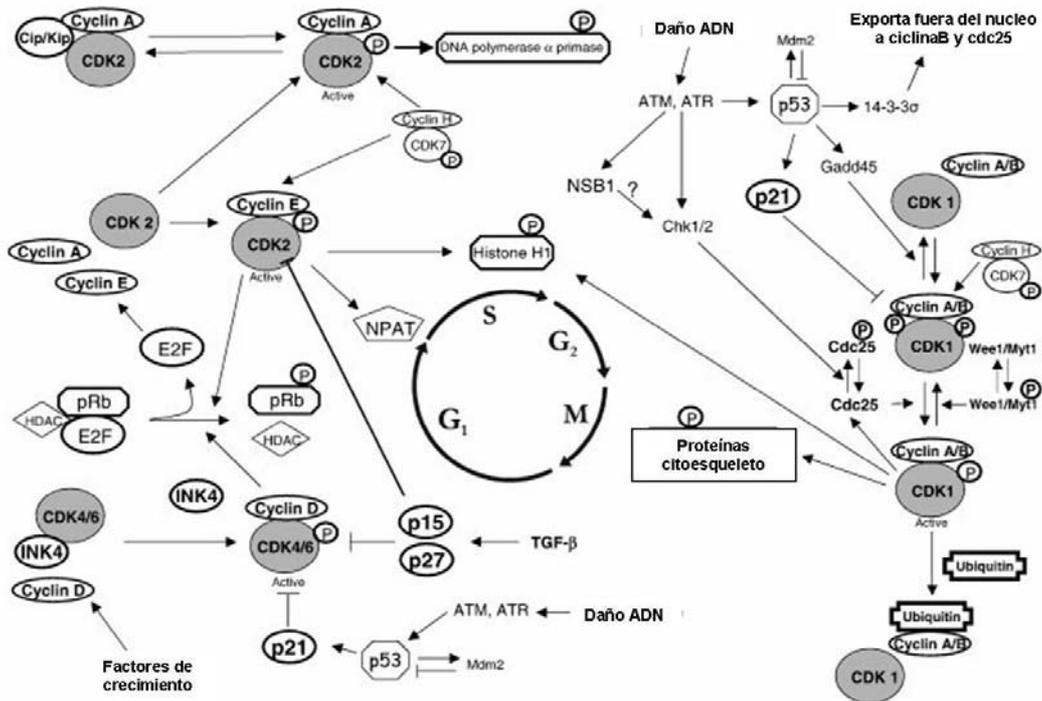


Figura 12. Visión esquemática de algunos puntos esenciales en la regulación del ciclo celular.
Adaptado de Cell Proliferation 36.

ADN esta muy dañado para ser reparado, entonces la célula es eliminada por apoptosis. Las células tumorales tienen defectuosos estos puntos de control. Muy frecuentemente los mecanismos por los cuales las células transformadas son capaces de saltarse los puntos de control están muy relacionados con las funciones de las CDKs. Por esta razón, la restauración del control del ciclo celular mediante la inhibición farmacológica de las CDKs ha sido activamente perseguida a lo largo de la última década como una nueva estrategia para el tratamiento del cáncer.

Recientemente, además, se ha demostrado que las CDKs están implicadas en otros muchos procesos celulares, por ejemplo, algunas funciones neuronales son también reguladas por CDKs, en concreto por CDK5 (Meijer 2000). También se han visto implicadas en diferenciación, apoptosis, y regulación de la transcripción. La CDK7/ciclina H y la CDK9/ciclinaT son componentes de factores de transcripción (TFIIH y pTEFb respectivamente), donde activan la elongación del ARN mediante la

fosforilación del dominio carboxiterminal de la ARN polimerasa II. La CDK8/ciclinaC también inhibe a la ARN polimerasa II. Otras ciclinas también participan en la regulación de la transcripción por ejemplo regulando el ajuste pre-ARNm (CDK11/ciclinaL) o modulando el factor de transcripción Ets2 (CDK10) (Dai and Grant 2003). Se sabe, además, que las CDKs son necesarias para la replicación de virus en células, probablemente por la actividad previamente comentada sobre la transcripción. A este respecto se ha observado que varios inhibidores de CDKs, como la roscovitina, tienen una potente actividad anti-vírica (Meijer 2000; Fischer 2004). Así pues, a parte del uso potencial de estos inhibidores de CDKs en terapia contra el cáncer, que está siendo evaluado intensamente, se estudia también su potencial en otras áreas terapéuticas como por ejemplo en neurología (Alzheimer), cardiovascular (restenosis, angiogénesis), nefrología (glomerulonefritis), parasitología (*Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, etc.) y virología (cytomegalovirus, HIV, herpes virus) (Meijer 2000).

CDKs Y CÁNCER

Se ha observado, que en el proceso tumoral existen alteraciones fundamentales en el control genético de la división celular que dan como resultado una proliferación celular incontrolada. Alteraciones de alguno de los reguladores del ciclo celular como por ejemplo CDKs, ciclinas, enzimas activadoras de CDKs, inhibidores de CDKs (CKIs), sustratos de CDKs, y proteínas de los puntos de control, se han encontrado prácticamente en todos los cánceres humanos (Sherr 2000). Existe un vínculo entre la regulación del ciclo celular y la apoptosis: la desregulación del ciclo celular es uno de los estímulos más potentes para la inducción de apoptosis. Concretamente, la desregulación de cada uno de los componentes de la maquinaria del ciclo celular, como por ejemplo Rb, E2F, p21, p27, la ciclina D1 o CDK1, se ha visto que influye en el proceso apoptótico (Grant and Roberts 2003). La evidencia de que CDKs, sus reguladores y sus sustratos son diana de alteraciones genéticas en diferentes tipos de cánceres humanos ha estimulado la búsqueda de inhibidores químicos de CDKs.

Moléculas inhibidoras de CDKs

Pequeñas moléculas inhibidoras de CDKs han mostrado su capacidad no solo de inhibir la proliferación de células neoplásicas, sino también de inducir muerte celular programada a través de varios mecanismos. Existen también bastantes ensayos pre-

clínicos que evidencian la capacidad de estos inhibidores de CDKs en potenciar el efecto antitumoral de muchos agentes citotóxicos ya establecidos (Grant and Roberts 2003).

Estás pequeñas moléculas inhibitoras, que directamente antagonizan la acción de las CDKs, actúan por inhibición competitiva de la unión de ATP a la CDK. Se han identificado unos 50 inhibidores de CDKs hasta la fecha, todos actuando como competidores por el sitio de unión del ATP en las CDKs. Estos inhibidores son de diferente naturaleza, y encontramos por ejemplo estaurosporinas, paulonas, polisulfatos, indigoides, flavonoides, y análogos de purinas.

Los dos grupos de más interés son los análogos de purinas, como la olomoucina o la roscovitina, y los derivados de flavonoides como el flavopiridol. El flavopiridol por ejemplo, ha mostrado interesantes características preclínicas, como inhibición del crecimiento celular, inducción de apoptosis, diferenciación celular e inhibición de procesos angiogénicos (Garrett and Fattaey 1999). El flavopiridol es capaz de inhibir a las CDK 1, 2, 4/6, 7 y 9, además de inhibir otras quinasas como la PKC o la PKA. También es capaz de inhibir la transcripción inhibiendo la actividad del factor de elongación positivo pTEFb (que no es más que CDK9/ciclinaT). La inhibición de pTEFb, impide que este factor fosforile y active a la enzima encargada de la elongación de la transcripción, la ARN polimerasa II, lo que produce una reducción global en los niveles de ARNm (Lam, Pickeral et al. 2001). En relación con la apoptosis, se ha visto que flavopiridol es capaz de disminuir los niveles de proteínas antiapoptóticas como Bcl-xL, XIAP o Mcl-1. También disminuye los niveles de ciclina D1 y p21. Y combinado con otros agentes quimioterapéuticos tales como taxol, doxorubicina o etopósido, es capaz de aumentar la apoptosis en células tumorales (Grant and Roberts 2003). Sin embargo, se ha descrito que flavopiridol podría ser tóxico tanto para células que quiescentes como para células normales no tumorales como linfocitos periféricos humanos (Byrd, Shinn et al. 1998), células endoteliales y neuronas embrionarias (Dai and Grant 2003). Con todo, dados los buenos resultados observados *in vitro*, flavopiridol está siendo investigado en ensayos clínicos, aunque los resultados de éstos no están siendo totalmente satisfactorios (Schwartz, Ilson et al. 2001; Shapiro, Supko et al. 2001).

Roscovitina

Otro de los inhibidores de ciclinas más prometedores es la roscovitina, capaz de inhibir la proliferación de diversas líneas celulares transformadas además de inducir su muerte por apoptosis. Se ha demostrado también la capacidad inhibidora *in vivo* de la roscovitina en gran número de tumores sólidos en ratones (McClue, Blake et al. 2002). La roscovitina es un análogo de purinas inhibidor de las CDKs 1, 2, 5, 7 y 9, pero no de la CDK4/6. A mayores concentraciones, se ha demostrado que inhibe también otras quinasas como ERK1 y ERK2 (Meijer, Borgne et al. 1997).

Al igual que flavopiridol, la roscovitina es capaz de inhibir la síntesis de ARNm posiblemente a través de la inhibición de la CDK7/ciclina H o incluso CDK9/ciclina T1 aunque parece que esta inhibición no es total y no afecta a todos los genes (Ljungman and Paulsen 2001; Sausville 2002; Whittaker, Walton et al. 2004). También se ha demostrado que roscovitina es capaz de inhibir la síntesis de ADN (Mgbonyebi, Russo et al. 1999; Vitali, Yakisich et al. 2002; Wojciechowski, Horkey et al. 2003) dando como resultado una parada y acumulación de células en la fase G2/M del ciclo celular. Esta inhibición en la síntesis del ADN es probablemente debida a su efecto directo sobre la maquinaria de replicación (Yakisich, Siden et al. 1998).

La forma en que roscovitina induce apoptosis es todavía objeto de estudio. Una posibilidad es que dado que roscovitina inhibe a CDK2/ciclina E de igual manera a como lo hace el inhibidor endógeno p27^{Kip1} y puesto que se sabe que la inhibición del complejo CDK2/ciclina E por la sobreexpresión p27^{Kip1} induce apoptosis en varias células de mamíferos (Wang, Gorospe et al. 1997), se podría sugerir que roscovitina induce apoptosis por medio de la inhibición de esta CDK. Sin embargo, que los efectos antitumorales observados tras el tratamiento con roscovitina sean debidos a una inhibición de las CDKs es algo que todavía no está del todo claro (Hahntow, Schneller et al. 2004).

Otro posible mecanismo de acción de la roscovitina como antitumoral es afectando a proteínas implicadas en apoptosis: se ha visto que roscovitina es capaz de aumentar los niveles de proteínas pro-apoptóticas como Bak o Bcl-xS y reducir los de proteínas antiapoptóticas como Mcl-1 y XIAP (Mihara, Shintani et al. 2002; Hahntow, Schneller et al. 2004). Otros efectos de la roscovitina que podrían relacionarse con su actividad antitumoral son la bajada de la ciclina D1, deacetilación y defosforilación de la histona H3, o cambio en la distribución intracelular de Ku80.

La roscovitina, en concreto la R-roscovitina (CYC202), que se ha demostrado más potente que la S-roscovitina, está actualmente entrando en ensayos clínicos en fase II en terapia contra el cáncer (Meijer and Raymond 2003; Nutley, Raynaud et al. 2005). Además, se ha observado que la roscovitina, al contrario que flavopiridol, es capaz de inducir apoptosis en B-CLL pero no en células mononucleares normales o en células B normales (Hahntow, Schneller et al. 2004).

A pesar de todos los efectos antitumorales y apoptóticos mencionados anteriormente, se ha descrito que la roscovitina es capaz de ejercer efectos antiapoptóticos en el sistema nervioso y que podría inhibir la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Filgueira de Azevedo, Gaspar et al. 2002; Hiromura, Pippin et al. 2002), aunque otros autores también han descrito propiedades pro-apoptóticas de la roscovitina en el sistema nervioso (Monaco, Beaman-Hall et al. 2004).

En resumen, el uso de inhibidores de CDKs es muy prometedor en la terapia contra el cáncer. Aproximaciones terapéuticas en las que se utilicen estos inhibidores por ejemplo, de forma combinada con otros agentes antitumorales podría aumentar las capacidades anticancerígenas de ambos así como reducir las concentraciones a las que son efectivos, disminuyendo de esta forma posibles efectos secundarios no deseados.

6. Agentes que afectan a los microtúbulos (AAMs) y cáncer

Los microtúbulos son polímeros dinámicos en continua polimerización y despolimerización y juegan un papel crucial en un gran número de funciones celulares, como crecimiento y división celular, movilidad, tráfico intracelular de orgánulos, etc. Además, la capacidad que tienen los filamentos del citoesqueleto de interactuar con un gran número de proteínas hace del citoesqueleto una especie de andamiaje que modula muchos procesos y señalizaciones celulares. Su papel vital en mitosis, movilidad, contactos célula-célula y otras funciones celulares los hace una diana muy atractiva para el desarrollo de drogas contra el cáncer. Los microtúbulos son las únicas dianas celulares que interactúan directamente con los agentes que afectan a los microtúbulos.

Algunos de los AAMs, como por ejemplo, nocodazol, inhiben la polimerización de los microtúbulos, mientras que otros, como paclitaxel (taxol), estabilizan a los

microtúbulos. En cualquier caso, alteran la dinámica de los microtúbulos, por tanto su función, lo que lleva a una parada del ciclo en la fase G2/M seguida de la inducción de apoptosis. La parada del ciclo es debida al daño del huso mitótico, y el fracaso en continuar el ciclo celular es responsable de la activación de la apoptosis. Cómo la desestabilización de la dinámica de los microtúbulos conduce a la apoptosis no se conoce bien y está siendo investigado actualmente. Sin embargo, evidencias de que diversos factores pueden ser liberados como resultado de cambios en la polimerización microtubular es coherente con la hipótesis de que los microtúbulos, al interactuar con un gran número de proteínas, podrían actuar secuestrando estas moléculas e inhibiendo su papel señalizador. La liberación de estos elementos secuestrados, les permitiría alcanzar sus dianas celulares y desencadenar una respuesta, como por ejemplo, la apoptosis (Mollinedo and Gajate 2003).

Una desventaja de estos compuestos es precisamente que están implicados en una gran cantidad de procesos celulares. Lo cual resulta en una falta de selectividad hacia las células tumorales y esto da lugar a una serie de efectos secundarios no deseados. Por ejemplo, el taxol, que actualmente está siendo utilizado en clínica, tiene como efectos secundarios neutropenia, neuropatías periféricas, alopecia y reacciones de hipersensibilidad, algunos de estos efectos son limitadores de la dosis de taxol a usar. A pesar de ello, determinadas propiedades adquiridas por las células tumorales las hace, en ciertas ocasiones, más susceptibles de ser diana de estas drogas. Por ejemplo, una alta capacidad de proliferación celular da la oportunidad a las drogas que afectan a los microtúbulos, de atacar el huso mitótico.

Agentes que afectan a los microtúbulos (AAMs)

Uno de los AAM más estudiados y utilizados es el paclitaxel (taxol) que pertenece a la familia de los taxanos. Los taxanos son utilizados en el tratamiento de muchos cánceres como el cáncer de mama, de ovario, de pulmón y de cabeza y cuello (Rowinsky, Cazenave et al. 1990). La diana celular del taxol es la β -tubulina del polímero microtubular (Schiff, Fant et al. 1979). El taxol induce apoptosis en un gran número de células tumorales (Odox and Albers 2004), parece que de manera independiente del estado en que se encuentre p53 (Wahl, Donaldson et al. 1996; Bacus, Gudkov et al. 2001; Gadducci, Cosio et al. 2002), lo cual supone una ventaja debido a que en más del 60% de los cánceres humanos, la proteína p53 se encuentra mutada (Wang and Wang 1996).

Como hemos dicho anteriormente, el taxol actúa inhibiendo la despolimerización de los microtúbulos, estabilizándolos, lo que lleva a una dinámica anormal de los mismos, que da lugar a una parada en G2/M. La parada duradera del ciclo celular en la fase mitótica se considera que es la causa de la citotoxicidad inducida por taxol.

Otro AAMs menos estudiado, es el nocodazol. Nocodazol afecta a la dinámica de los microtúbulos al unirse a la β -tubulina y previene la formación del enlace disulfuro entre las dos cadenas, inhibiendo así, la dinámica de los microtúbulos. Provoca parada en G2/M, e induce apoptosis tanto en células normales como en tumorales. Sin embargo, al igual que ocurre con el taxol, el mecanismo exacto de su citotoxicidad aun no está claro.

AAMs y mitocondria

Debido a que la mitocondria interacciona con los microtúbulos, ésta podría conectar el daño en los microtúbulos con la maquinaria apoptótica. De hecho, se ha visto que el taxol es capaz de afectar directamente a mitocondrias aisladas dando lugar a la liberación de citocromo-c dependientemente del poro PT, todo de manera independiente de caspasas (Andre, Braguer et al. 2000; Carre, Andre et al. 2002). Esto podría ser debido a la existencia de tubulina en mitocondrias aisladas lo que sugiere que la tubulina podría jugar un papel más directo en el control de la apoptosis vía mitocondria. A parte, se sabe que la sobreexpresión de Bcl-2 inhibe la apoptosis disparada por AAMs sin afectar a su acción sobre los microtúbulos o la parada del ciclo celular en G2/M (Tang, Willingham et al. 1994; Gajate, Barasoain et al. 2000), lo cual indicaría que la apoptosis inducida por AAMs depende de la vía mitocondrial.

Bim y Bmf, dos proteínas tipo solo BH3 (descritas anteriormente) son importantes en conectar el citoesqueleto y la maquinaria apoptótica ya que están unidas a las cadenas ligeras de la dineina que los asocia con los microtúbulos (Bim) o con la actina del citoesqueleto (Bmf) quedando así secuestrados (Puthalakath, Huang et al. 1999; Puthalakath, Villunger et al. 2001). Se sabe que linfocitos Bim^{-/-} son resistentes a estímulos apoptóticos como privación de citoquinas, flujo de calcio o alteración de los microtúbulos (Bouillet, Metcalf et al. 1999). En células sanas, las isoformas mayoritarias de Bim, es decir, BimEL y BimL, están unidas a la subunidad de 8kDa de la cadena ligera de dineina, y están secuestrados en el complejo motor de dineina asociado a los microtúbulos, y unidas así, son incapaces de provocar apoptosis

(Puthalakath, Huang et al. 1999). Sin embargo, ciertos estímulos son capaces de hacer que se suelten de los microtúbulos, quedando libres para translocarse a la mitocondria y una vez allí disparar la apoptosis.

Evidencias recientes muestran que la ruta JNK, que además es activada por AAMs, es capaz de fosforilar a Bim, dando lugar a su liberación del citoesqueleto y a la inducción de apoptosis de manera dependiente de Bax (Lei and Davis 2003).

De manera similar, Bmf, está secuestrado en el motor de miosina V por asociación con la cadena ligera 2 de dineina, pero en determinadas circunstancias, como la pérdida de adhesión celular (anoikis), Bmf se libera y se transloca a la mitocondria para unirse a las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas, inhibiendo su función y disparando así la apoptosis.

Por otra parte, varios estudios han demostrado que la fosforilación de Bcl-2 puede ser inducida específicamente por drogas que afectan a los microtúbulos, como taxol o nocodazol, pero no por drogas que dañan al DNA sugiriendo un rol de Bcl-2 como “guardián de la integridad de los microtúbulos” (Haldar, Basu et al. 1997). La fosforilación de la proteína antiapoptótica Bcl-2 bloquearía su capacidad de inhibir la apoptosis (Chang, Minn et al. 1997; Haldar, Basu et al. 1997). La mutación de los sitios de fosforilación de Bcl-2 confiere resistencia a señales de muerte así como a AAMs (Basu and Haldar 1998). Sin embargo, otros trabajos, indican que la fosforilación de Bcl-2 conllevaría un aumento de su capacidad antiapoptótica (May, Tyler et al. 1994). Por tanto, la regulación de la actividad de Bcl-2 por fosforilación continúa siendo un tema controvertido. Una posible explicación sería que debido a que los AAMs producen una parada en G2/M continuada antes de que las células sufran apoptosis, se podría pensar que la inactivación continuada de Bcl-2 debido a la fosforilación de la proteína, y no la fosforilación de Bcl-2 *per se*, sería lo determinante en la inducción de la apoptosis por AAMs (Mollinedo and Gajate 2003). Cabe destacar que una activación persistente de la vía JNK se relaciona con apoptosis, y que JNK es capaz de fosforilar a Bcl-2 en la fase G2/M (Yamamoto, Ichijo et al. 1999). Por otra parte se ha visto que la activación de la caspasa-3 puede dar lugar al corte de Bcl-2 que pasaría de ser anti-apoptótico a ser pro-apoptótico (Cheng, Kirsch et al. 1997), y la hiperfosforilación de Bcl-2 precede a la activación de caspasa-3 y al corte de Bcl-2 por la misma. En este aspecto, se ha visto que taxol es capaz de inducir el corte de Bcl-2 simultáneamente a la activación de caspasa-3 dando lugar al producto proapoptótico de Bcl-2 lo que potenciaría la actividad pro-apoptótica del taxol (Blagosklonny, Chuman et al. 1999).

AAMs y el complejo CDK1/ciclina-B1

El daño de los microtúbulos, lleva al bloqueo de la degradación de la ciclina B1 por el proteasoma, y una inducción de la expresión de CDK1, dando como resultado una activación continuada de la quinasa CDK1/ciclina-B1 y una parada del ciclo celular en G2/M (Hagting, Karlsson et al. 1998; Chadebech, Truchet et al. 2000). La inhibición de la CDK1 por olomoucina o la inhibición de CDKs por medio del inhibidor endógeno p21, previene la apoptosis inducida por taxol, sugiriendo que CDK1/ciclina-B1 juega un papel importante en la apoptosis disparada por taxol (Yu, Jing et al. 1998; Vantieghem, Xu et al. 2002). Además, p21 es inducido por p53 y esto podría explicar la mayor toxicidad de taxol en células tumorales con p53 mutado.

La importancia de la actividad quinasa de CDK1/ciclina-B1 es puesta de manifiesto también cuando se ha observado que PMA protege contra la apoptosis disparada por taxol, probablemente inhibiendo la activación de CDK1 (Shen, Huang et al. 1998).

Por otra parte, el complejo CDK1/ciclina-B1 puede fosforilar Bcl-2 en sistemas libres de células, y se ha visto que la activación de CDK1/ciclina-B1 es necesaria para la fosforilación de Bcl-2 (Ling, Tornos et al. 1998), poniendo de manifiesto la vinculación entre la alteración de la dinámica de los microtúbulos, la activación de CDKs y proteínas reguladoras de la apoptosis.

AAMs y survivina

Otra proteína implicada en apoptosis que podría jugar un papel en la apoptosis inducida por AAMs es la survivina. La survivina necesita estar unida a los microtúbulos para ejercer su función reguladora en apoptosis. Una prolongada parada del ciclo podrían llevar a la liberación de la survivina de los microtúbulos, disminuyendo así su actividad antiapoptótica (Li, Ambrosini et al. 1998).

AAMs y la ruta de las JNK

Como hemos mencionado anteriormente, una activación persistente de la vía JNK se relaciona con apoptosis. Además, la vía ASK1/JNK1 es capaz de fosforilar Bcl-2 *in vivo* (Yamamoto, Ichijo et al. 1999). La vía JNK puede también mediar en la parada del ciclo celular en parte, estabilizando a p21 mediante su fosforilación. También se ha visto una asociación de JNK con los microtúbulos. Sin embargo, estudios en el tiempo,

indican que la activación de JNK tiene un pico a las 2h de tratamiento con taxol y sin embargo la fosforilación de Bcl-2 y la parada en G2/M se produce a las 12-16h. Lo que sugiere que la activación de JNK y la fosforilación de Bcl-2 podrían ser parte de diferentes vías que pueden estar conectadas en algunos tipos celulares. En cualquier caso, la implicación de esta ruta en la apoptosis mediada por AAMs parece clara.

La implicación de otras rutas de MAPK como la vía ERK, o p38 MAPK en la señalización de la apoptosis por AAMs no está clara o no parece que jueguen un papel fundamental en la misma.

AAMs y transcripción

La inhibición de la síntesis de proteínas previene la acumulación de ciclina-B1, la parada en G2/M, la fosforilación de Bcl-2 y la apoptosis provocada por taxol. Esto sugiere que los AAMs pueden inducir la apoptosis de una manera dependiente de la transcripción. De hecho, el tratamiento con AAM provoca el aumento de la expresión de numerosas proteínas como c-Mos, c-Jun, ciclinaB1, CDK1, Mcl-1, DR4 y DR5, Bak, Bax (Shankar, Chen et al. 2005), p21, COX-2, TNF α (Manthey, Brandes et al. 1992; Koistinaho, Hicks et al. 1993; Shibuya and Ruderman 1993; Blagosklonny, Schulte et al. 1995; Liu and Stein 1997; Townsend, Trusty et al. 1998; Chadebech, Truchet et al. 2000; Gajate, Barasoain et al. 2000; Subbaramaiah, Hart et al. 2000) , así como la bajada de los niveles de Bcl-xL, FLIP, o XIAP (Liu and Stein 1997; Huisman, Ferreira et al. 2002; Park, Wu et al. 2004). Todos estos cambios en proteínas implicadas en la apoptosis estarían relacionados con la capacidad de los AAMs de inducir apoptosis o de sensibilizar a las células tumorales a otras drogas anticancerígenas.

AAMs y FADD

Otra proteína que podría jugar un papel en la apoptosis inducida por AAMs es FADD. Se ha descrito que taxol induce apoptosis a través de un mecanismo dependiente de FADD y a través de la activación de caspasa-10 pero independiente de los receptores de muerte (Huisman, Ferreira et al. 2002; Park, Wu et al. 2004). Sin embargo, otros autores muestran que un DN-FADD no es capaz de inhibir la apoptosis inducida por taxol (von Haefen, Wieder et al. 2003). Por tanto, la implicación de dicha proteína FADD en la mediación de la apoptosis por AAMs no está clara, aunque es interesante la posible actividad de FADD independiente de receptores de muerte.

Es interesante el hecho de que se vea tanta variación en la implicación de unas proteínas u otras en la mediación de la apoptosis inducida por AAMs. Esto podría explicarse por la posibilidad de que estas drogas induzcan apoptosis a través de diferentes vías de señalización en diferentes tipos celulares. La activación de varias vías de señalización por AAMs para inducir apoptosis, conllevaría una ventaja de los AAMs y es la posibilidad de que dichos compuestos no pierdan su capacidad anticancerígena cuando alguna de estas vías está mutada.

Terapia combinatoria con AAMs

Debido a los efectos secundarios del taxol y otros AAMs, se ha estudiado la posibilidad de combinar taxol con otras drogas anticancerígenas para además de aumentar el potencial terapéutico de los tratamientos utilizados, reducir las concentraciones de estos compuestos tóxicos. Esta estrategia se ha seguido en diferentes ensayos clínicos con buenos resultados. La combinación de AAMs con drogas quimioterapéuticas se ha utilizado en diferentes tipos de cánceres como cáncer de ovario, de mama, de pulmón, de cabeza y cuello, esofágico, y linfomas entre otros (Odoux and Albers 2004). Las drogas con las que se ha visto que taxol aumenta su potencial como agente anticancerígeno son entre otras, cisplatino, carboplatino, ciclofosfamida, doxorubicina, o el anticuerpo anti-HER-2 humanizado (Odoux and Albers 2004). Así mismo, se ha visto que taxol es capaz de sinergizar la apoptosis inducida por TRAIL, probablemente mediante el aumento de los receptores de TRAIL R1/DR4 y R2/DR5, y de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak (Shankar, Chen et al. 2005), aunque también es cierto que estos cambios en los niveles de dichas proteínas no siempre se han observado tras el tratamiento con taxol.

Aunque la mayoría de los estudios que se han discutido aquí se refieren a tratamientos con la droga taxol (paclitaxel), los efectos producidos por taxol podrían ser aplicados a otros AAMs como nocodazol, ya que el efecto que producen todos los AAMs, como se ha comentado anteriormente, es la desestabilización de la dinámica de los microtúbulos.

V. OBJETIVOS

La apoptosis juega un papel fundamental en patologías como el cáncer. El descubrimiento del ligando TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), capaz de inducir apoptosis en células tumorales sin afectar a células no transformadas lo hace un agente terapéutico muy atractivo. Sin embargo, se ha descrito que muchas células tumorales son resistentes a dicho ligando de muerte, sobre todo líneas tumorales de mama. El estudio de los mecanismos responsables de esta resistencia ha sido el objeto de estudio en este trabajo.

En concreto los objetivos de esta tesis han sido los siguientes:

1- Estudio del papel de la ruta de MAPK en la regulación de la apoptosis inducida por TRAIL en la línea tumoral de cáncer de mama MCF-7.

2- Caracterización del mecanismo de sensibilización por roscovitina (inhibidor de CDKs) a la apoptosis mediada por TRAIL en células tumorales de mama.

3- Caracterización del mecanismo de sensibilización por agentes que afectan a los microtúbulos (nocodazol y taxol) a la apoptosis mediada por TRAIL en células tumorales de mama.

VI.-MATERIALES Y MÉTODOS

1.-Cultivos celulares

Las líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7, MCF-7-casp3 (establemente transfectadas con caspasa-3, amablemente suministrada por el Dr. Green de La Joya, San Diego EEUU), EVSA-T y MDA-MB231, se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina y 40 µg/l de gentamicina. Las líneas MDA-MB-231 J.A (proporcionada amablemente por el Dr. Joaquin Arribas del hospital Vall d'Hebron en Barcelona), MDA 468, SKBr 3, MDA 435-S y BT 474 fueron mantenidas en medio Dubelcco's modified Eagle's suplementado igualmente con 10% de suero bovino fetal, 2 mM de L-glutamina y 40 µg/l de gentamicina. Las MDA 435-S fueron además suplementadas con insulina 10µg/ml. Todas las células fueron mantenidas en un incubador humidificado a 37°C, 5% CO₂ y 95% de aire.

2.-Reactivos y anticuerpos

El medio RPMI 1640 y el suero bovino fetal se obtuvieron de Invitrogen (Barcelona, Spain). TRAIL humano soluble era de Alexis Biochemicals o el TRAIL recombinante con cola histidinas o el TRAIL biotinilado recombinante (bTRAIL) fueron producidos en nuestro laboratorio tal y como se describe por MacFarlane et al. Oncogene 2002, 21, 6809-10 and Harper et al. JBC 2001, 276, 34743-52. TNF alpha de Peptrotech EC LTD (London, UK). Doxorubicina era de Sigma Immunochemicals. PDBu (Phorbol-12,13-dibutyrate) era de Sigma. Pool, UK. PD98059 de Calbiochem-Novabiochem GmbH (Band Soden, Alemania). Los anticuerpos frente a los receptores de TRAIL para citometría de flujo se obtuvieron de Alexis Corp. (San Diego, CA). Todos los enzimas de restricción usados fueron de Roche Applied Science (Mannheim, Alemania). La ligasa de ADN T4 se obtuvo de New England Biolabs (Beverly, MA, EEUU). El ³²P-dCTP usado fue de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Reino Unido). Los reactivos de luciferasa usados fueron de Promega (Madison, WI). Los anticuerpos anti-FADD, -RIP se obtuvieron de BD Biosciences (Erembodegem, Bélgica). El anticuerpo policlonal anti-caspasa-8 nos lo cedió el Dr. Gerald Cohen (Universidad de Leicester, UK). El anticuerpo frente a citocromo-c era de Pharmigen(San Diego,CA), el anticuerpo anti-GFP es de Molecular Probes (Leiden, The Netherlands), anti-phospho-ERK(E4) de Santa Cruz Biotechnology, Inc. Anti-α-

tubulina de SIGMA, anti-PARP de Boehringer y anti- α FLIP Alexis Corp. (San Diego, CA), anti-Bid fue un generoso regalo del Dr Wang, los anticuerpos anti Bad, anti-citocromo-c y anti-Bax son de Pharmigen (San Diego, CA, USA), anti-Bcl-2 de DAKO (Glostrup, Denmark), y anti-XIAP de Transduction. Roscovitina, Paclitaxel (Taxol), Nocodazole y MG 132 se obtuvieron de SIGMA.

3.-Cuantificación de la viabilidad celular y de apoptosis.

La viabilidad celular se determinó por el método cristal violeta tal como lo describen Sánchez A., et al J. Biol. Chem., 271: 7416-7422, 1996. La apoptosis se cuantificó por citometría de flujo mediante la detección del fosfolípido fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular utilizando la proteína Anexina-V-FLUOS (Roche) la cual se une a este fosfolípido en presencia de Ca^{+2} . Las células se resuspendieron en un tampón de incubación (Hepes NaOH 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, $CaCl_2$ 5 mM) con Anexina-V-FLUOS a la concentración indicada por el fabricante, durante 15 min a temperatura ambiente. La externalización de fosfatidilserina se determinó analizando en el citómetro de flujo la población en FL1 ya que la Anexina-V-Fluos emite en FL1. O bien, la cuantificación de apoptosis en determinadas líneas celulares, se realizó mediante la detección de células hipodiploides por citometría de flujo. Brevemente, las células se fijaron y permeabilizaron con 900 μ l de una solución del 70% de etanol. Después de lavar se les añadió 200 μ l de solución de extracción de ADN (0,2M Na_2HPO_4 , 0,1M ácido cítrico, pH 7,8) y se incubaron durante 10 min a 37°C. Posteriormente las células se incubaron con 250 ml de PBS con 100 μ l de ARNasa y 40 μ g/ml de yoduro de propidio durante 30 min a 37°C en oscuridad. Las células apoptóticas se detectaron y cuantificaron en la población del ciclo celular con menor contenido en ADN que las células del pico G1. La citometría de flujo fue realizada en un citómetro FACScan utilizando el programa Cell Quest (Becton Dickinson, Mountain View, CA, U.S.A.).

4.-Análisis de receptores de TRAIL en la superficie celular mediante citometría de flujo

Para detectar los receptores de TRAIL en superficie de células MCF-7 tratadas o no con Roscovitina (40 μ M), Nocodazol (400ng/ml) o Taxol (10 μ M) durante 15h, luego se despegaron de las placas con una solución de RPMI/3mM EDTA. Se lavaron con

PBS y se resuspendieron en 200 μ l de PBS. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (5 μ g/ml) a 4°C durante 30 min. Después de lavar con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Dako) (dilución 1:20) durante 30 min a 4°C. Las células se volvieron a lavar con PBS y se resuspendieron en 200 μ l de PBS. La detección de los receptores de muerte se realizó con un citómetro de flujo analizando la población positiva para FL1 que es donde emite la fluoresceína.

5.-Inmunodetección de proteínas (“western blot”)

Después de despegar las células con una solución de RPMI con 3mM de EDTA, y Tripsina 0,25% EDTA, las células se lavaron con PBS una vez, se resuspendieron en un volumen de 50 μ l de PBS y se congelaron a -20°C durante 3 horas. Posteriormente, se descongelaron y se cuantificó la cantidad de proteínas de cada muestra mediante el método de Bradford. A la misma cantidad de proteína de cada muestra se le añadió un volumen determinado de tampón de carga Laemmli (50 mM Tris.HCl pH 6.8, 6M Urea, 6% 2-mercaptoetanol, 3% SDS, 0.003% azul de bromofenol). Posteriormente, se sonicaron las muestras y las proteínas se separaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%, 12% o 15% dependiendo del tamaño de la proteína a detectar. Este gel se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore) mediante la técnica de transferencia semiseca con el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad) a 50 mA durante 1h. La membrana se bloqueó con una solución de PBS 0,1% Tween 20 (PBS/Tween) con 5% de leche en polvo durante 1h a temperatura ambiente, después se lavó con PBS/Tween y se incubó con una solución de PBS/Tween 1% de leche en polvo con el anticuerpo correspondiente 1h a temperatura ambiente. Se volvió a lavar con PBS/Tween durante 5 min tres veces y finalmente se incubó durante otra hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario que correspondía que lleva acoplado la peroxidasa del rábano picante (HRP). De nuevo se lavó con PBS/Tween tres veces, 5 minutos cada vez. Finalmente, utilizando el reactivo ECL (Amersham Biosciences) se reveló la membrana mediante quimioluminiscencia.

6.-Fraccionamiento celular

Para detectar las proteínas fullBid-GFP o tBid-GFP por western-blotting, los citosoles fueron separados tal como lo describe Waterhouse et al, J Cell Biol. 2001 Apr 16;153(2):319-28. Brevemente, se lavaron 3×10^5 células MCF-7 en PBS enfriado en hielo y luego se incubaron durante 30 min en 100µl de tampón CLAMI frío con 200µg/ml de digitonina. Posteriormente, las células se rompieron pasándolas 25 veces a través de una aguja del calibre 22. Las células rotas resultantes se centrifugaron en una centrífuga a presión (airfuge) a 20 psi durante 20 min. Los sobrenadantes que contenían las proteínas citosólicas fueron almacenados a -20°C y volúmenes iguales fueron analizados por SDS-PAGE. La concentración de proteínas fue normalizada mediante el método de Bradford.

Para detectar la liberación de citocromo-c de la mitocondria y la translocación de Bax del citosol a la mitocondria tras un estímulo apoptótico, se separaron la fracción mitocondrial (membranosa) del citosol. Para ello se lavaron las células (aprox. 500000) con PBS y se resuspendieron en 30µl de buffer de lisis frío (80mM KCl, 250mM sacarosa, 500µg/ml digitonina, 0.1mM PMSF, 1mM DTT, Inhibidores proteasas (cóctel) en PBS). Se incubaron en hielo 6 minutos. Posteriormente se centrifugaron 5min a 10000g y se recogió el sobrenadante. Los pellets que contenían membranas y núcleos se lavaron en 1ml PBS, se añadió SB, y se sonicó. Se cargaron 50µg de la fracción citosólica, y un volumen proporcional a 50µg de la fracción mitocondrial. La detección de citocromo-c y Bax se realizó mediante inmunodetección utilizando anticuerpos específicos para citocromo-c y Bax.

7.-Construcción de los plásmidos

FullBid-GFP: plásmido que expresa la proteína completa BID (correspondiente a los aminoácidos 1 a 195) fusionada a EGFP (proteína verde fluorescente). El ADN complementario de BID humano fue obtenido del EST 280 F10 por PCR utilizando los siguientes cebadores, sentido 5'-ATAAGATCTATGGACTGTGAGGTCAACA-3' y antisentido 5'-CCCGGATCCGTCATCCATTTCTGGCT-3'. El producto de la PCR fue clonado en el vector pEGFP-N3(Clonetech) obteniendo la construcción llamada **FullBID-GFPcmv**. Para obtener la construcción llamada FullBID-GFP el fragmento FullBID-EGFP fue escindido del vector pEGFP-N3 con los enzimas de restricción Bgl II y Not I, y los extremos prominentes fueron rellenados con la enzima Klenow y luego

fue subclonado en el plásmido pEF4/Myc-His B(Invitrogene) digerido previamente con Not I e incubado con Klenow para hacer sus extremos romos.

GFP-tBid: plásmido que expresa la proteína truncada BID (correspondiente a los aminoácidos 61 a 195) fusionada a EGFP. El ADN complementario de BID humano fue obtenido del EST 280 F10 por PCR utilizando los siguientes cebadores, sentido 5'-ATAGTCGACGGCAACCGCAGCAGCC-3' y antisentido 5'-CCCGGATCCGTCCATCCCATTCTGGCT-3'. El producto de la PCR fue clonado en el plásmido pEGFP-bos, una versión modificada del plásmido de clontech pEGFP-C1 cuyo promotor cmv fue sustituido por el promotor bos.

GFP-ttBid: plásmido que expresa la proteína de fusión ttBID, una versión más corta de la proteína humana truncada tBID (correspondiente a los aminoácidos 95 a 169), con EGFP. Esta proteína tiene el dominio BH3 truncado. El ADN complementario de ttBID fue obtenido del EST 280 F10 por PCR utilizando los siguientes cebadores, sentido 5'-ATAAGATCTAGCATGGACCGTAGCATCC-3' y antisentido 5'-CCCGTTCGACATCACGGAGCAAGGAC-3'. El producto de la PCR fue clonado directamente en el vector pEGFP-C1(Clonetech).

PKC-theta CA: la isoforma PKC-theta constitutivamente activa fue clonada en el plásmido pEFneo.

MEK1 CA: el cDNA que codifica para una forma constitutivamente activa de MAPKK (MEK1) (Brunet, Pages et al. 1994) fue una generosa donación del Dr. J. Pouyssegur.

8.-Transfecciones transitorias.

Los experimentos con transfecciones transitorias fueron llevados a cabo en células MCF-7 utilizando el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche Applied Science) como indica el fabricante. Brevemente, se sembraron $1,5 \times 10^5$ células por pocillo en placas de 6 pocillos el día anterior a la transfección. Se mezcló 1µg de los plásmidos FullBID-GFP, FullBID-GFPcmv, GFP-tBID o GFP-ttBID con el reactivo FuGENE 6 y fueron añadidos a cada uno de los pocillos con células. Quince horas después, las células transfectadas fueron tratadas como se indica en la leyenda de las figuras.

Los experimento de electroporación fueron realizados tal y como indica Agami R. et al, Cell, Volume 102, Issue 1 , 7 July 2000, Pages 55-66, para obtener una alta

eficiencia de transfección. Brevemente, 1×10^6 de células MCF-7 fueron despegadas y resuspendidas en 100 μ l del tampón de electroporación que contenía 2 mM HEPES (pH 7.2), 15 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , 250 mM manitol, y 1mM $MgCl_2$ a un pH final de 7.2. Tres μ g de ADN del plásmido correspondiente fueron añadidos a esta solución, y las células junto con el ADN el el tampón de electroporación fueron trasferidas a una cubeta de electroporación de 0,1cm (BioRad) y posteriormente electroporadas en el aparato de electroporación Gene Pulser II junto con el módulo Gene Pulser II RF (BioRad). Las condiciones de electroporación fueron: 140 voltios, 15 veces, 1.5 ms de duración de pulso con intervalos de 1.5 s de duración. Cinco minutos tras la electroporación, las células fueron sembradas en una placa de 10cm de diámetro o en un área similar. Tras 16h las células fueron lavadas y el experimento fue realizado 24 o 48h más tarde. Los experimentos de transfección fueron realizados por triplicado.

9.-Análisis por microscopía y cuantificación.

Tras los tratamientos, las células fueron fijadas durante 20 min con paraformaldehído al 3% a temperatura ambiente, y posteriormente analizadas en un microscopio confocal laser-scanning Leica TCS NT (Leica Microsystems, Alemania). Para cuantificar las células con un patrón de fluorescencia punteado, se contaron más de 100 células que expresaban BID-GFP en varios campos. El porcentaje de células con un patrón de fluorescencia punteado representan a las células en las que BID-GFP está en la mitocondria con respecto al número total de células que expresan BID-GFP. Las mitocondrias fueron teñidas con 150mM del marcador específico Mitotracker-Red (Molecular Probes) y los núcleos se marcaron con 1mM de TOPRO-3 (Molecular Probes).

10.-Permeabilización celular y filtración de proteínas.

Se sembraron 6×10^5 células por pocillos en placas de 6 pocillos. Al día siguiente las células fueron lavadas dos veces con tampón de lavado que llevaba 120mM NaCl, 5mM KCl, 1mM KH_2PO_4 , 0,2mM $MgCl_2$, 0,1mM EGTA y 20mM HEPES-NaOH pH 7.4, y posteriormente fueron incubadas 10 min a 37°C en tampón de permeabilización (120mM KCl, 10mM NaCl, 1mM KH_2PO_4 , 20mM HEPES-Tris pH 7.2, a Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostic, GmbH, Mannheim, Germany),

100µg/ml Digitonin (Sigma), 2mM Succinato, 2mM Mg ATP, 5mM Phosphocreatine (Sigma) and 5U/ml Creatine Phosphokinase (Sigma)) en presencia o ausencia de 250 o 500ng/ml de tBID recombinante (una generosa donación del Dr Douglas R. Green). Previo a esta incubación con las proteínas recombinantes, las células indicadas se pre-incubaron con PDBu (100ng/ml) durante 1h. Además, en los pocillos con tBID y PDBu, tBID fue preparado en tampón de permeabilización con PDBu. Tras la incubación con tBID las células fueron recuperadas en tubos ependorff y centrifugadas 5 min a 13000 rpm en una minifuga. Los precipitados se lavaron en PBS y se resuspendieron en Simple Buffer y se resolvieron en SDS-PAGE. El citocromo c liberado de la mitocondria estaría en los sobrenadantes y se concentró añadiendo acetona e incubando toda la noche a -20°C. Tras la centrifugación los precipitados se resuspendieron en Simple Buffer y fueron resultos en SDS-PAGE.

11.-Aislamiento del DISC de TRAIL

La precipitación del DISC fue realizada utilizando TRAIL biotinilado recombinante (TRAIL-bio) (regalo de Nick Harper MRC Toxicology Unit, University of Leicester, UK). Células MDA-MB-231 (20×10^6 células/tratamiento) fueron incubadas con o sin Roscovitina, Nocodazol, Taxol o Cicloheximida(CHX) durante 15h. Tras esta incubación las células fueron tratadas con TRAIL-bio durante 15, 30 y 60min. La formación del DISC se paró después, y se eliminó el TRAIL-bio no pegado lavando las células 3 veces en PBS frío. Posteriormente, las células se lisaron en 3 ml de tampón de lisis (30 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1% Triton X-100, con CompleteTM protease inhibitors (Roche Molecular Biochemicals)) durante 30 min en hielo seguido de una centrifugación a $15,000 \times g$ durante 10 min a 4°C. El DISC de TRAIL fue entonces precipitado incubando toda la noche a 4°C en una noria con 30 µl de bolitas de agarosa-estreptavidina. Los precipitados fueron lavados 6 veces con tampón de lisis, y el DISC fue eluido con 30 µl de Simple Buffer. Western Blotting fue realizado como se indico antes.

12.-RT-PCR (Transcripción reversa de ARN y amplificación de ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR))

El ARN total de células MDA-MB231 se aisló utilizando el sistema de aislamiento de ARN, TRIzol (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Partiendo de 2 µg de ARN total y utilizando un kit de PCR y transcripción reversa (Perkin Elmer Life Sciences) se sintetizó el ADN complementario. De este ADN complementario se tomaron 4 µl para la amplificación del ADN por PCR. Los oligos utilizados para detectar FLIPL, FLIPS y α -actina (esta última analizada como control de la cantidad de ARN total) se describen a continuación:

FLIPL- sentido: 5'-AATTCAAGGCTCAGAAGCGA-3'

FLIPL- antisentido: 5'-GGCAGAAACTCTGCTGTTCC-3'

FLIPS-sentido: 5'-ATGTCTGCTGAAGTCATCCCAT-3'

FLIPS- antisentido: 5'-TCACATGGAACAATTTCCAAG-3'

Actina-sentido: 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3'

Actina-antisentido: 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'

Los productos de la reacción que se producen son de 230 pb para FLIPL, de 667 pb para FLIPS y 661 pb para la actina. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 1 min a 95°C, 35 o 30 ciclos de: 40 sec at 94°C, 40 sec at 60°C, and 40 sec at 72°C y finalmente 10 min a 72°C. El número de ciclos varió y fue de 35 para FLIPS y 30 para FLIPL y actina.

Los productos amplificados se cargaron en un gel al 1% de agarosa (Ecogen) en tampón TAE con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma).

VII. RESULTADOS

1.- La activación de la ruta de MAPK inhibe la apoptosis inducida por TRAIL disminuyendo la localización mitocondrial de tBid en células tumorales de mama MCF-7

1.1- La activación de la ruta de MAPK/ERK/2 inhibe la apoptosis inducida por TRAIL en un paso posterior al corte de BID por la caspasa-8.

Para estudiar el efecto de la activación de la vía de MAPK en la apoptosis inducida por TRAIL en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 hemos utilizado un éster de forbol (PDBu) como activador de la ruta. Se sabe que los ésteres de forbol son capaces de activar a la proteína quinasa C (PKC) y que una de las dianas de PKC es la ruta de MAPK/ERK1/2 (Whitehurst, Boulton et al. 1992). Es sabido que la ruta MAPK/ERK1/2 puede inhibir la apoptosis mediada por diferentes estímulos como hipoxia, retirada de factores de crecimiento, H₂O₂, agentes quimioterapéuticos, radiación ionizante (Shonai, Adachi et al. 2002) y también por receptores de muerte (Ruiz-Ruiz, Robledo et al. 1999; Holmstrom, Schmitz et al. 2000). Sin embargo, aunque se ha descrito que la ruta de MAPK/ERK es capaz de inhibir la apoptosis inducida por receptores de muerte, no está tan claro a qué nivel ocurre esta inhibición. Para tratar de dilucidar esta cuestión se realizaron los experimentos descritos a continuación.

Para corroborar que efectivamente la ruta de MAPK/ERK estaba inhibiendo la apoptosis inducida por TRAIL en células MCF-7, éstas se trataron con TRAIL en presencia o ausencia de PD98059, inhibidor específico de MKK1. Como muestra la figura 1.1A, la inhibición de la ruta de MAPK/ERK/1/2 con PD98059 produce una sensibilización a la apoptosis provocada por TRAIL. Así mismo, cuando activamos la ruta de MAPK por medio de PDBu se produce una inhibición de la muerte celular inducida por TRAIL (Fig. 1.1B). Estos resultados indican que la ruta de MAPK/ERK juega un papel importante en la regulación de la apoptosis inducida por receptores de muerte. Además, como se muestra en la figura 1.1C, PDBu es capaz de inhibir la degradación de la proteína PARP-1, signo característico de células que sufren apoptosis (Germain, Affar et al. 1999).

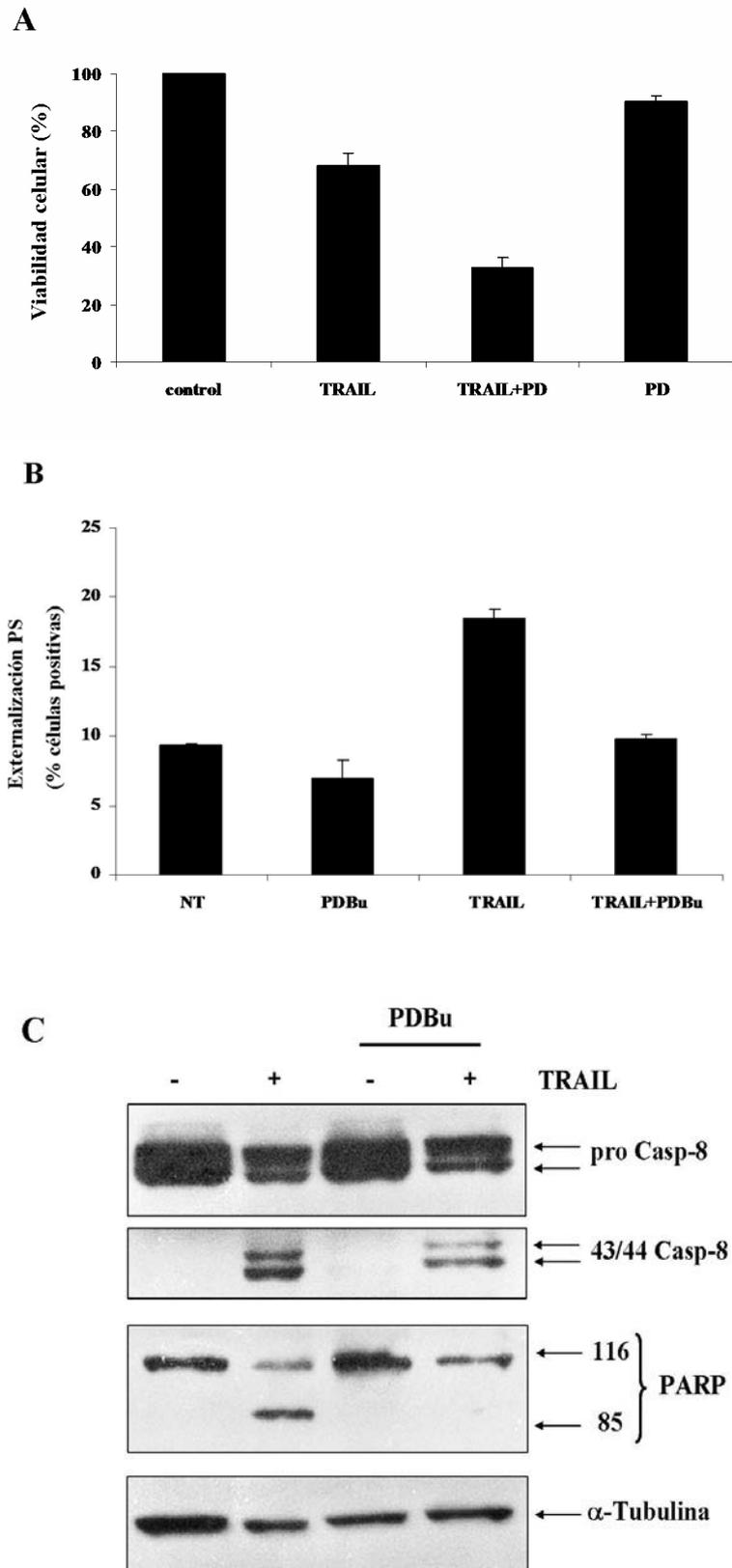


Figura 1.1.- 1 La ruta de MAPK/Erk1/2 inhibe la apoptosis inducida por TRAIL en células MCF-7.

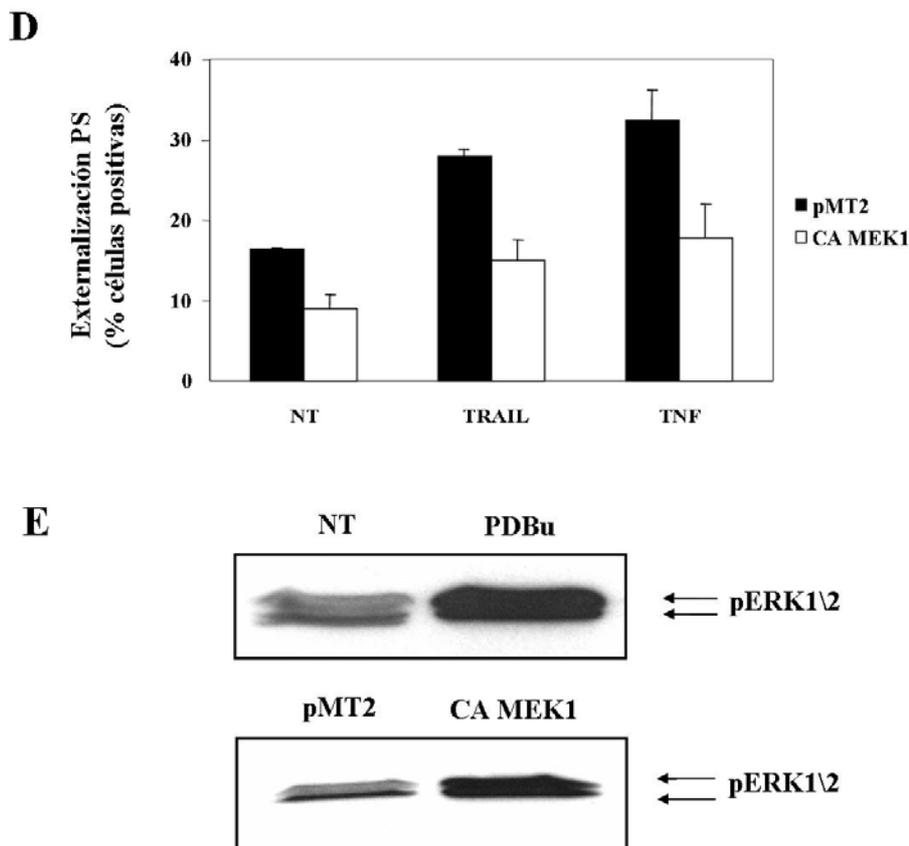


Figura 1.1 La ruta de MAPK/Erk1/2 inhibe la apoptosis inducida por TRAIL en células MCF-7.

(a) Células MCF-7 tratadas con PD98059(50 μ M) una hora antes de añadir TRAIL 100ng/ml durante 24h más. Se midió viabilidad celular por cristal violeta. Resultados representativos de 3 experimentos diferentes.(b) Células MCF-7 tratadas 8h con TRAIL(250ng/ml) tras una preincubación de 1 hora con o sin PDBu(20ng/ml). Se midió externalización de fosfatidil serina (PS) en la superficie celular por citometría de flujo tras tinción con Anexina-V-FLUOS. Las barras de error representan la desviación estándar de dos experimentos independientes.(c) Las células tratadas con PDBu (20ng/ml) 1h antes de añadir TRAIL (250ng/ml) durante 5h más, y posteriormente analizó la fragmentación de PARP western-blot. En la misma membrana se determinó la fragmentación de la caspasa-8. La α -tubulina sirvió como control de carga.(d) Células electroporadas con MEK1-CA y posteriormente tratadas 15h con TRAIL(100ng/ml) o TNF α (10ng/ml) más CHX (0,5 μ g/ml). Se midió externalización de fosfatidil serina en la superficie celular por citometría de flujo tras tinción con Anexina-V-FLUOS como medida de apoptosis. (e) La activación de Erk1/2 de células tratadas con PDBu durante 6h o electroporadas con MEK1-CA se determinó por inmunoblotting con un anticuerpo frente a la forma fosforilada de Erk1/2.

El papel que juega la ruta de MAPK/ERK1/2 en la inhibición de la apoptosis inducida por receptores de muerte se confirmó transfectando células MCF-7 con una forma constitutivamente activada de MEK-1 (MEK1-CA) antes del tratamiento con TRAIL o TNF α más CHX (Fig. 1.1D). Los resultados obtenidos indican que MEK1-CA hacía a las células insensibles a la apoptosis inducida por TRAIL o TNF α más CHX. Las transfecciones con el vector vacío irrelevante pMT2 no afectaban al número de células apoptóticas. La activación de la ruta de MAPK/ERK1/2 se confirmó analizando

mediante western-blot la forma fosforilada de ERK1/2 (Fig. 1.1E). Tanto la transfección de MEK1-CA como el tratamiento con PDBu de las células MCF-7, inducía un aumento en la cantidad de ERK1/2 fosforilado (Fig. 1.1E). Estos resultados confirman datos previos sobre la inhibición de la apoptosis inducida por TRAIL ejercida por la activación de la ruta de MAPK/ERK por PDBu (Sarker, Ruiz-Ruiz et al. 2001; Sarker, Ruiz-Ruiz et al. 2002).

Para tratar de averiguar en qué etapa de la señalización de apoptosis por TRAIL se produce la inhibición por la vía de MAPK, se analizaron diferentes eventos en la

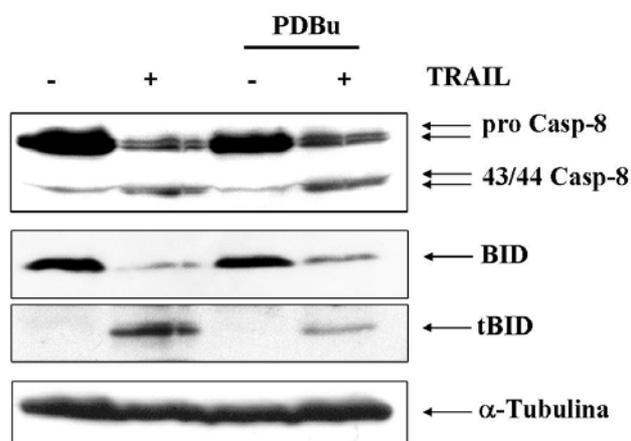


Figura 1.2. MAPK/ERK inhibe la muerte inducida por TRAIL sin afectar al procesamiento de caspasa-8 ni de BID.

Células MCF-7 fueron tratadas con PDBu (20ng/ml) 1h antes de añadir TRAIL (250ng/ml) durante 6h más. El procesamiento de caspasa 8 se determinó por Western Blot en los extractos celulares totales. La forma nativa de 55-53 kDa y la forma procesada de 43-41 kDa se indican por flechas. La pérdida de BID completo y la aparición de la forma truncada se determinaron con un anticuerpo frente a BID. Los resultados son representativos de tres experimentos diferentes.

disparada por TRAIL en un paso previo a la liberación de citocromo c de la mitocondria, pero posterior al procesamiento de la caspasa-8 y BID.

1.2- La vía MAPK/ERK1/2 inhibe la apoptosis inducida por TRAIL independientemente de la síntesis de proteínas en células MCF-7.

Como se ha dicho anteriormente, la activación de la vía de MAPK con ésteres de forbol inhibe la apoptosis mediada por TRAIL en células MCF-7. Por otra parte, se sabe

señalización de la muerte por TRAIL. Se observó que tras el tratamiento con TRAIL, eventos pre-mitocondriales, como la fragmentación de la caspasa-8 y el posterior procesamiento de BID, no se ven alterados cuando se activa la ruta de MAPK/ERK (Fig. 1.2 y 1C). Además, también se sabe que la liberación de citocromo c de la mitocondria está inhibida cuando la ruta de MAPK/ERK se activa (Sarker, Ruiz-Ruiz et al. 2002). Todo esto indica que la ruta ERK1/2 está inhibiendo la apoptosis

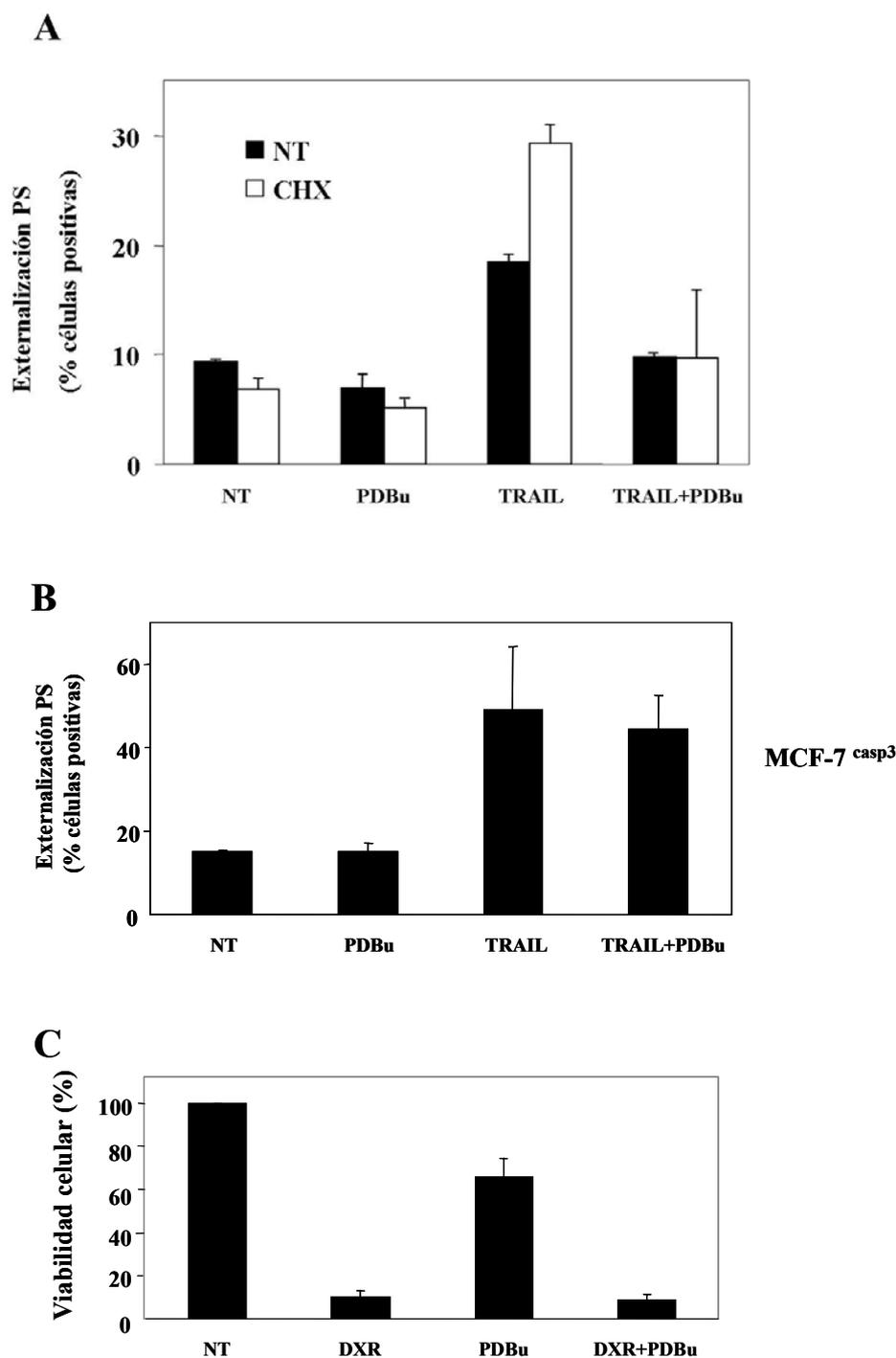


Figura 1.3. La vía de MAPK/ERK no requiere la síntesis de nuevas proteínas para antagonizar la apoptosis inducida por TRAIL.

(a) Células MCF-7 pre-tratadas con PDBu(20ng/ml) 1h antes de añadir TRAIL (250ng/ml) durante 6h más en presencia o ausencia de CHX(5µg/ml). CHX se añadió 1h antes que PDBu. Las barras de error representan la desviación estándar de dos experimentos independientes.(b) Células que expresan establemente caspasa-3 (MCF-7^{casp3}) tratadas con PDBU(20ng/ml) 1h antes de añadir TRAIL (100ng/ml) durante 5h. En (a) y (b) la apoptosis se cuantificó midiendo la externalización de PS por citometría de flujo.(c) MCF-7 se trataron con doxorubicina (DXR)(500ng/ml) durante 48h tras pretratar las células con PDBu(20ng/ml) durante 1h. La viabilidad celular se determinó por el método del cristal violeta. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

que la vía de MAPK activa genes implicados en supervivencia celular (Bonni, Brunet et al. 1999). Para averiguar si la inhibición de la apoptosis inducida por TRAIL ejercida por la activación de las MAPK es debida a la inducción de genes de supervivencia, células MCF-7 fueron tratadas con TRAIL y PDBu en presencia del inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (CHX) (Fig. 1.3A). Nuestros resultados muestran que la inhibición ejercida por PDBu se produce igualmente en presencia o ausencia de CHX, indicando que el efecto inhibitorio de las MAPK es independiente de la síntesis de nuevas proteínas.

Las células MCF-7, las cuales son deficientes en la expresión de caspasa-3 (Janicke, Sprengart et al. 1998), se han descrito como pertenecientes al grupo de células tipo II, es decir que necesitan de la vía mitocondrial para la señalización de la apoptosis mediada por receptores de muerte (Scaffidi, Fulda et al. 1998). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de Bcl-2 en células MCF-7 bloquea la apoptosis

inducida por un anticuerpo anti-CD95 (Ruiz-Ruiz, Munoz-Pinedo et al. 2000) y por TRAIL (Ruiz de Almodovar, Ruiz-Ruiz et al. 2001). Sin embargo, la sobreexpresión de caspasa-3 convierte a las células MCF-7 en células tipo I en las que la activación de las caspasas ejecutoras no está regulada por la vía mitocondrial y no son protegidas por Bcl-xL de la apoptosis inducida por receptores de muerte (Scaffidi, Fulda et al. 1998). Para indagar más en el mecanismo de inhibición ejercido por la vía MAPK/ERK1/2, se trató de ver el efecto del PDBu en la apoptosis inducida por TRAIL en células MCF-7 que sobreexpresan caspasa-3 (MCF-7-casp3). En contra de lo visto con células deficientes en caspasa-3, los resultados mostrados en la figura 1.3B, indican que la pre-incubación con PDBu no inhibe la apoptosis inducida por TRAIL en células MCF-7-casp3. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la activación de la ruta de MAPK inhibe la apoptosis inducida por TRAIL en algún paso de la vía mitocondrial.

Por otra parte, se ha demostrado que en células MCF-7, doxorubicina induce apoptosis a través de la ruta mitocondrial (Ruiz de Almodovar, Ruiz-Ruiz et al. 2001). Además, tanto en la apoptosis inducida por receptores de muerte como en la inducida por drogas genotóxicas, están involucradas las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak (Wei, Zong et al. 2001). Sin embargo, al contrario que en la apoptosis disparada por receptores de muerte, en la apoptosis por daño al ADN no está implicado el procesamiento de Bid por la caspasa-8 y la apoptosis todavía puede ocurrir en células que carecen de Bid tras un insulto genotóxico (Yin, Wang et al. 1999). Así pues, para

averiguar más del mecanismo por el cual las MAPK inhiben la apoptosis inducida por receptores de muerte, examinamos el efecto del PDBu en la muerte celular inducida por doxorrubicina. Como se muestra en la figura 1.3C, el tratamiento con PDBu en células MCF-7 no inhibe la muerte celular producida por doxorrubicina lo que sugiere que ésta parte de la ruta intrínseca de apoptosis no está afectada por la activación de las MAPK/ERK. Todos estos resultados apoyan más aún la hipótesis de que el efecto inhibitorio de la vía de MAPK/ERK sobre la apoptosis inducida por TRAIL se produce en la vía caspasa-8/Bid de la señalización.

1.3- La activación de la ruta MAPK/ERK reduce la localización mitocondrial de Bid provocada por TRAIL y TNF α , pero no afecta al procesamiento de Bid.

Para examinar si el efecto inhibitorio de las MAPK/ERK está afectando a la translocación del BID truncado (tBID) a la mitocondria, se expresaron de manera ectópica tres construcciones diferentes de BID-GFP, una de ellas (GFP-ttBID) posee el dominio BH3 truncado (Fig. 1.4), y se estudió su localización sub-celular. Primero se transfectaron de manera transitoria células MCF-7 con la proteína de fusión FullBID-GFP y luego fueron tratadas con TRAIL o TNF α . En células no tratadas, BID-GFP mostraba una distribución citosólica difusa (Fig. 1.5A). Después de 3h en presencia de

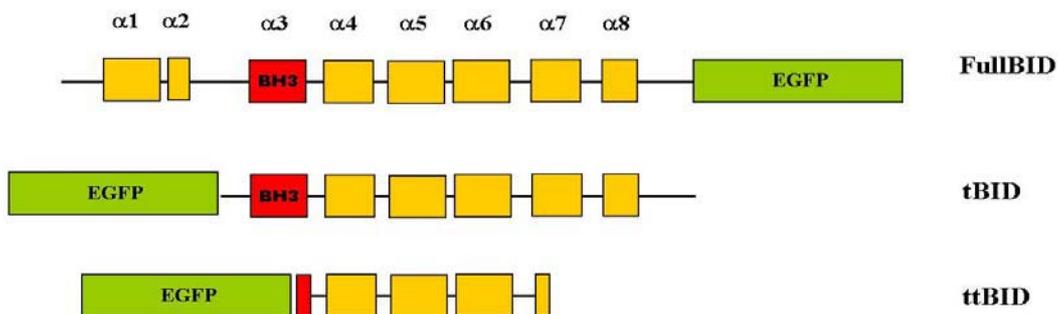


Figura 1.4. Diferentes construcciones de BID con la proteína verde fluorescente (GFP).

TRAIL o TNF α , BID-GFP, probablemente en la forma tBid-GFP generada por caspasa-8, mostraba un patrón de fluorescencia punteado indicativo de una localización mitocondrial tal y como sugiere su co-localización con el colorante específico de mitocondria MitoTracker-Red. Cuando las células transfectadas se incubaron con PDBu

antes del tratamiento con los ligandos de muerte, parte de las células mostraban una fluorescencia citosólica similar a la mostrada por las células no tratadas. El pre-tratamiento con el inhibidor específico de MKK1, PD98059, neutralizaba la inhibición que PDBu ejercía sobre la traslocación de BID-GFP inducida por ligandos de muerte (Fig. 1.5A). La incubación de las células MCF-7 con PD98059 y/o con PDBu no tenía ningún efecto sobre la localización de BID-GFP. Estos efectos sobre la translocación de BID-GFP se cuantificaron contando células que presentaban un patrón de fluorescencia punteado (Fig. 1.5B). En paralelo, se confirmó mediante inmunoblotting con un anticuerpo que reconoce GFP que PDBu no estaba afectando al corte de FullBID-GFP

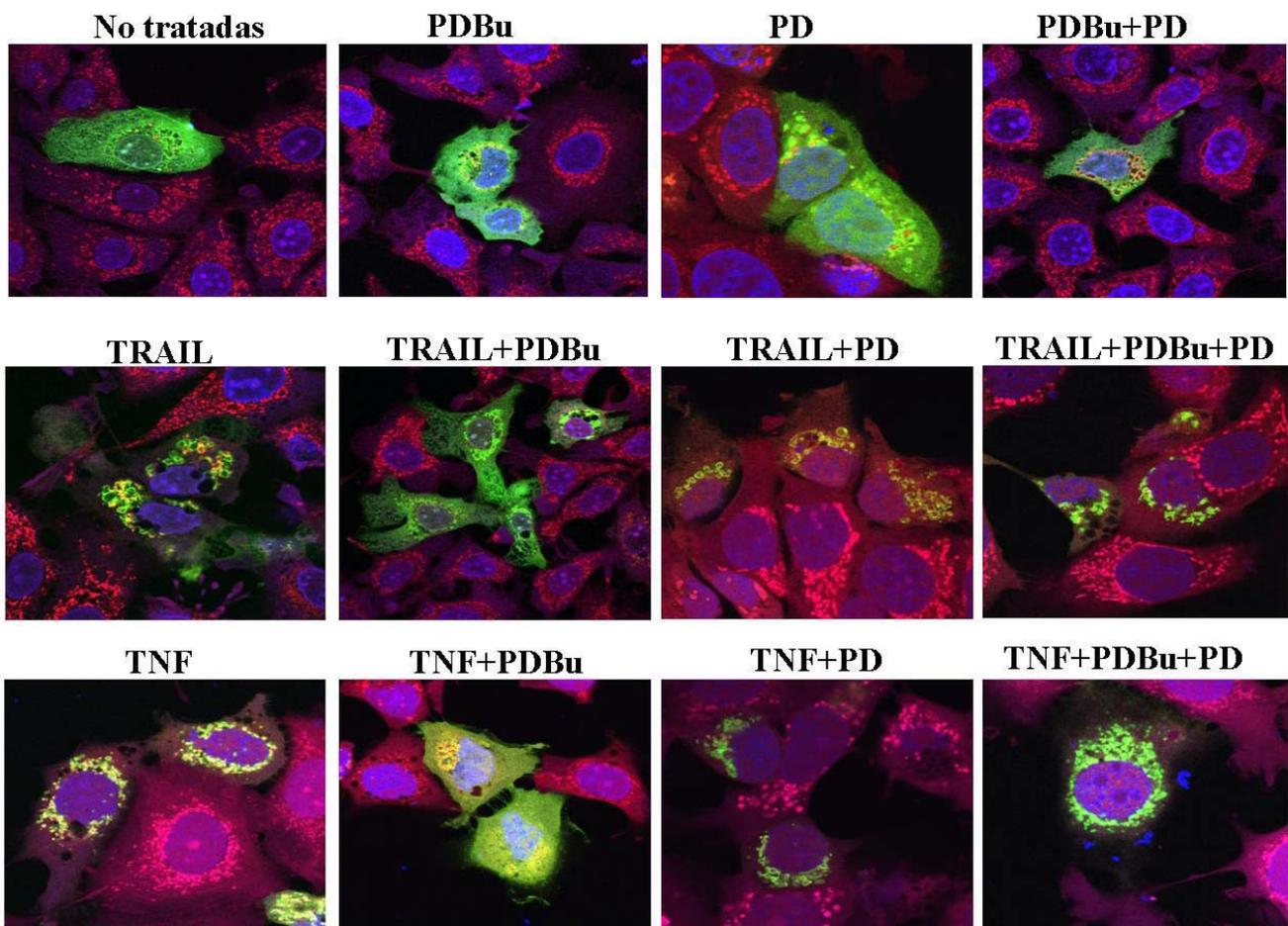


Figura 1.5. La activación de la vía de MAPK/ERK inhibe la localización mitocondrial inducida por TRAIL o TNF α . (a) Se transfectaron células MCF-7 transitoriamente con la construcción FullBID-GFP utilizando el reactivo FuGENE 6. Posteriormente (15h después) se trataron con PD98059 (50 μ M) 1h antes de añadir PDBu (20ng/ml) durante 30 minutos más y luego fueron tratadas con TRAIL (100ng/ml) o TNF α (10ng/ml) durante 3h más. Una hora antes de tratar con TNF α las células se pre-trataron con CHX (500ng/ml). Tras los tratamientos, las células fueron fijadas y analizadas en un microscopio confocal. La mitocondria se identificó tiñendo con MitoTracker Red(rojo) y los núcleos con Tropo3(azul).

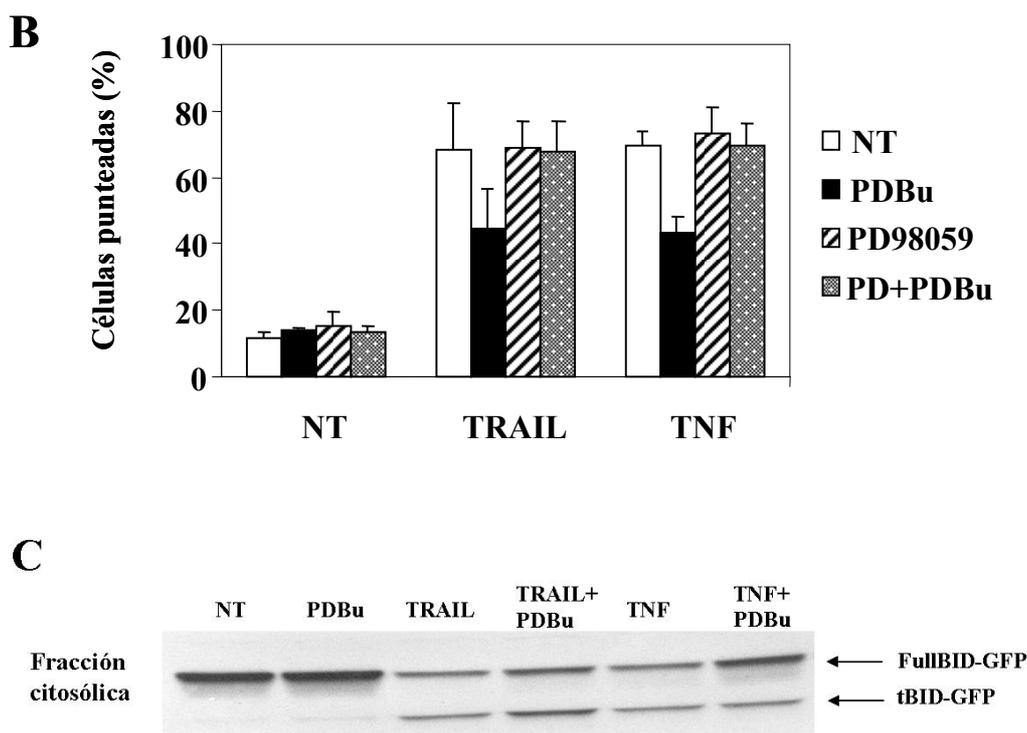


Figura 1.5. La activación de la vía de MAPK/ERK inhibe la localización mitocondrial inducida por TRAIL o TNF α .

(b) La cuantificación del efecto inhibitorio se realizó contando células con un patrón de fluorescencia verde punteado. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes. (c) El corte de FullBID-GFP se determinó mediante inmunoblotting de la fracción citosólica con un anticuerpo anti GFP.

(Fig. 1.5C). En conjunto, los resultados anteriores indican que la localización mitocondrial de BID-GFP inducida por receptores de muerte es parcialmente prevenida cuando se activa la vía de MAPK/ERK, y esta inhibición se produce con posterioridad al corte de BID por la caspasa-8.

1.4- La localización mitocondrial de BID truncado es revertida en presencia de un activador de la vía de MAPK/ERK.

Para dilucidar si la localización mitocondrial de BID truncado podía ser inhibida en células con la vía de MAPK/ERK activada, se transfectaron células MCF-7 con la construcción GFP-tBID. En células no tratadas, la transfección con GFP-tBID daba un patrón de fluorescencia punteado, indicativo de una localización mitocondrial, en la mayoría de las células transfectadas (83%) (Fig. 1.6A). Sin embargo, el tratamiento con PDBu producía una reducción considerable en el número de células que presentaban una fluorescencia con un patrón mitocondrial. La activación de la ruta de MAPK/ERK

era la responsable de esta inhibición observada ya que el efecto de PDBu era revertido en presencia de PD98059 (Fig. 1.6A y 1.6B). Resultados similares se obtuvieron cuando las células MCF-7 fueron transfectadas con una transfección diferente de tBID, la construcción GFP-ttBID, la cual tiene el dominio BH3 truncado (Fig. 1.6C). El dominio BH3 es fundamental para que esta proteína interactúe con otras proteínas Bcl-2 y ejerza su función pro-apoptótica (Kelekar and Thompson 1998). Como se muestra en las figuras 1.6C y 1.6D, GFP-ttBID también se localizaba en la mitocondria de células no tratadas y dicha localización era parcialmente inhibida por PDBu. De nuevo, PD98059 revertía el efecto de PDBu (Fig. 1.6D). Estos datos indican que la falta del dominio BH3 no altera el efecto de las MAPK sobre la localización de BID y también apunta que la interacción de BID con otras proteínas Bcl-2 no es necesaria para la inhibición ejercida por las MAPK.

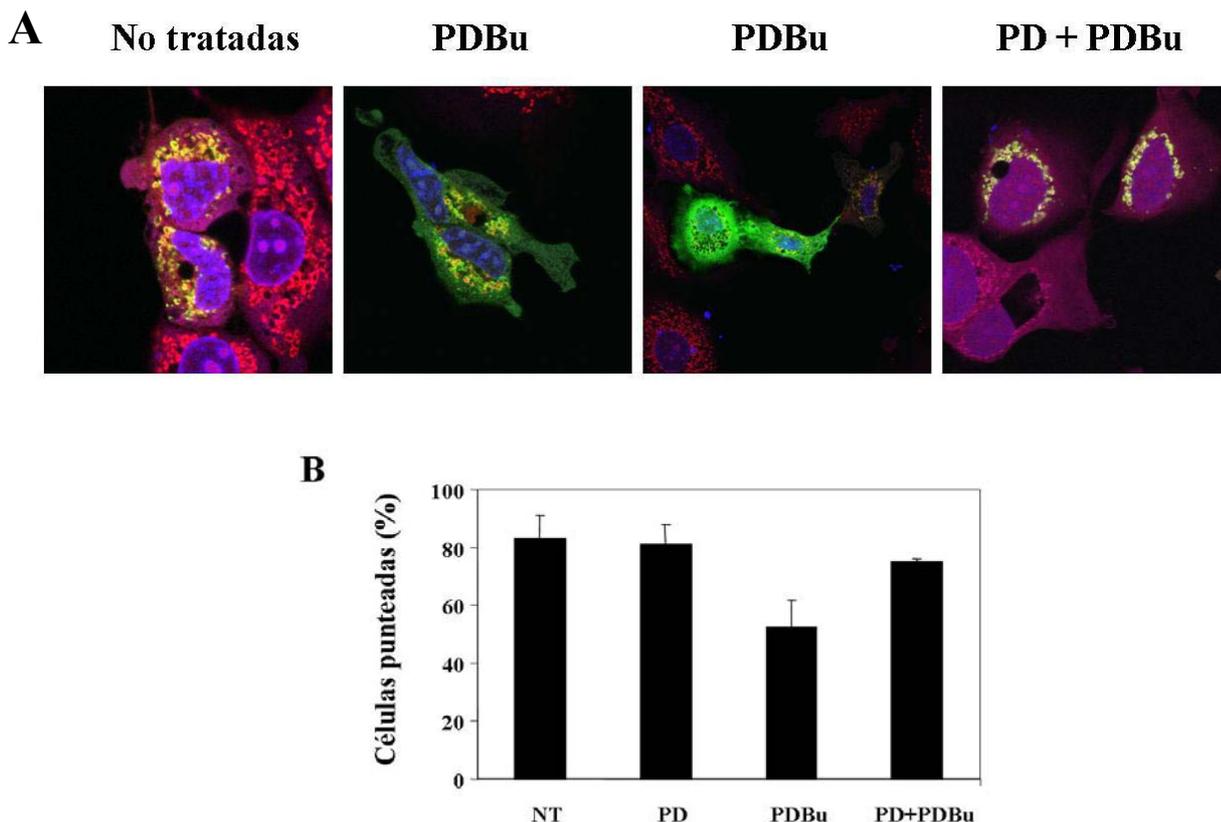


Figura 1.6. La activación de la ruta ERK1/2 cambia la localización mitocondrial de GFP-tBID al citosol.

(a) Se transfectaron células MCF-7 tal como se dice en Fig.5^a pero con la construcción GFP-tBID. Posteriormente se trataron con PD98059 (50 μ M) 1h antes de añadir PDBu (20ng/ml) durante 4h más. Y luego se fijaron las células y se analizaron en un microscopio confocal.(b) La cuantificación de la localización mitocondrial de GFP-tBID se realizó contando células con un patrón de fluorescencia verde punteado. Las barras de error representan la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

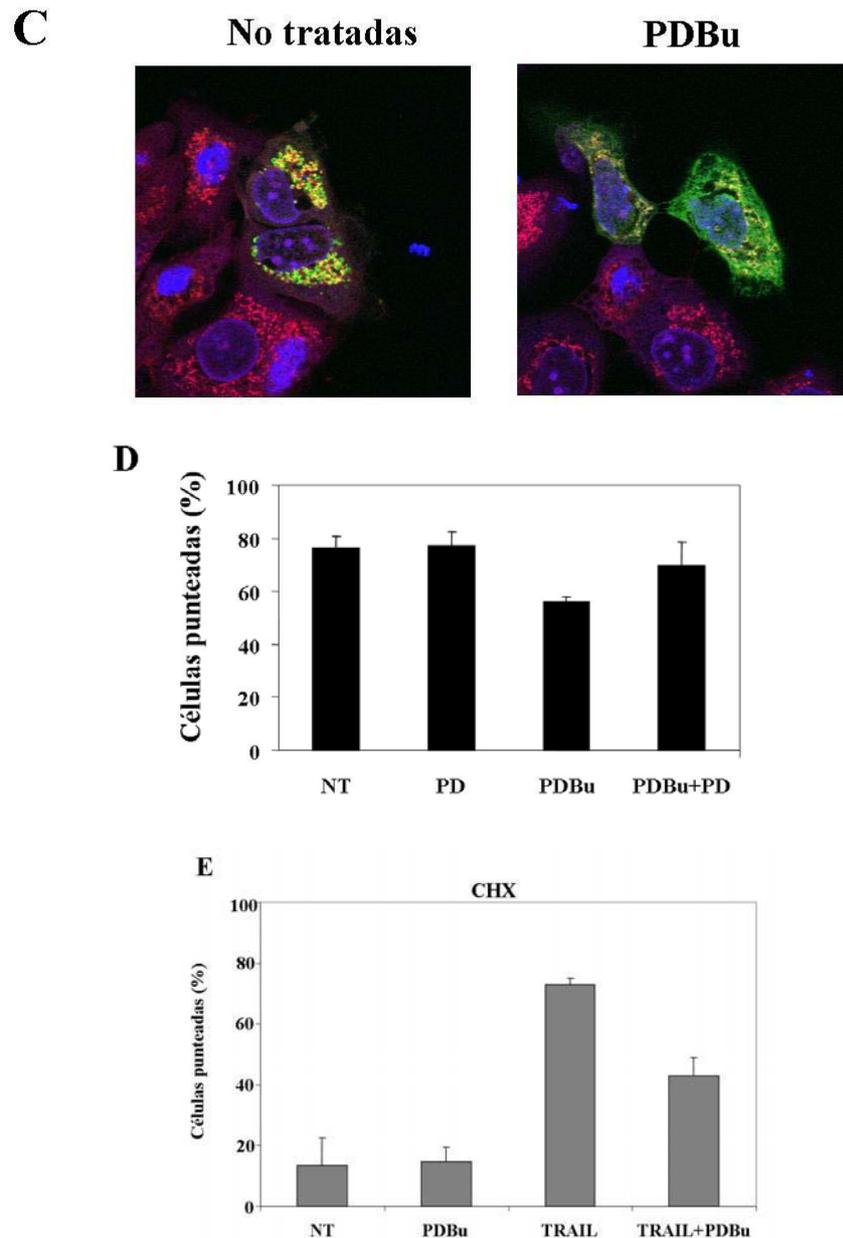


Figura 1.6. La activación de la ruta ERK1/2 cambia la localización mitocondrial de GFP-tBID al citosol.

El mismo protocolo se siguió para analizar el comportamiento de la construcción GFP-ttBID(d) y (e) o cmvFullBID-GFP(e). Sin embargo, puesto que dichas construcciones esta bajo el control del promotor CMV(cytomegalovirus), los tratamientos con PDBu se hicieron siempre en presencia de CHX(500ng/ml) para evitar la síntesis de nueva proteína.

Resultados similares a los anteriores se obtuvieron cuando se utilizó la construcción CMV-FullBID-GFP, con las mismas características de FullBID-GFP pero preparada en un vector bajo el promotor del citomegalovirus humano (CMV). Se sabe que la actividad de dicho promotor puede verse aumentada tras el tratamiento con

ésteres de forbol (Kovacs and Kaplan 1992; Maass, Langer et al. 2003). Para evitar la posibilidad de que PDBu provocara efectos no deseados sobre la actividad del promotor CMV, dando lugar a posibles resultados adulterados, antes de tratar con ésteres de forbol, las células se pre-trataron 1h con el inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (CHX). Como se muestra en la figura 1.6E, PDBu provoca una disminución del número de células que presentan una localización mitocondrial de BID-GFP tras el tratamiento de TRAIL. Además, la transfección de una forma constitutivamente activada de la isoforma theta de PKC, que se sabe activa la vía de MAPK/ERK (Werlen, Jacinto et al. 1998), inhibía también la localización mitocondrial tanto de BID-GFP tras el tratamiento con TRAIL (Fig. 1.7A), como de GFP-tBID (Fig. 1.7B).

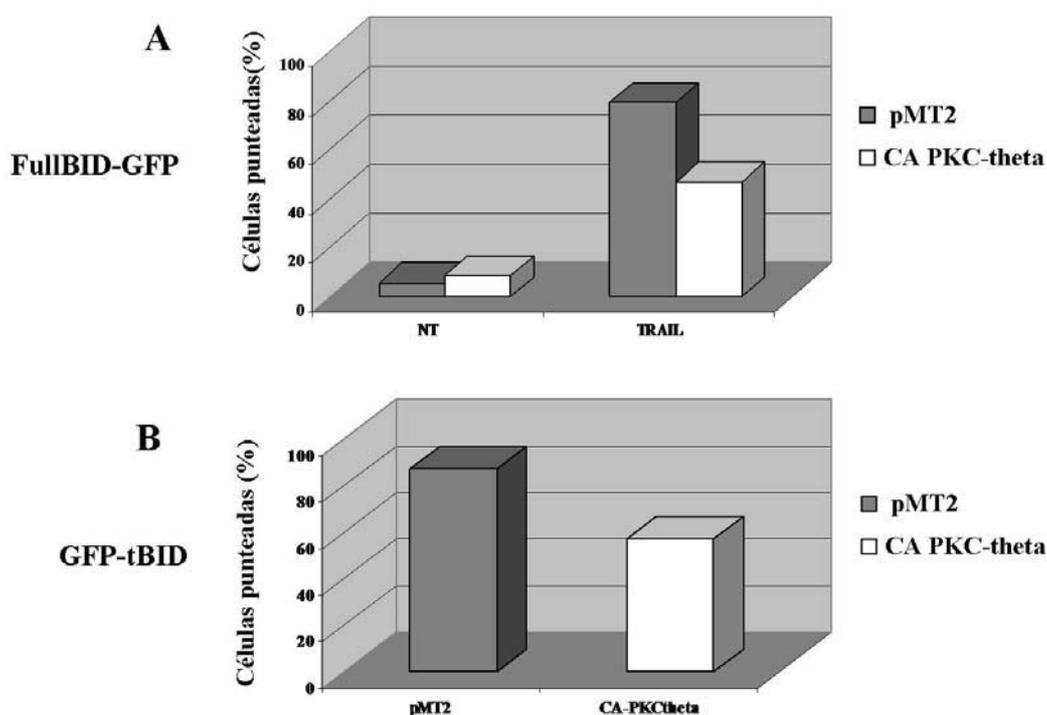


Figura 1.7. PKC-theta constitutivamente activada inhibe la localización mitocondrial de las construcciones de BID con GFP.

Células MCF-7 se co-transfectaron con FullBID-GFP (a) o con GFP-tBID (b) o con un vector irrelevante (pMT2). Tras 15h se trataron con TRAIL (100ng/ml) durante 6h antes de fijarlas(a), o no se trataron, y se recogieron a las 21h para fijarlas (b) y analizarlas por microscopía confocal. La cuantificación de la localización mitocondrial de las construcciones de BID con GFP se realizó contando células con un patrón de fluorescencia verde punteado

Después se analizó si la activación de las MAPK estaba inhibiendo realmente la translocación de tBID del citosol a la mitocondria o si lo que estaba haciendo era revertir su localización mitocondrial. Para estudiar si PDBu era capaz de cambiar la localización de tBID de la mitocondria al citosol, se transfectaron de manera transitoria

células MCF-7 con GFP-tBID y 15h después se trataron con PDBu en presencia de cicloheximida para evitar que la síntesis de nuevas moléculas GFP-tBID pudieran falsear el resultado. Posteriormente, las células fueron fijadas y la localización de GFP-tBID se evaluó mediante microscopía confocal. A tiempo 0h, antes de la adición de PDBu y cicloheximida, casi todas las células presentaban una localización mitocondrial de GFP-tBID. Sin embargo, el número de células con un GFP-tBID no mitocondrial aumentó conforme aumentaba el tiempo de tratamiento con PDBu (Fig. 1.8). Estos datos muestran que la activación de la vía de MAPK/ERK1/2 es capaz de revertir la localización de BID truncado de la mitocondria al citosol. Todos juntos, estos resultados muestran que la ruta MAPK/ERK protege a las células MCF-7 de la apoptosis inducida por TRAIL y TNF α inhibiendo la localización normal de tBID en la mitocondria.

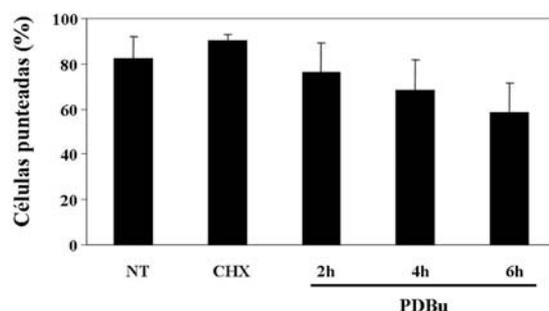


Figura 1.8. PDBu revierte la localización de GFP-tBID de la mitocondria al citosol.

Células MCF-7 se transfectaron con GFP-tBID y se trataron 15h después con CHX (5 μ g/ml) 1h antes de añadir PDBu (20ng/ml) y se incubaron durante 2, 4 o 6h. Posteriormente se fijaron las células y la localización de GFP-tBID se realizó mediante microscopía confocal. La cuantificación de la localización mitocondrial de GFP-tBID se realizó contando células con un patrón de fluorescencia verde punteado.

1.5- La activación de la ruta de MAPK/ERK inhibe la liberación de citocromo-c de la mitocondria disparada por tBID-recombinante.

Una de las consecuencias de la traslocación de BID truncado a la mitocondria es la liberación de citocromo-c de este orgánulo, en una acción concertada con las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak (Wei, Zong et al. 2001). Para ratificar que el paso inhibido por la activación de MAPK en la apoptosis inducida por receptores de muerte está por debajo de la formación de tBID se realizaron una serie de experimentos con células MCF-7 permeabilizadas con digitonina. La adición de tBID recombinante a células permeabilizadas provocó una liberación acentuada de citocromo-c de la mitocondria DOSIS-RESPUESTA de tBid recombinante (Fig. 1.9). El pretratamiento

de las células con PDBu bloqueó ésta liberación de citocromo-c (Fig. 1.9), corroborando que el efecto protector del PDBu se produce por debajo del corte de BID.

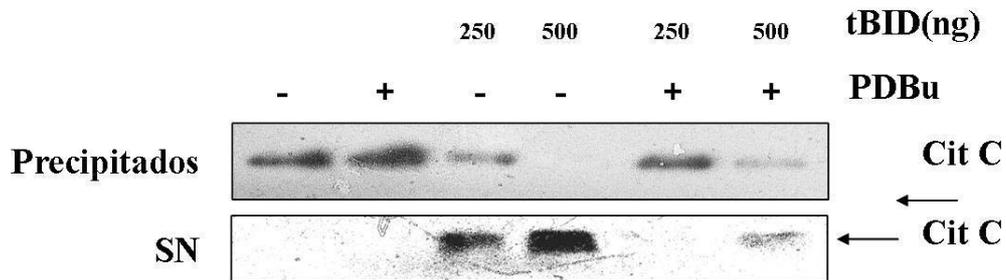


Figura 1.9. PDBu bloquea la liberación de citocromo-c disparada por tBID recombinante en células permeabilizadas.

Células MCF-7 tratadas o no con PDBu (20ng/ml) se permeabilizaron durante 10 min con un tampón que contenía digitonina (40µg/ml) en presencia o no de la proteína recombinante tBID (500ng/ml). Posteriormente se centrifugaron las células y los sobrenadantes y los pellets se resolvieron en un gel SDS-PAGE y se detectó el citocromo-c liberado mediante inmunoblotting con un anticuerpo anti citocromo-c tal como se describe en materiales y métodos.

2.-Roscovitina sensibiliza a células tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL

2.1-Roscovitina sensibiliza a diferentes líneas tumorales de cáncer de mama a la apoptosis inducida por TRAIL.

Se ha descrito que TRAIL es capaz de inducir apoptosis en células tumorales pero no en células normales. Sin embargo, no todas las células tumorales son sensibles a la muerte inducida por TRAIL, por lo tanto la búsqueda de nuevas estrategias que hagan sensibles a estas células resistentes es objeto de estudio en esta tesis. La actividad citotóxica de TRAIL humano recombinante se testó en ocho líneas tumorales de mama: MDA-MB-468, MDA-MB-231 J.A., EVSA-T, BT-474, MDA-MB-435-S, MDA-MB-231, SKBr-3 y MCF-7. Estas líneas celulares se trataron con diferentes concentraciones de TRAIL (25-500ng/ml) durante 15h (Fig. 2.1A). El tratamiento con TRAIL produjo poca muerte celular indicando que la mayoría de estas células eran resistentes a las concentraciones de TRAIL utilizadas. Al objeto de conocer si la resistencia de estas líneas celulares se debía a la posible existencia de inhibidores intracelulares o por el contrario era una consecuencia meramente de diferencias en la expresión de receptores de TRAIL, se realizaron experimentos de sensibilidad a apoptosis en presencia del inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida. Como se muestra en la figura 2.1A, CHX por si sola apenas producía muerte celular a la dosis y tiempos indicados. Sin embargo, la combinación de CHX y TRAIL sensibilizaba a todas las líneas tumorales a la apoptosis inducida por este ligando de muerte (Fig. 2.1A).

Ha sido descrito que moléculas inhibidoras de quinasas dependientes de ciclina (CDKs) como por ejemplo el flavopiridol, la olomoucina, o la roscovitina, son capaces de inducir apoptosis en diferentes líneas tumorales además de potenciar el efecto antitumoral de diversos agentes citotóxicos (Grant and Roberts 2003). Algunos de estos inhibidores están siendo actualmente objeto de ensayos clínicos. En el examen de nuevas drogas antitumorales que induzcan la sensibilización de las células tumorales de mama a TRAIL, determinamos el efecto de la combinación de TRAIL con roscovitina. En estos experimentos se observó que la roscovitina, a las concentraciones utilizadas, era un débil inductor de apoptosis. Sin embargo, si las células se incubaban con

roscovitina durante 7h y luego con TRAIL durante otras 15h más, la muerte por apoptosis aumentaba de manera considerable (Fig. 2.1B). Para corroborar que las células tratadas con roscovitina o CHX más TRAIL estaban muriendo por apoptosis, se

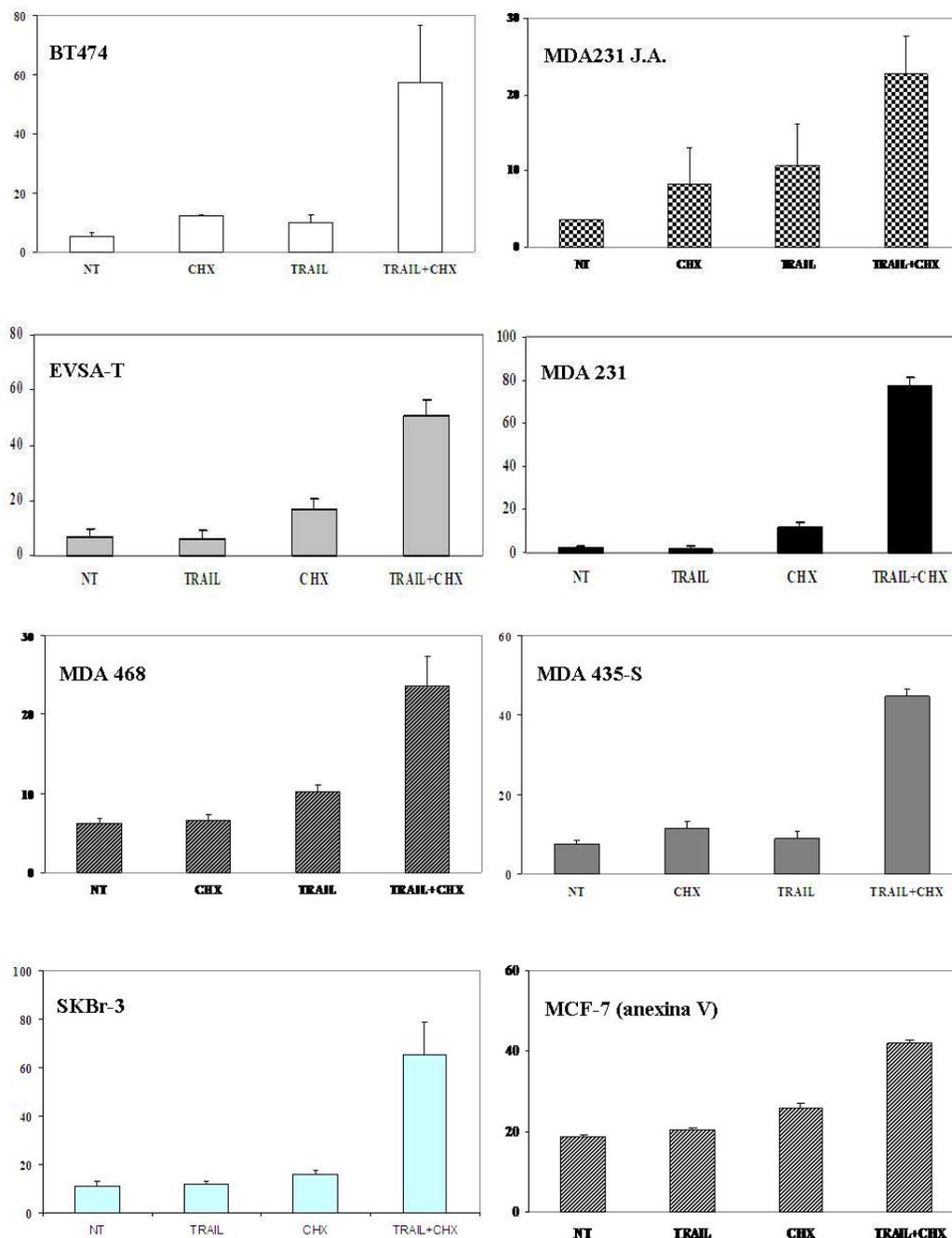


Figura 2.1. Roscovitina sensibiliza a diferentes líneas tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL.

(a) Las líneas tumorales indicadas fueron incubadas en presencia de CHX 5 μ /ml 1h y posteriormente se trataron en el mismo medio de cultivo con TRAIL durante 15h más a las concentraciones indicadas. La apoptosis se determinó cuantificando las células hipodiploides mediante el análisis del ciclo celular por citometría de flujo (análisis de subG1). En la línea celular MCF-7 la apoptosis se determinó midiendo la externalización de la fosfatidil serina por citometría de flujo. La barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

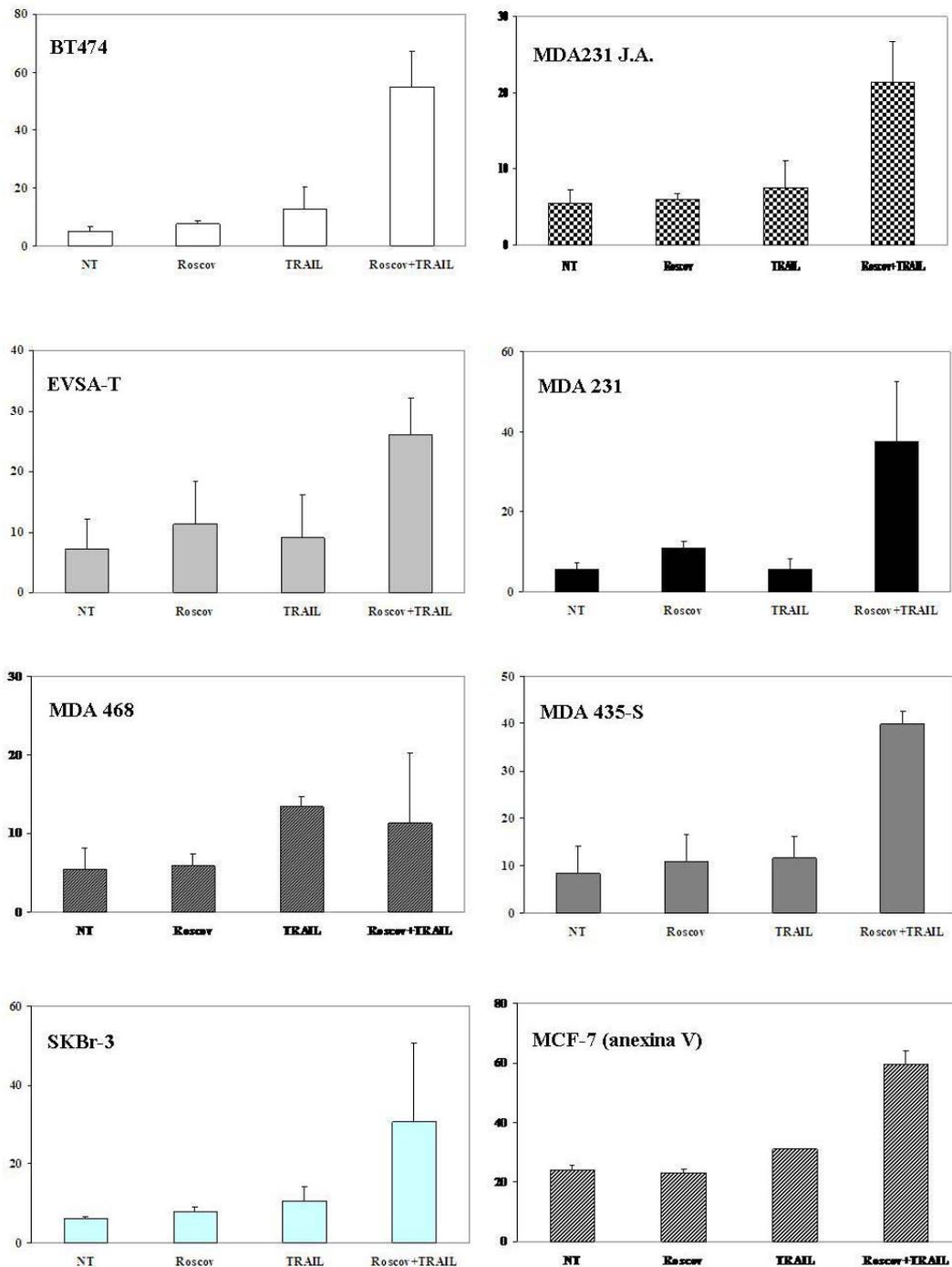


Figura 2.1. Roscovitina sensibiliza a diferentes líneas tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL.

(b) Las líneas tumorales indicadas fueron incubadas en presencia de roscovitina 40 μ M durante 7h y posteriormente se trataron en el mismo medio de cultivo con TRAIL durante 15h más a las concentraciones indicadas. La apoptosis se midió de igual manera que en (a).

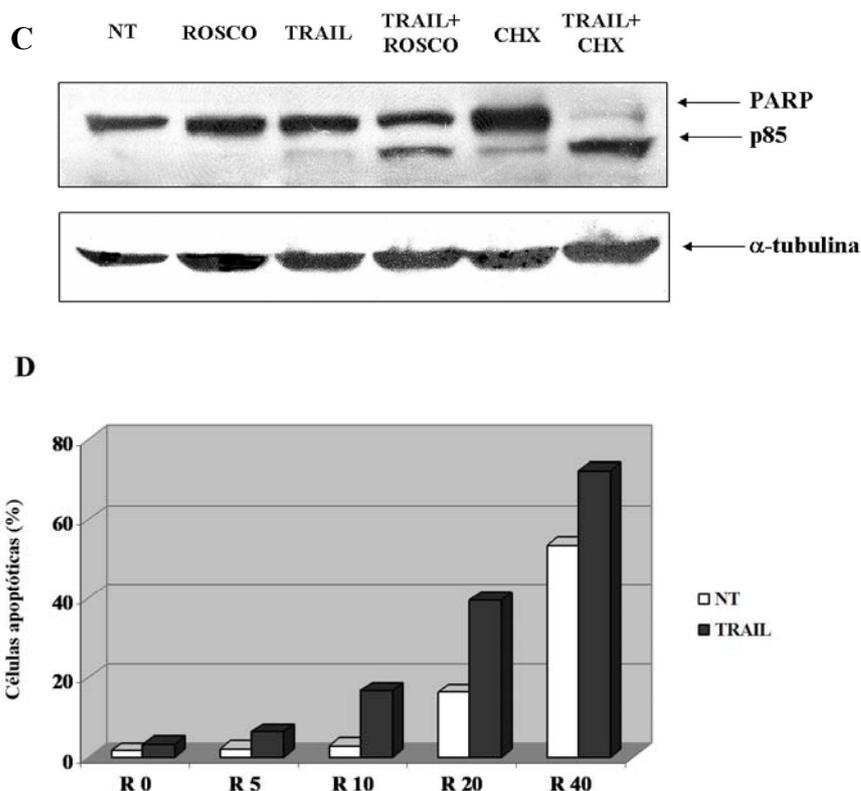


Figura 2.1. Roscovitina sensibiliza a diferentes líneas tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL.

c) Células MDA-MB-231 incubadas con roscovitina (40 μ M) por 7h o CHX (5 μ g/ml) durante 1h antes de añadir TRAIL(500ng/ml) e incubar 15h más. La fragmentación de la PARP-1 se determinó mediante inmunoblotting con un anticuerpo anti-PARP tal como se describe en materiales y métodos.(d) células MDA-MB-231 se trataron con roscovitina a las dosis indicadas (0-40 μ M) durante 15h antes de añadir TRAIL (500ng/ml) 5h más.

determinó la degradación proteolítica del sustrato de caspasas PARP-1 en la línea celular MDA-MB-231. Como muestra la figura 2.1C, el corte de PARP inducido por TRAIL estaba claramente aumentado en las células pretratadas con roscovitina o CHX.

Previamente se determinó cuál era la concentración de roscovitina más adecuada, de manera que provocara la sensibilización a TRAIL de las células MDA-MB-231 pero que no produjera muerte por si sola. Se realizaron experimentos de dosis-respuesta con diferentes concentraciones de roscovitina y una dosis fija de TRAIL (500ng/ml) en células MDA-MB-231 (Fig. 2.1D). La dosis adecuada se encontraba entre 20 y 40 μ M de roscovitina. Todos estos resultados demuestran que el tratamiento

combinado de roscovitina o CHX con TRAIL aumenta, efectivamente, la apoptosis en líneas tumorales de mama resistentes a la muerte inducida por TRAIL.

2.2-El tratamiento con roscovitina aumenta la activación de caspasa-8 tras el tratamiento con TRAIL, pero no produce ningún cambio en la expresión en superficie de los receptores de TRAIL.

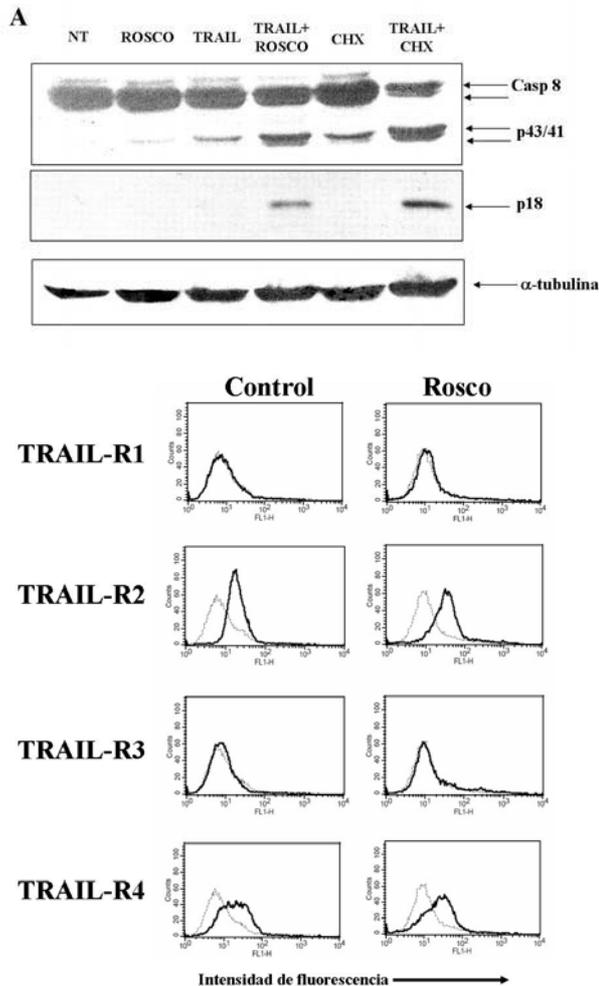


Figura 2.2. Roscovitina aumenta la activación de caspasa-8 producida por TRAIL pero no cambia el estado de los receptores en membrana.

(a) Células MDA-MB-231 incubadas con roscovitina (40 μ M) por 7h o CHX (5 μ g/ml) durante 1h antes de añadir TRAIL(500ng/ml) e incubar 15h más. La activación de caspasa-8 se determinó mediante inmunoblotting con un anticuerpo anti-caspasa-8 tal como se describe en materiales y métodos. (b) La expresión de los receptores de TRAIL se determinaron mediante citometría de flujo con anticuerpos primarios contra los receptores TRAIL-R1, R2, R3 y R4 (línea continua) o con un anticuerpo irrelevante (líneas punteadas) tal y como se describe en materiales y métodos.

Para tratar de entender la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL tras el tratamiento con roscovitina en las células de cáncer de mama, se decidió analizar diferentes eventos bioquímicos que se conoce ocurren tras la unión de TRAIL a sus receptores de muerte en la superficie de la célula. Como se describió anteriormente, TRAIL inicia la cascada apoptótica provocando la formación del DISC con el reclutamiento de la molécula adaptadora FADD a los receptores de TRAIL así como la subsiguiente incorporación y activación de la caspasa-8 a este complejo (Muzio, Chinnaiyan et al. 1996; Bodmer, Holler et al. 2000; Kischkel, Lawrence et al. 2000). La activación de la caspasa-8 en células MDA-MB-231 se determinó analizando

mediante western-blot, el procesamiento de la pro-caspasa en los fragmentos proteolíticos intermediarios de 43 y 41kDa correspondientes al corte de la procaspasa-8a y 8b y el posterior procesamiento hasta el fragmento de 18kDa. Como se muestra en la figura 2.2A, la activación de la caspasa-8 inducida por TRAIL era mucho mayor cuando las células eran pre-tratadas previamente con roscovitina. Cuando el pre-tratamiento era con CHX se producía también un aumento en el procesamiento de la caspasa-8 tras la incubación con TRAIL (Fig. 2.2A). Estos resultados indican que eventos tempranos en la señalización de la apoptosis por TRAIL ya están aumentados tras el tratamiento con roscovitina o CHX.

Por otra parte, se conoce que el aumento de la expresión de los receptores de muerte TRAIL-R1 y R2, tras tratamientos con agentes quimioterapéuticos o radiación, provoca un aumento en la apoptosis inducida por TRAIL (Gibson, Oyer et al. 2000; Nagane, Pan et al. 2000). Así pues, examinamos el efecto de la roscovitina en la expresión de los receptores TRAIL-R1, R2, R3 y R4 en la superficie celular de las células MDA-MB-231 mediante citometría de flujo. Como se muestra en la figura 2B, apenas hay expresión en superficie de los receptores TRAIL-R1 y R3. Por otra parte, el tratamiento con roscovitina no alteró de manera significativa la expresión en membrana de los receptores TRAIL-R2 o TRAIL-R4. Estos resultados sugieren que roscovitina no sensibiliza a las células MDA-MB-231 a la apoptosis inducida por TRAIL mediante una modulación en la expresión de los receptores de TRAIL en la superficie de la célula.

2.3-El reclutamiento de la caspasa-8 y FADD al DISC de TRAIL se ve aumentado en células MDA-MB-231 tras su tratamiento con roscovitina.

Los datos anteriores llevan a pensar que la sensibilización por roscovitina a la muerte por TRAIL ocurre en una etapa temprana de la señalización, ya que, por ejemplo, el procesamiento de caspasa-8 ya se ve aumentado tras el tratamiento con roscovitina, a pesar de que la expresión de los receptores de TRAIL en superficie no se ve afectada.

Por otra parte, como ya se ha descrito anteriormente, la señalización de TRAIL lleva a la formación del complejo DISC, el cual contiene las proteínas FADD y caspasa-8, que son las principales iniciadoras de la apoptosis en la muerte por receptores. Así pues, examinamos la formación del DISC de TRAIL utilizando un TRAIL biotinilado

recombinante (TRAIL-b). El DISC de TRAIL fue precipitado a partir de los lisados celulares (tras normalizar la carga de proteínas) de células controles o tratadas con roscovitina, utilizando para ello resina de estreptavidina-agarosa, tras tratar con TRAIL-b durante los tiempos indicados. Tal como indica la figura 3, en el DISC de las células tratadas con roscovitina se produce un mayor reclutamiento de procaspasa-8. También se observó un aumento de FADD en el DISC en las células que estaban tratadas con roscovitina con respecto a las no tratadas. Los niveles de cFLIP_L y cFLIP_S reclutados en el DISC eran ligeramente menores en las células tratadas con roscovitina (Figura 2.3, comparar calles 3-4, 5-6 y 7-8). Además, tanto en las células controles como en las tratadas, cFLIP_L fue cortado por la caspasa-8 para formar un fragmento de 43kDa, el

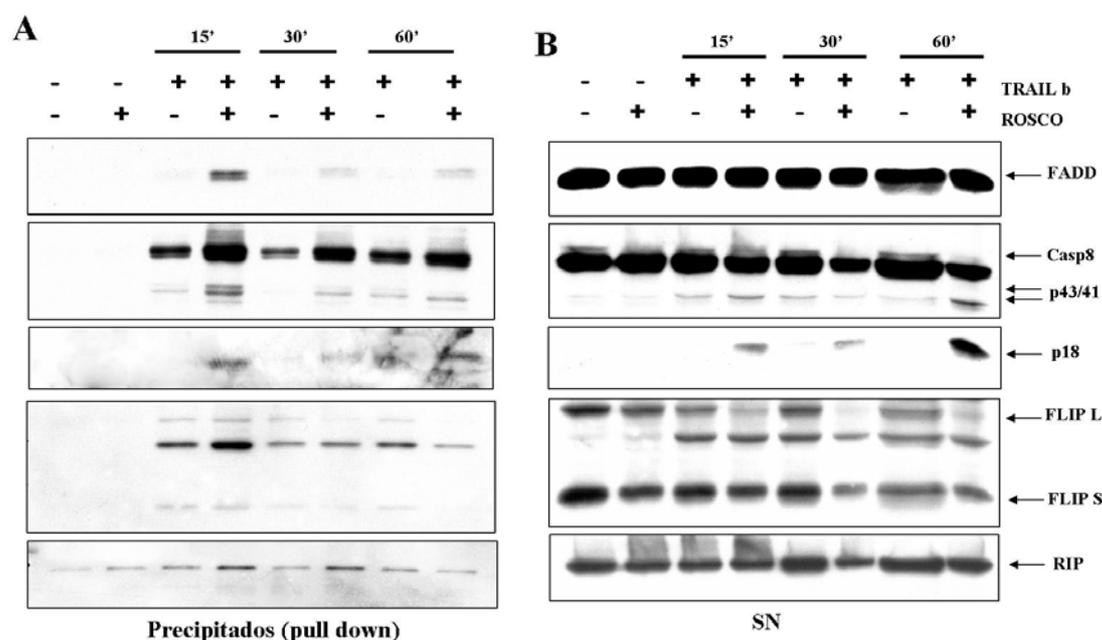


Figura 2.3. El reclutamiento de la caspasa-8 y de FADD a nivel del DISC de TRAIL se ve aumentado tras el tratamiento con roscovitina.

Células MDA-MB-231 se incubaron durante 15h con o sin roscovitina (20 μ M) y posteriormente se trataron con TRAIL-b (biotinilado) (1 μ g/ml) durante 15, 30 y 60min. Los complejos del receptor de TRAIL se precipitaron con bolitas de agarosa estreptavidina y se analizaron por western-blot para detectar los componentes del DISC, FADD, caspasa-8, FLIP y RIP (a). Los lisados aislados de células control no estimuladas se incluyeron como control de carga de todas estas proteínas (b). Los datos mostrados son representativos de tres experimentos diferentes.

cual probablemente representa el producto de FLIP (FLIP_c) obtenido tras la eliminación de la subunidad p10 C-terminal (Scaffidi, Schmitz et al. 1999). Se observó además, un aumento en el ratio caspasa-8/FLIP en el complejo DISC de las células tratadas con roscovitina, sugiriendo que este ratio podría ser importante en la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por TRAIL, tal como proponen también otros autores (Harper, Farrow et al. 2001; MacFarlane, Harper et al. 2002). Niveles similares de RIP

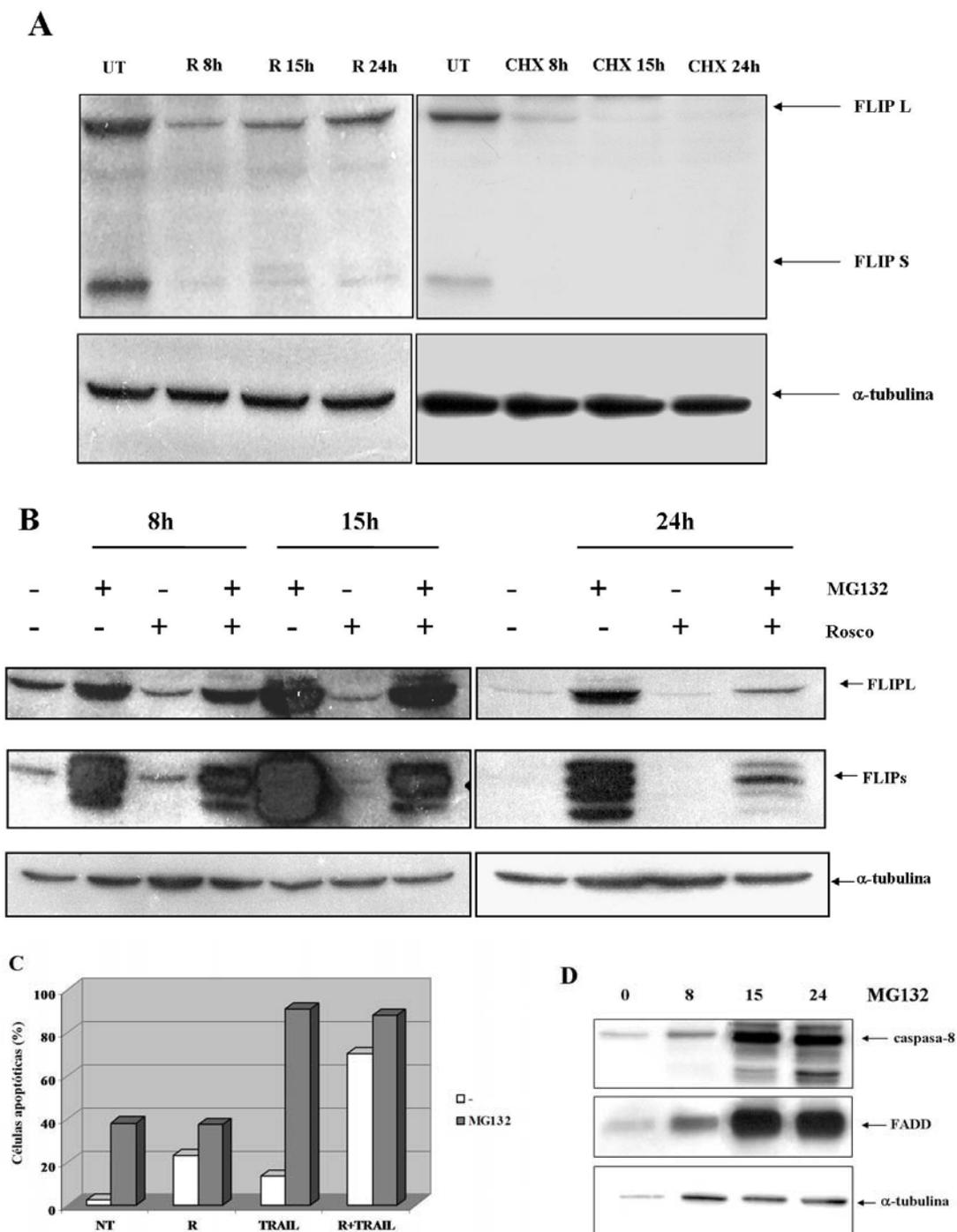


Figura 2.4. El tratamiento con roscovitina reduce los niveles de proteína de FLIP a pesar de la inhibición del proteosoma.

Células MDA-MB-231 se incubaron con (a) roscovitina (20 μ M) (panel izquierdo) o CHX(5 μ g/ml) (panel derecho) durante los tiempos indicados. En (b) las células se preincubaron con MG132 (25 μ M) 30 min. Los niveles de FLIPL y FLIPs se determinaron mediante western blot. Los datos mostrados son representativos de más de tres experimentos diferentes. (c) Células tratadas con roscovitina (20 μ M) 7h antes de añadir TRAIL (500ng/ml) durante 15h más, en presencia o no de MG132 (25 μ M) añadido 30 minutos antes que roscovitina. La apoptosis se determinó mediante el análisis de subG1 por citometría.(d) Las células MDA-MB-231 se trataron con MG132 (25 μ M) durante los tiempos indicados. Los niveles de proteínas de caspasa-8 y FADD se detectaron mediante western blot.

fueron reclutados en el DISC en las MDA-MB-231 tratadas solo con TRAIL o en aquellas pre-tratadas con roscovitina.

2.4-El tratamiento con roscovitina reduce los niveles de cFLIPL y cFLIPS a nivel de ARNm y de proteína .

Aunque el papel inhibitorio de FLIP es un tema todavía controvertido (Boatright, Deis et al. 2004; Peter 2004), varios estudios sugieren que la bajada de los niveles de FLIP sensibiliza a las células a la apoptosis por receptores de muerte (Yeh, Itie et al. 2000; Krueger, Schmitz et al. 2001; Chawla-Sarkar, Bae et al. 2004; Ricci, Jin et al. 2004; Rippon, Moretti et al. 2004; Watanabe, Okamoto et al. 2005). Se investigaron entonces, cambios en los niveles de proteínas de cFLIP_L y cFLIP_S en células MDA-MB-231 tratadas con roscovitina. Como muestra la figura 2.4A (panel izquierdo), tras el tratamiento con roscovitina, se produjo un descenso en los niveles de las proteínas cFLIP_L y de cFLIP_S. El descenso era mayor a las 8h de tratamiento, y tras 24h los niveles de FLIP se recuperaban de nuevo. Con el tratamiento con CHX, los niveles de FLIP_L y FLIP_S bajaban a las 8h, sin embargo, no se producía una recuperación de los mismos a las 24h (Fig. 2.4A panel derecho) como es esperable de un inhibidor de la síntesis de proteínas celulares.

Algunos estudios muestran que las mayores bajadas de proteína de c-FLIP parecen ocurrir a nivel post-traducciona (Kim, Suh et al. 2002). Puesto que se ha descrito que cFLIP puede ser degradado, en algunas células, por el proteasoma (Fukazawa, Fujiwara et al. 2001), se trató de ver si la reducción de los niveles de FLIP observada tras el tratamiento con roscovitina era debido a un aumento en la degradación de FLIP por el proteasoma. Para evaluar esta posibilidad, se hicieron una serie de estudios con el inhibidor del proteasoma MG132. La inhibición de la maquinaria proteasómica por MG132, provocaba un aumento de los niveles celulares de cFLIP_L y cFLIP_S (Fig. 2.4B). Sin embargo, el tratamiento conjunto de roscovitina y MG132 produjo un descenso de los niveles de proteínas de cFLIP_L y cFLIP_S en comparación con las células tratadas solo con MG132 (Fig. 2.4B), a pesar de que la expresión de cFLIP_L y cFLIP_S era mayor que en células no tratadas. Esto sugiere que la roscovitina debe regular los niveles de cFLIP en alguna etapa anterior a su degradación por el proteasoma.

Estos resultados sugieren que roscovitina podría estar actuando reduciendo los niveles de cFLIP_L y cFLIP_S a nivel de ARNm. Para confirmar esta posibilidad, se realizaron experimentos de RT-PCR. Como se muestra en la figura 2.5, roscovitina reduce eficientemente los niveles de ARNm endógenos de cFLIPL y cFLIPS. La mayor bajada en los niveles de ARNm se producen a las 8h de tratamiento, lo cual correlaciona bien con la reducción observada a nivel de proteína (Fig. 2.4A). Estos resultados muestran que el tratamiento con roscovitina bajan los niveles de cFLIP a nivel de ARNm.

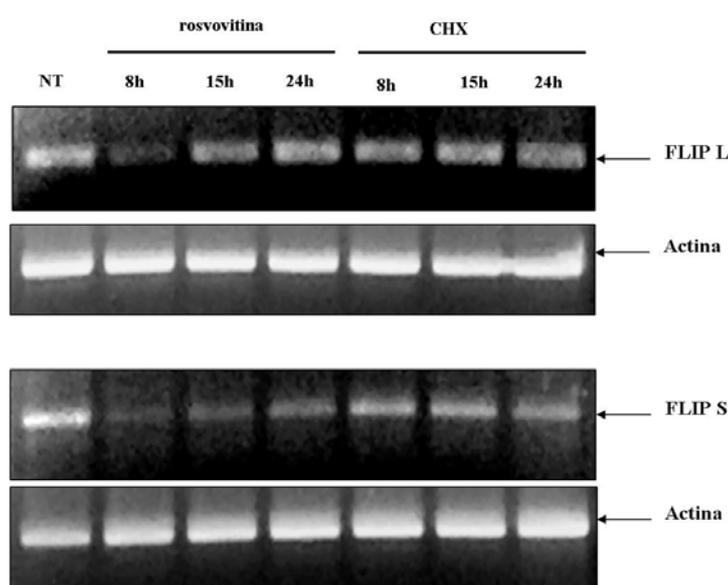


Figura 2.5. El tratamiento con roscovitona reduce los niveles de FLIP a nivel del ARNm.

Células MDA-MB-231 se trataron con roscovitina (20 μ M) durante los tiempos indicados. Tras el tratamiento, el AN total se aisló, y los ARNm de FLIPL y FLIPS se analizaron mediante RT-PCR tal y como se describe en materiales y métodos. Los productos de PCR de la β -actina se utilizaron como control de carga de ARN.

Por otra parte, es interesante el hecho de que MG132 aumente los niveles de la proteína anti-apoptótica cFLIP y, sin embargo, el tratamiento con esta droga, sensibiliza a la apoptosis inducida por TRAIL en las células MDA-MB-231 (Fig. 2.4C). Más aun, MG132 es capaz por si solo de inducir apoptosis en esta línea

celular (Fig. 2.4C). Este efecto de MG132 en la sensibilización a la muerte por TRAIL, a pesar del aumento de proteínas anti-apoptóticas como FLIP_L y FLIP_S, podría ser explicado teniendo en cuenta que hay estudios, en varios tipos celulares, que demuestran que la inhibición del proteasoma provoca una interferencia en la activación de NF κ B (Karin and Ben-Neriah 2000; Jesenberger and Jentsch 2002), la cual podría sensibilizar a la apoptosis inducida por TRAIL. También se ha descrito que otras proteínas pro-apoptóticas como por ejemplo TRAIL-R2 (He, Huang et al. 2004) o BAX (Chen and Lin 2004) son reguladas post-traduccionalmente a nivel del proteasoma. Para verificar la posibilidad de que otras proteínas pro-apoptóticas pudieran estar aumentadas tras el tratamiento con MG132, analizamos la expresión de caspasa-8 y

FADD en células MDA-MB-231 tras el tratamiento con el inhibidor del proteasoma. Como muestra la figura 4D, el tratamiento con MG132 también aumenta los niveles de proteína de caspasa-8 y FADD.

Todos juntos, estos resultados muestran como el tratamiento con roscovitina es capaz de sensibilizar a la muerte inducida por TRAIL afectando a eventos tempranos en la señalización de la apoptosis, como son la formación del DISC o la reducción de los niveles de cFLIP.

3.-Agentes que afectan a los microtúbulos sensibilizan a la apoptosis inducida por TRAIL en células tumorales de mama

3.1-La parada del ciclo en G2/M por diferentes drogas provoca una sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL.

Como se ha mostrado anteriormente, la droga roscovitina sensibiliza a la muerte por TRAIL en diferentes líneas tumorales de mama. Además, roscovitina produce una parada evidente del ciclo celular en la fase G2/M. Cabría pensar que dicha parada en G2/M fuera la responsable de la sensibilización producida por la roscovitina. Para tratar de despejar esta duda, se utilizaron otras drogas que también producen una parada del ciclo en G2/M, y se estudió si estas drogas provocaban una sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL. Como se muestra en la figura 3.1A, el tratamiento con nocodazol (Nz) o taxol (Tx), agentes ambos que afectan, mediante mecanismos distintos, a la dinámica de los microtúbulos, o bien el tratamiento con doxorubicina (DXR), droga que daña al ADN, provocaban una parada en G2/M y además sensibilizaban a las células MDA-MB-231 a la apoptosis inducida por TRAIL. Asimismo, cuanto mayor era la parada del ciclo producida con estas drogas, mayor era la sensibilización a la muerte por TRAIL (Fig. 1A). Sin embargo, la parada en G2/M producida por roscovitina era menor que la producida por ejemplo, por nocodazol y a pesar de ello, la sensibilización a TRAIL era mayor con el pre-tratamiento con roscovitina (Fig. 3.1B). Por otra parte, nocodazol y taxol no sensibilizaron a la muerte por TRAIL a todas las líneas tumorales de mama testadas, a pesar de que en todas provocaba una parada en G2/M (Fig. 3.1 C y 3.1D).

3.2-El tratamiento con nocodazol o taxol reduce los niveles celulares de la proteína cFLIP en células MDA-MB-231.

La roscovitina produce una bajada de los niveles de proteína de FLIP_L y FLIP_S, siendo ésta una de las posibles causas de la sensibilización a TRAIL. Taxol y nocodazol son capaces, al igual que la roscovitina, de parar el ciclo celular en G2/M y sensibilizar

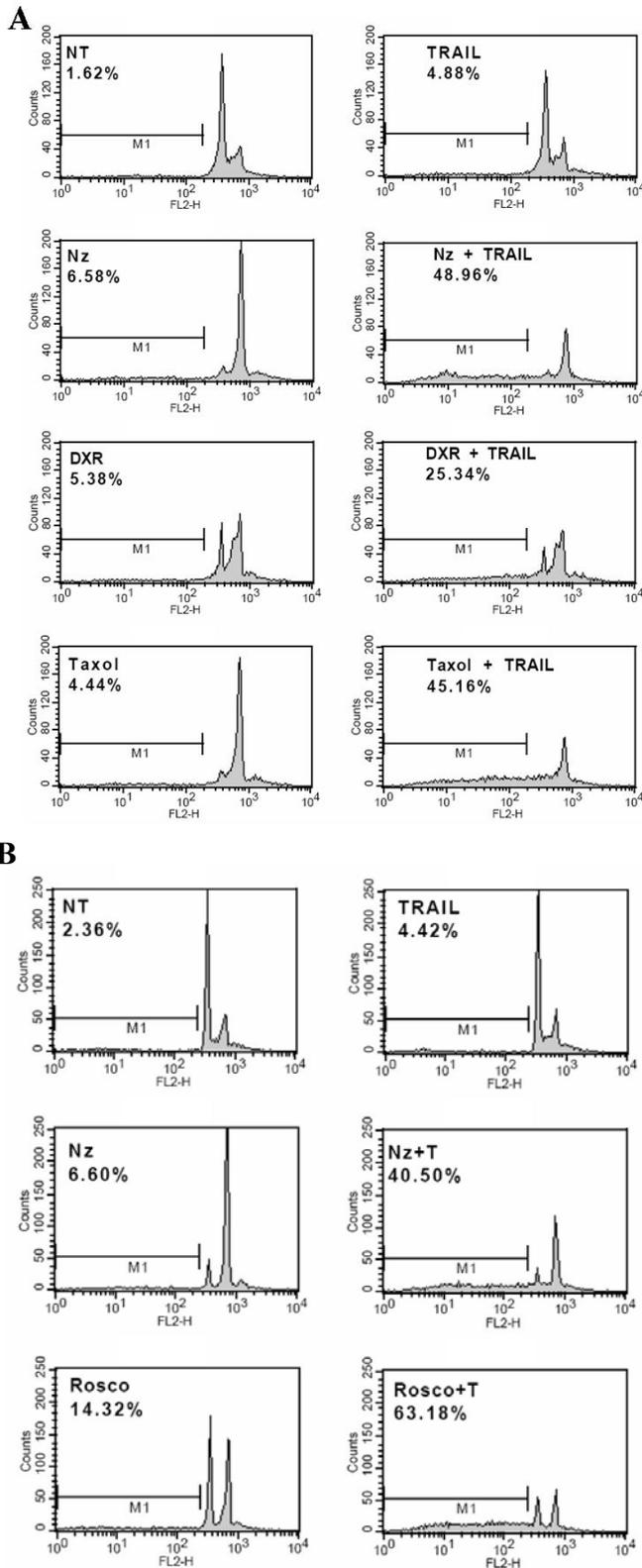


Figura 3.1. El tratamiento con nocodazol y taxol produce una parada del ciclo celular en G2/M y sensibiliza a la muerte por TRAIL.

(a) Células MDA-MB-231 se trataron con nocodazol(0,4µg/ml), doxorubicina (500ng/ml) o taxol (10µM) durante 12h antes de añadir TRAIL (500ng/ml) durante 5h más. La apoptosis se determinó mediante el análisis de subG1 por citometría de flujo. El marcador M1 muestra el porcentaje de células en subG1 (apoptóticas) (b) Células MDA-MB-231 se trataron con nocodazol (0,4µg/ml) o roscovitina (20µM) 7h antes de añadir TRAIL (500ng/ml) durante 15h más. La apoptosis se determinó mediante el análisis de la fracción subG1 por citometría de flujo.

a las células MDA-MB-231 a la apoptosis inducida por TRAIL, por lo que podría ser, que el mecanismo por el cual estas drogas sensibilizan a la apoptosis por ligandos de muerte fuera similar al de roscovitina. Por ello, se determinaron los niveles de proteína de FLIP_L y FLIP_S. Tanto nocodazol (Fig. 3.2A) como taxol (Fig. 3.2B) bajan los niveles celulares de las proteínas anti-apoptóticas cFLIP_L y cFLIP_S. Por otra parte, se ha descrito que la

vida media como proteína de FLIP depende de la fase del ciclo celular (Algeciras-Schimmich, Griffith et al. 1999). Se trató de comprobar si en nuestro modelo existía también alguna relación entre los niveles de proteínas de FLIP y la fase del ciclo celular donde se encontraba la célula. El tratamiento con nocodazol provoca un mayor acúmulo

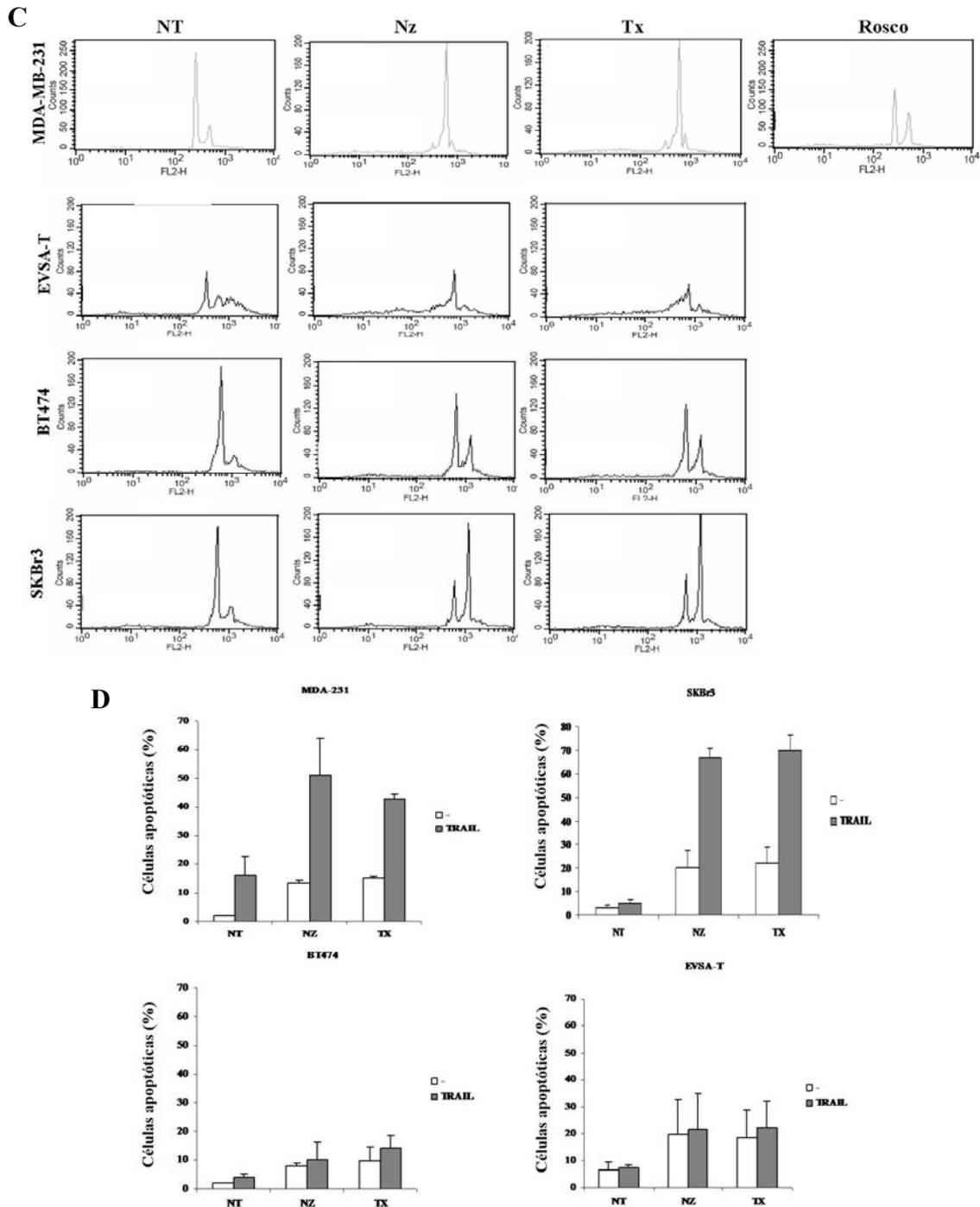


Figura 3.1. El tratamiento con nocodazol y taxol produce una parada del ciclo celular en G2/M y sensibiliza a la muerte por TRAIL.

(c) Diferentes líneas tumorales de mama tratadas con nocodazol ($0,4\mu\text{g/ml}$), taxol ($10\mu\text{M}$) o roscovitina ($20\mu\text{M}$) 24h. Se analizó el ciclo celular por citometría de flujo (d) MDA-MB-231, EVSA-T y BT474 se trataron con nocodazol ($0,4\mu\text{g/ml}$) o taxol ($10\mu\text{M}$) durante 7h o 32h para SKBr-3. Posteriormente se añadió TRAIL (500ng/ml) durante 15h más. La apoptosis se determinó de igual manera que en 3.1(b).

de células en G2/M comparado con el tratamiento con roscovitina (Fig. 3.2C), sin embargo, roscovitina provoca un descenso mayor en los niveles de proteína cFLIP_L y cFLIP_S (Fig. 3.2D).

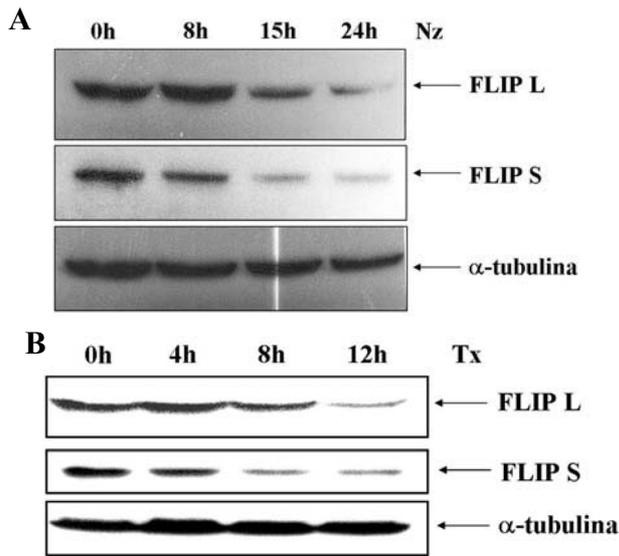
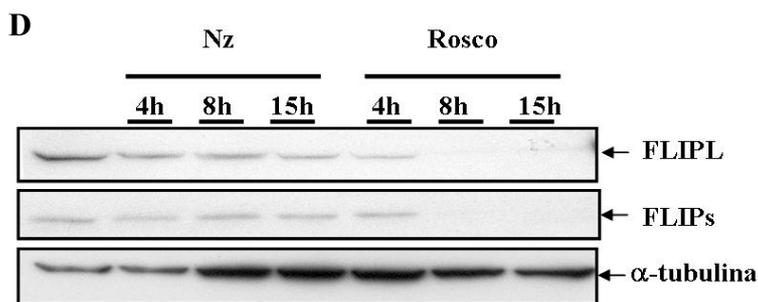
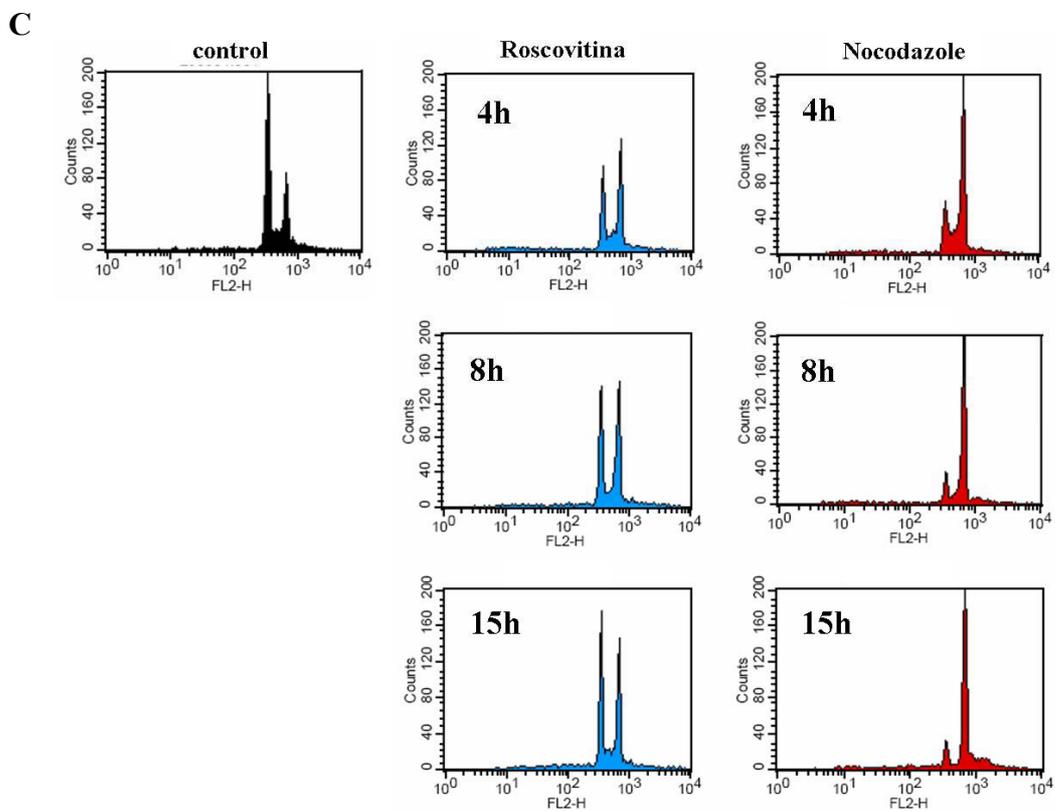


Figura 3.2. Nocodazol y taxol disminuyen los niveles de proteína de cFLIP.

Células MDA-MB-231 se trataron con nocodazol (0,4 μ g/ml) (a) o taxol (10 μ M) (b) durante los tiempos indicados. Los niveles de proteína FLIPL y FLIPS se determinaron mediante western blot utilizando un anticuerpo anti-FLIP como se describe en materiales y métodos. (c) y (d) se trataron las células con roscovitina (20 μ M) o nocodazol (0,4 μ g/ml) durante los tiempos indicados. En paralelo se determinaron los niveles de proteína de FLIP de igual manera que en (a) y (b) y se analizó la parada del ciclo celular en G2/M mediante citometría de flujo.



3.3-La falta de adhesión de las células al sustrato no las sensibiliza a la apoptosis inducida por TRAIL.

Se observó que el tratamiento con nocodazol y taxol, y también roscovitina, aunque en menor medida, provocaba que las células adherentes se despegaran del sustrato. Se ha descrito que la adhesión a la matriz extracelular protege a las células de la apoptosis inducida por receptores de muerte, y que el despegamiento de la matriz resulta en una mayor susceptibilidad a la muerte inducida por Fas (Algeciras-Schimmich, Griffith et al. 1999). Se estudió, por tanto, si la pérdida de adhesión de las células MDA-MB-231 tras el tratamiento con nocodazol o taxol era causa suficiente

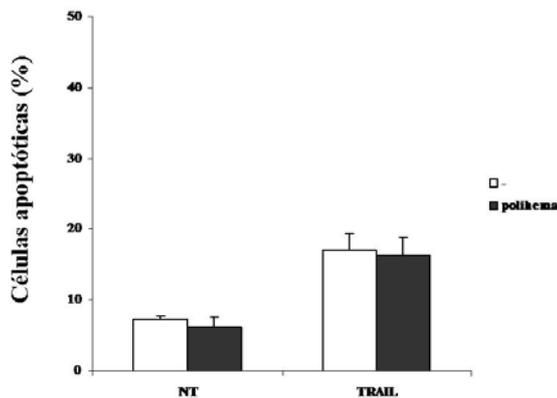


Figura 3.3. La falta de adhesión de las células no sensibiliza a la muerte por TRAIL.

Células MDA-MB-231 se sembraron en placas tratadas o no con poly-hema. Tras 24h, se trataron 15h con TRAIL (500ng/ml). La apoptosis se determinó cuantificando las células hipodiploides mediante el análisis del ciclo celular por citometría de flujo (análisis de subG1).

para sensibilizarlas a la muerte por TRAIL. Para ello se sembraron células en placas que habían sido previamente tratadas con poly-Hema para evitar que las células se adhirieran a la superficie de la placa. Posteriormente se trataron con TRAIL durante 15h. La figura 3.3 muestra que las células no adheridas no se hacen susceptibles a la apoptosis mediada por TRAIL.

3.4-El tratamiento de células MDA-MB-231 con nocodazol o taxol aumenta la activación de la caspasa-8, liberación de citocromo-c, y la translocación de BAX a la mitocondria disparada por TRAIL.

Para tratar de dilucidar cuál podría ser el mecanismo mediante el cual taxol y nocodazol sensibilizan a la muerte por TRAIL en células de cáncer de mama, se estudiaron eventos iniciales en la señalización de la apoptosis por TRAIL. Primero se estudió el procesamiento y activación de la caspasa-8 mediante western blot. Como se

muestra en la figura 3.4A y 3.4B, la activación de la caspasa-8 inducida por TRAIL era mayor cuando las células eran previamente tratadas con nocodazol o con taxol.

También se estudiaron eventos posteriores al procesamiento y activación de la caspasa-8. Se observó una pérdida de la forma completa de la proteína BID, la cual se procesa por caspasa-8 tras el estímulo apoptótico (Fig 3.4C). Además, la liberación de

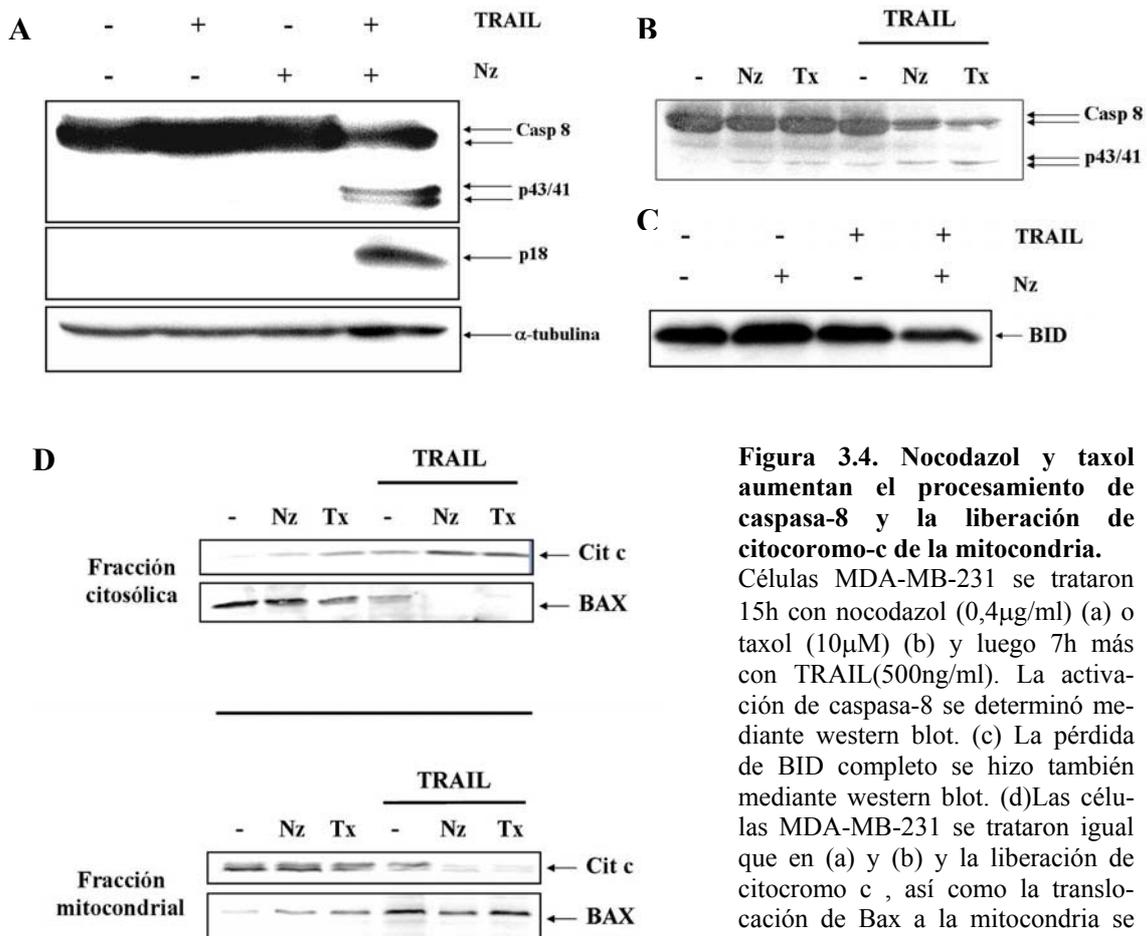


Figura 3.4. Nocodazol y taxol aumentan el procesamiento de caspasa-8 y la liberación de citocromo-c de la mitocondria.

Células MDA-MB-231 se trataron 15h con nocodazol (0,4µg/ml) (a) o taxol (10µM) (b) y luego 7h más con TRAIL(500ng/ml). La activación de caspasa-8 se determinó mediante western blot. (c) La pérdida de BID completo se hizo también mediante western blot. (d) Las células MDA-MB-231 se trataron igual que en (a) y (b) y la liberación de citocromo c , así como la translocación de Bax a la mitocondria se realizó haciendo un fraccionamiento celular y posteriormente western-blot.

citocromo-c de la mitocondria al citosol, así como la translocación de Bax a la mitocondria provocadas por TRAIL, son dos procesos que se vieron aumentados tras el pre-tratamiento de las células con nocodazol o taxol (Fig. 3.4D)

3.5-Nocodazol o taxol no afectan a la expresión de los receptores pro-apoptóticos ni a la formación del DISC de TRAIL en la superficie celular.

Se estudió si la mayor activación de caspasa-8 observada era debida a un aumento de los receptores pro-apoptóticos TRAIL-R1 o R2, o a un descenso de los anti-apoptóticos TRAIL-R3 o R4. Se examinó, mediante citometría de flujo, la expresión en la superficie celular de estos receptores tras el tratamiento con ambas drogas. Como muestra la figura 3.4C, el tratamiento con nocodazol no afecta a la expresión de ninguno de los receptores de TRAIL. Taxol provoca una bajada en la expresión del receptor anti-apoptótico TRAIL-R4, sin afectar a ningún otro (Fig. 3.5A). Se examinó también la formación del DISC de TRAIL utilizando un TRAIL biotinilado recombinante (TRAIL-b), tal como se describió anteriormente en materiales y métodos. El DISC de TRAIL fue precipitado a partir de los lisados celulares (tras normalizar la carga de proteínas) de células controles o tratadas con nocodazol (Fig. 3.5B) o taxol (Fig. 3.5C), utilizando para ello, resina de estreptavidina-agarosa tras tratar con TRAIL-b durante los tiempos indicados. Al contrario de lo observado con roscovitina, ninguno de los tratamientos provocó cambios claros en el reclutamiento de FADD o caspasa-8 en el DISC (Fig. 3.5B y 3.5C).

Para tratar de dilucidar mejor el mecanismo por el cual nocodazol o taxol sensibilizan a la muerte inducida por TRAIL en la línea celular MDA-MB-231, se

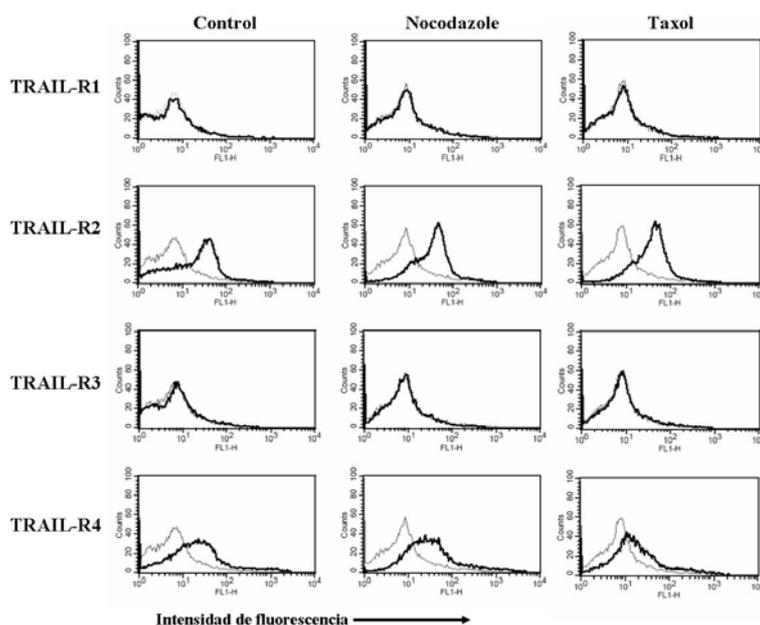


Figura 3.5. Los tratamientos con nocodazol o taxol no afectan a los receptores de TRAIL ni a la formación del DISC.

(a) La expresión de los receptores de TRAIL en células MDA-MB-231 tras el tratamiento con nocodazol (0,4 μ g/ml) o taxol (10 μ M) se determinaron mediante citometría de flujo con anticuerpos primarios contra los receptores TRAIL-R1, R2, R3 y R4 (línea continua) o con un anticuerpo irrelevante (líneas punteadas).

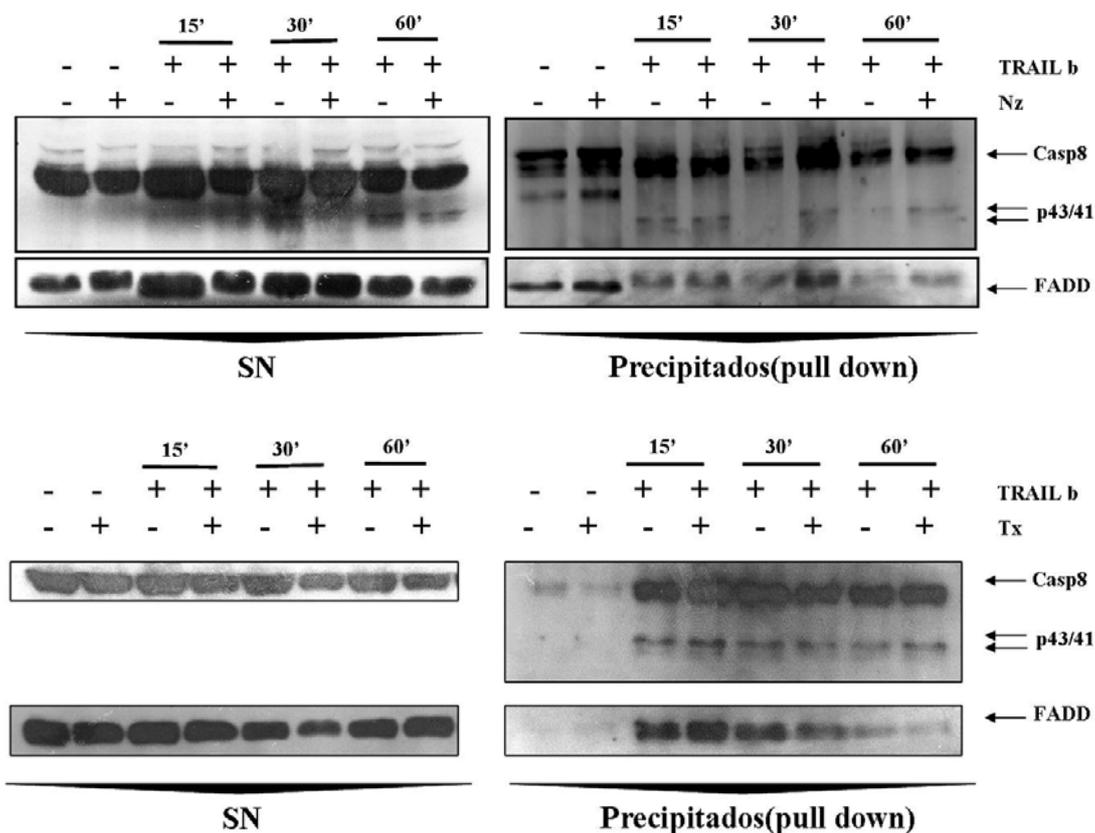


Figura 3.5. Los tratamientos con nocodazol o taxol no afectan a los receptores de TRAIL ni a la formación del DISC.

(b) y (c) Células MDA-MB-231 se incubaron durante 15h con nocodazol (0,4 μ g/ml) (b) o taxol (10 μ M) (c) y posteriormente se trataron con TRAIL-b (biotinilado) (1 μ g/ml) durante 15, 30 y 60min. Los complejos del receptor de TRAIL se precipitaron con bolitas de agarosa estreptavidina y se analizaron por western-blot para detectar los componentes del DISC, FADD y caspasa-8. Los lisados aislados de células control no estimuladas se incluyeron como control de carga de todas estas proteínas (SN).

estudió si el tratamiento con estas drogas producían algún cambio en los niveles de proteínas implicadas en la cascada apoptótica. Se examinó, mediante western blot, las proteínas caspasa-8 y FADD (Fig. 3.6A) como proteínas más apicales en la señalización, y también proteínas de la vía mitocondrial como Bax, Bcl-2 y Bad (Fig. 3.6B). También se estudiaron los niveles de la proteína inhibidora de caspasas XIAP (Fig. 3.6B). En ningún caso se observó variación alguna en los niveles de las proteínas mencionadas tras el tratamiento con nocodazol o taxol.

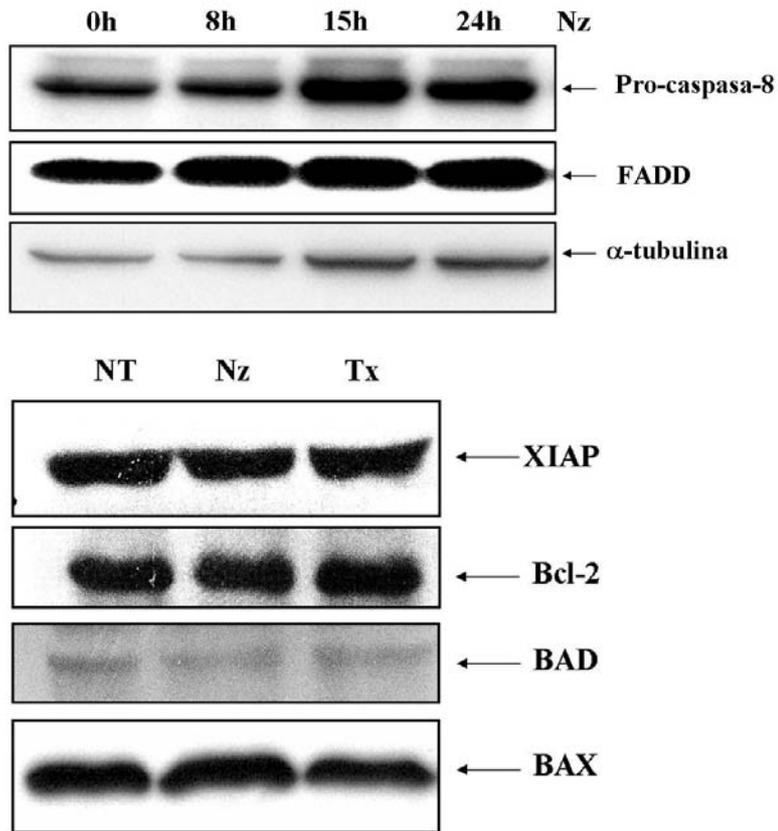


Figura 6. Niveles de proteínas implicadas en la apoptosis tras los tratamientos con agentes que alteran la dinámica de los microtúbulos.

Células MDA-MB-231 tratadas con nocodazol (0,4 μ g/ml) o taxol (10 μ M) durante 15h (a) o durante los tiempos indicados (b), se procesaron para detectar proteínas mediante western blot.

VIII. DISCUSIÓN

Los receptores de muerte son expresados en muchos tipos de células tumorales que pueden sufrir apoptosis tras la unión con el ligando apropiado (Ashkenazi and Dixit 1998). Estos resultados ofrecen la posibilidad de usar ligandos de muerte como agentes anti-tumorales. Sin embargo, se han observado diversos efectos tóxicos al utilizar TNF α (Tartaglia and Goeddel 1992) o anticuerpos anti CD95 (Ogasawara, Watanabe-Fukunaga et al. 1993) en tratamientos antitumorales sistémicos. TRAIL es un potente inductor de apoptosis en células tumorales tras la unión a sus respectivos receptores de muerte (receptores pro-apoptóticos), aunque determinadas preparaciones de TRAIL pueden inducir muerte celular en hepatocitos humanos en cultivo (Jo, Kim et al. 2000). Sin embargo, TRAIL no presenta toxicidad sistémica en estudios pre-clínicos con primates no-humanos y ratones cuando se administra a dosis que inhiben el crecimiento de xenoinjertos humanos de cáncer de mama y colon (Ashkenazi, Pai et al. 1999; Walczak, Miller et al. 1999). Además, el aumento de la expresión de TRAIL mediante interferón gamma es al menos parcialmente responsable de la función anti-metastásica de células NK frente a células tumorales sensibles a TRAIL (Takeda, Smyth et al. 2001). Más aún, anticuerpos agonistas que se unen a los receptores pro-apoptóticos de TRAIL están actualmente siendo evaluados en ensayos clínicos como agentes anti-tumorales (Reed 2003). Estos resultados *in vivo* coinciden con los datos obtenidos *in vitro* indicando que TRAIL no es citotóxico frente a una gran variedad de células normales en cultivo (Walczak, Miller et al. 1999).

A pesar del potencial de TRAIL como agente terapéutico contra el cáncer, se conoce muy poco acerca del mecanismo que regula la sensibilidad de las células tumorales a la apoptosis inducida por TRAIL. La expresión de los receptores señuelo de TRAIL se ha sugerido que contribuye a la resistencia a TRAIL (Pan, Ni et al. 1997; Sheridan, Marsters et al. 1997). Sin embargo, las evidencias para esta propuesta se han basado fundamentalmente en estudios de sobreexpresión (Sheridan, Marsters et al. 1997). Hasta el momento no hay una correlación clara entre la expresión de estos receptores y la sensibilidad a la apoptosis inducida por TRAIL en diferentes líneas tumorales (Griffith and Lynch 1998). Por otra parte, la expresión de los receptores pro-apoptóticos de TRAIL está controlada por una gran variedad de señales y podría determinar la sensibilidad a TRAIL de células tumorales (Sheikh, Burns et al. 1998). No obstante, existen evidencias que indican que en la mayoría de los casos la regulación de la sensibilidad de las células tumorales a TRAIL recae en mediadores intracelulares. A pesar de el hecho de que muchas células tumorales son resistentes a la apoptosis

inducida por TRAIL, una parte de ellas y en particular las líneas tumorales de mama, son resistentes a estos ligandos de muerte (Keane, Ettenberg et al. 1999), aunque la mayoría de ellas se puede sensibilizar a TRAIL mediante el tratamiento con inhibidores de la síntesis de proteínas (resultados mostrados en esta tesis).

La ruta de MAPK/Erk inhibe la apoptosis inducida por TRAIL.

La actividad y la expresión de las MAPK está significativamente aumentada en carcinomas de mama (Sivaraman, Wang et al. 1997; Xing and Imagawa 1999). Aunque se ha descrito que ERK aumenta los niveles de Bcl-2 (Boucher, Morisset et al. 2000) y que la vía de las MAPK podría antagonizar la apoptosis inducida por receptores de muerte mediante la inducción de cFLIP (Yeh, Hsu et al. 1998), los resultados mostrados en esta tesis indican que el efecto antagonista de un activador de PKC no requiere la síntesis de nuevas proteínas.

Varios autores han mostrado que la vía de MAPK protege a nivel de la mitocondria de la apoptosis inducida por diferentes estímulos (Scheid, Schubert et al. 1999; Boucher, Morisset et al. 2000; Shonai, Adachi et al. 2002). Los resultados mostrados aquí indican que PDBu no pudo proteger a células MCF-7 que sobreexpresan caspasa-3 (célula que pasa de tipo I a II al sobreexpresar esta proteína) respaldando más aún la idea de que las MAPK inhiben la apoptosis inducida por TRAIL a nivel de la mitocondria.

Ha sido descrito en nuestro laboratorio que en células tumorales de mama, la activación de la vía de MAPK/Erk inhibía la apoptosis inducida por TRAIL después del corte de BID (Sarker, Ruiz-Ruiz et al. 2002). En otros artículos se ha sugerido que en células HeLa y células T Jurkat la inhibición provocada por la vía de MAPK de la apoptosis inducida por TRAIL ocurre por la modulación de eventos apicales (Sarker, Ruiz-Ruiz et al. 2001; Meng, Heldebrant et al. 2002; Soderstrom, Poukkula et al. 2002; Harper, Hughes et al. 2003). Por el contrario, en líneas tumorales de melanoma y cáncer de mama la señalización a través de la ruta de MAPK/Erk inhibe la translocación de Bax del citosol a la mitocondria previniendo así la liberación de factores apoptogénicos de este orgánulo (Zhang, Borrow et al. 2003). Se ha sugerido que la relocalización de Bax desde el citosol a la mitocondria es un suceso clave en la inducción de la apoptosis por TRAIL (Burns and El-Deiry 2001; Deng, Kornblau et al. 2001). Por otra parte, drogas genotóxicas, como es la doxorubicina, inducen apoptosis a través de la ruta mitocondrial de manera dependiente de Bax/Bak pero sin la intervención de Bid. Sin

embargo, se demuestra en esta tesis que PDBu no es capaz de bloquear la muerte inducida por doxorubicina, sugiriendo que las MAPK están actuando en otro paso diferente al de la translocación de Bax a la mitocondria. En esta tesis se ha identificado la localización mitocondrial como la diana de la inhibición de la apoptosis por MAPK en células de cáncer de mama MCF-7. En estos experimentos se ha demostrado que el corte de Bid inducido por TRAIL o TNF α no se veía afectado por la activación de PKC. Más aún, aunque no se puede excluir la posibilidad de que la translocación del citosol a la mitocondria del tBid generado por caspasa-8 esté también afectado, los datos aquí presentados indican que la localización mitocondrial de tBid se podía revertir mediante la activación de MAPK mediada por PKC. De qué manera ocurre esto es algo desconocido por el momento. Existen varios posibles mecanismos. Primero, miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 son responsables de la protección de la liberación de citocromo-c y Smac/DIABLO de la mitocondria tras un insulto apoptótico probablemente por su unión al dominio BH3 de los miembros pro-apoptóticos “solo BH3”, tales como Bid, Bim o Noxa (O'Connor 1998; Korsmeyer, Wei et al. 2000; Oda, Ohki et al. 2000; Cheng, Wei et al. 2001; Ruiz de Almodovar, Ruiz-Ruiz et al. 2001; Puthalakath and Strasser 2002). Por otra parte, varios autores han demostrado que la activación de la vía de MAPK podría regular proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2. Por ejemplo, la inhibición de Erk1/2 provoca la bajada en la expresión de los homólogos anti-apoptóticos Mcl-1, Bcl-2 y Bcl-xL (Boucher, Morisset et al. 2000; Zhang, Borrow et al. 2003). No obstante, los resultados aquí mostrados con la construcción GFP-ttBid sugiere que la regulación de la localización de tBid por medio de proteínas anti-apoptóticas no parece ser el mecanismo por el cual las MAPK inhiben la apoptosis inducida por TRAIL, dado que dicha quimera carece del dominio BH3 necesario para su interacción con otras proteínas Bcl-2. Por otra parte, se ha descrito que la miristilación de tBid modula su translocación a la mitocondria (Zha, Weiler et al. 2000), sin embargo, los datos presentados en esta tesis sugieren que una posible alteración de esta modificación por MAPK no es responsable de la diferente localización de tBid, debido a que esta construcción, GFP-ttBid, carece de la secuencia específica de miristilación y aún así sufre, tras la activación de MAPK, un cambio en la localización igual que la construcción GFP-tBid con el dominio BH3 intacto.

Bid puede ser fosforilado por las casein-quinasa I y II dando lugar a resistencia en el corte por caspasa-8 (Desagher, Osen-Sand et al. 2001), sin embargo, no ha sido descrito nunca ninguna fosforilación de tBid y además, Bid no parece que contenga

ninguna secuencia consenso para quinasas como ERK1/2 o Akt. Por otra parte, Bid cortado por caspasa-8 (tBid) podría ser rápidamente degradado por el proteasoma (Breitschopf, Zeiher et al. 2000). A este respecto, es interesante que Bim(EL), otra proteína “solo BH3”, es fosforilada tras la activación de la vía ERK1/2 y esto conduce a la degradación de BimEL por la vía del proteasoma (Ley, Balmanno et al. 2003). El tratamiento con activadores de MAPK parece afectar levemente a la expresión de la proteína tBid (Fig. 1.2), sin embargo, en los análisis de microscopía confocal con las quimeras GFP-tBID (Fig. 1.6A) no parece que PDBu afecte a la estabilidad de GFP-tBid, aunque en este caso la proteína verde fluorescente podría afectar a la posible modificación de tBid. Con todo, el que la estabilidad de tBid pudiera ser alterada indirectamente mediante la activación de MAPK es algo que queda por dilucidar.

Los resultados mostrados aquí con células permeabilizadas podrían sugerir un mecanismo diferente que explicara la inhibición mediada por MAPK de la localización mitocondrial de tBid. En dichos experimentos, las células fueron pre-tratadas con un activador de PKC antes de incubarlas con tBid recombinante por un periodo corto de tiempo. Bajo estas condiciones la liberación de citocromo-c estaba inhibida. Estas observaciones podrían indicar que la activación de MAPK en lugar de regular la modificación post-traducciona de tBid (Zha, Weiler et al. 2000), podría funcionar manteniendo la integridad mitocondrial tal como se ha descrito recientemente para Akt (Majewski, Nogueira et al. 2004), mediante la inducción de la asociación de la hexoquinasa a la mitocondria. Esta asociación previene el efecto pro-apoptótico de ciertos miembros de la familia de Bcl-2 evitando su localización mitocondrial (Pastorino, Shulga et al. 2002). No sería de extrañar un que Erk1/2 pudiera provocar un efecto parecido al de Akt, de hecho muchos trabajos muestran que Akt y Erk pueden tener las mismas dianas. Nuevos estudios serían necesarios para poder verificar esta hipótesis.

Roscovitina sensibiliza a la apoptosis inducida por TRAIL en células tumorales de mama.

El uso de TRAIL para inducir apoptosis en células tumorales es un concepto muy atractivo para el tratamiento del cáncer. TRAIL parece ser relativamente seguro para su uso clínico. Sin embargo, la mayor parte de los carcinomas de mama, próstata, ovario y pulmón, así como células de mieloma múltiple y leucemia son resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL. Afortunadamente, es posible sensibilizar a TRAIL

dichas células resistentes mediante diferentes tratamientos, entre ellos el pre-tratamiento con inhibidores de CDKs, como la roscovitina.

La roscovitina es capaz de inducir apoptosis en diferentes células tumorales así como provocar la regresión de tumores humanos injertados en ratones (McClue, Blake et al. 2002). Además, el tratamiento con inhibidores de CDKs como flavopiridol o roscovitina, sensibiliza a la apoptosis inducida por diferentes agentes antitumorales (Edamatsu, Gau et al. 2000; Dai, Rahmani et al. 2003; Grant and Roberts 2003). Sin embargo, al contrario que flavopiridol, roscovitina parece no ser tóxica para células normales a las concentraciones que induce apoptosis en células tumorales, aunque más estudios son necesarios para resolver esta duda. Por tanto, el uso de roscovitina como agente quimioterapéutico contra el cáncer resulta bastante atractivo. En esta tesis se ha demostrado que el tratamiento con roscovitina sensibiliza a la apoptosis inducida por TRAIL, en todas las líneas tumorales de mama estudiadas.

Varias de las líneas tumorales de mama testadas (BT272, SKBr-3, EVSA-T, o MDA-MB231) son muy resistentes a la apoptosis inducida por TRAIL. A pesar de que se ha descrito que los niveles de expresión de los receptores pro y anti-apoptóticos no correlaciona bien con la sensibilidad de diferentes líneas tumorales a TRAIL (Shankar and Srivastava 2004), la falta de los receptores pro-apoptóticos de TRAIL, así como el aumento de los receptores anti-apoptóticos podría ser la causa de la falta de respuesta apoptótica en las líneas tumorales resistentes. Sin embargo, no parece que la falta de receptores pro-apoptóticos en superficie sea la causa de la resistencia a TRAIL, puesto que todas estas líneas tumorales son sensibilizadas tras el tratamiento con el inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida. Es decir, poseen los receptores pro-apoptóticos necesarios para transmitir la señal apoptótica. Además, cuando en una de estas líneas celulares resistentes, las MDA-MB-231, se determinó por citometría los niveles de receptores en membrana se observó que poseía receptores pro-apoptóticos (TRAIL-R2) y anti-apoptóticos (TRAIL-R4) aunque carecía de TRAIL-R1, y R3. Todo esto sugiere que estas líneas celulares no son resistentes a TRAIL porque carezcan de los receptores pro-apoptóticos y por ello sean incapaces de transmitir el impulso apoptótico. Por otra parte, el tratamiento con roscovitina tampoco afecta a la expresión en superficie de los diferentes receptores de TRAIL.

Se ha descrito que roscovitina es capaz de sensibilizar a la muerte inducida por TRAIL en células tumorales de glioma disminuyendo los niveles de survivina y XIAP, aunque la sobreexpresión de XIAP no bloquea totalmente la apoptosis inducida por

TRAIL y roscovitina (Kim, Kim et al. 2004). Estos datos sugieren que debe de haber algo más que contribuya a superar la resistencia a la apoptosis por TRAIL. La sensibilización realizada por roscovitina podría ocurrir en eventos pre-mitocondriales, puesto que, a pesar de que estos inhibidores de CDKs son capaces, aunque no siempre, de disminuir los niveles de la proteína Bcl-2, se ha descrito que la sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-xL no protege de la apoptosis inducida por flavopiridol o por roscovitina y TRAIL (Dai and Grant 2003; Kim, Kim et al. 2004). Los resultados mostrados en esta tesis también apoyan esta teoría, ya que, por ejemplo, el procesamiento de caspasa-8 por TRAIL, se ve aumentado tras el pre-tratamiento con roscovitina, sugiriendo que la sensibilización ocurre en eventos tempranos de la señalización por TRAIL. Estos eventos no son debidos sin embargo, un cambio en los niveles de receptores del ligando TRAIL, tal como muestra la figura 2.2B pero parece que pueden ser debidos a un aumento en la formación del DISC. Se ha mostrado en esta tesis que el pre-tratamiento con roscovitina facilita la formación del DISC, aumentando la agregación de FADD y caspasa-8 en el complejo inductor de señales de muerte, además de favorecer un procesamiento más rápido de caspasa-8 en las células tratadas con roscovitina. Otros autores han mostrado que diferentes agentes sensibilizan a la apoptosis inducida por TRAIL facilitando la formación del DISC (Inoue, MacFarlane et al. 2004; Ramaswamy, Efimova et al. 2004). De qué manera inhibidores de CDKs, como la roscovitina o el flavopiridol, son capaces de facilitar la formación del DISC es algo desconocido hasta el momento. Se ha descrito que la proteína IG20 (Insulinoma-glaucoma clone 20) interacciona con TRAIL-R1 y TRAIL-R2 a nivel del DISC y es capaz de aumentar el reclutamiento de FADD y caspasa-8 en el mismo sensibilizando a células Hela a la muerte por TRAIL (Ramaswamy, Efimova et al. 2004). Podría ocurrir que roscovitina afectara positivamente al reclutamiento de esta proteína en el DISC, por ejemplo, disminuyendo niveles de proteínas que afectaran negativamente la estabilidad de IG20, ya que roscovitina es capaz de impedir la transcripción mediante la inhibición de la ARN polimerasa II.

Por otra parte, se ha mostrado en esta tesis que roscovitina es capaz de bajar los niveles de FLIP. Es sabida la importancia de FLIP en la regulación de la apoptosis inducida por TRAIL. Su sobreexpresión es capaz de hacer resistentes a TRAIL a células tumorales (Rippo, Moretti et al. 2004; Zhang, Jin et al. 2004) y su inhibición provoca la sensibilización a TRAIL (Yeh, Itie et al. 2000; Siegmund, Hadwiger et al. 2002; Chawla-Sarkar, Bae et al. 2004; Ricci, Jin et al. 2004). Por tanto, la bajada de los

niveles de FLIPL y FLIPS provocada tras el tratamiento con roscovitina podría ser la causa de la sensibilización de estas líneas tumorales a TRAIL. Sin embargo, hay que señalar que en el DISC la reducción de estas proteínas no es tan clara como la observada en los extractos totales, aunque si se observa una ligera bajada. Es posible que esta ligerísima reducción de los niveles de FLIP en el DISC unida al aumento de caspasa-8 en el complejo sea suficiente para provocar la sensibilización de estas células a la muerte por TRAIL. De hecho, otros autores postulan que el ratio caspasa-8:FLIP en el DISC, más que los niveles de las proteínas en toda la célula, sería realmente lo importante en la sensibilización a TRAIL (Harper, Farrow et al. 2001; MacFarlane, Harper et al. 2002). Tal vez FLIP este regulando a caspasa-8 fuera del DISC y esto sea lo que realmente sensibiliza a la célula, ya que parece extraño que a pesar de la bajada tan pronunciada de los niveles totales de proteína FLIP, solo se vea una bajada leve a nivel del DISC. También se ha sugerido que FLIP podría estar estimulando NFκB independientemente de los receptores de muerte (Wajant 2004), por tanto es posible que la bajada pronunciada de los niveles de FLIP en toda la célula pueda estar afectando negativamente a NFκB, factor de transcripción cuya activación está generalmente involucrada en supervivencia celular.

Por otra parte, se sabe que FLIP es degradado por el proteasoma al menos en determinados tipos celulares (Fukazawa, Fujiwara et al. 2001), y los resultados en células MDA-MB-231 mostrados aquí así lo confirman. Sin embargo, el tratamiento con MG132, a pesar de provocar el aumento de proteínas anti-apoptóticas como FLIP_L y FLIP_S, sensibiliza a la apoptosis inducida por TRAIL, es decir, inhibiendo al proteasoma sensibilizamos a la apoptosis por TRAIL. De hecho, inhibidores del proteasoma como bortezomib (PS-341) actualmente están siendo evaluados en diversos ensayos clínicos como terapia contra el cáncer (Zelent, Petrie et al. 2005). El aumento de la sensibilidad a TRAIL por MG132 podría explicarse teniendo en cuenta que hay estudios, en varios tipos celulares, que demuestran que otras proteínas pro-apoptóticas como por ejemplo TRAIL-R2 (He, Huang et al. 2004) o Bax (Chen and Lin 2004) son también reguladas post-traduccionalmente a nivel del proteasoma. En esta tesis se muestra como los niveles de FADD y caspasa-8 aumentan tras el tratamiento con MG132, de manera que se podría contrarrestar el efecto del aumento de proteínas anti-apoptóticas con el aumento de proteínas pro-apoptóticas.

Además, se conoce que la inhibición del proteasoma provoca una interferencia en la activación de NF κ B, mediante la no degradación del inhibidor I κ B β (Karin and Ben-Neriah 2000; Jesenberger and Jentsch 2002). Se sabe que TRAIL es capaz de activar la ruta de NF κ B induciendo así supervivencia. Por tanto, el entorpecimiento de la ruta de NF κ B por medio de MG132, podría sensibilizar a la apoptosis inducida por TRAIL, bien inhibiendo la activación de NF κ B producida por TRAIL o la actividad basal de NF κ B. Las líneas tumorales estudiadas en esta tesis podrían ser resistentes a la apoptosis disparada por TRAIL debido a la activación de la ruta de NF κ B provocada por el mismo TRAIL.

Por otra parte, roscovitina, al igual que MG132, también sensibiliza a la apoptosis por TRAIL y también provoca una marcada reducción de los niveles de FLIP tanto a nivel de proteína como a nivel de ARNm, lo cual podría ser explicado si roscovitina afectara a la activación de NF κ B. No obstante, en esta tesis no se ha comprobado el efecto de la roscovitina sobre NF κ B, de hecho, se desconoce si roscovitina afecta a la ruta de NF κ B. Sería interesante realizar más estudios encaminados a resolver esta cuestión.

Es más probable, sin embargo, que la bajada que provoca la roscovitina en los niveles de ARN mensajero de cFLIPL y cFLIPS sea debido al efecto de esta droga sobre la transcripción : se ha descrito que roscovitina, así como flavopiridol son capaces de inhibir la ARN polimerasa II, probablemente inhibiendo la fosforilación de su extremo c-terminal mediante la inhibición del factor de elongación pTEFb (CDK9/ciclinaT) (Dai and Grant 2003). La bajada en los niveles de cFLIP también ha sido observada tras el tratamiento con flavopiridol, otro inhibidor de CDKs que también sensibiliza a la apoptosis inducida por TRAIL. La inhibición en la transcripción probablemente afecte a muchos otros genes, sobre todo a genes que codifican para proteínas con una vida media corta, como FLIP. Entre estos genes encontraríamos genes implicados en la proliferación, factores de transcripción, genes diana de NF κ B y genes anti-apoptóticos. En general se puede decir que los genes transcripcionalmente inducibles son, como clase, los que probablemente tengan ARN mensajeros más lábiles. La inducibilidad de muchos de estos genes es debida a la activación transcripcional de sus promotores. Por tanto, la rápida degradación de estos ARNm permite que sus niveles caigan rápidamente cuando la activación transcripcional ha terminado. Más de un tercio de los genes que regulan la apoptosis son inducibles y además tienen ARNm

con vida media muy baja (<2h). Se ha descrito que flavopiridol, un inhibidor de CDKs, es capaz de inducir apoptosis y de bajar los niveles de Bcl-2, Mcl-1, XIAP, BAG-1 y Bcl-xL (Lam, Pickeral et al. 2001; Dai and Grant 2003). Así mismo, roscovitina es capaz de reducir los niveles de survivina, XIAP, Mcl-1, y a veces también de Bcl-2 y aumenta los niveles de Bak en determinados tipos celulares (Hahntow, Schneller et al. 2004; Kim, Kim et al. 2004).

Por tanto, roscovitina, probablemente esté contribuyendo a la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL actuando en varias etapas de la señalización, por ejemplo, afectando, a parte de FLIP, a otros genes reguladores de la muerte celular, como XIAP o survivina (Kim, Kim et al. 2004), o aumentando la formación del DISC. El hecho de que roscovitina pueda estar actuando a varios niveles constituye una gran ventaja terapéutica. De hecho, a pesar de que los inhibidores de CDKs pueden bajar niveles de proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2, que actúan a nivel de la mitocondria, la sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-xL no protegen de la apoptosis inducida por flavopiridol o roscovitina más TRAIL, dando una gran ventaja terapéutica puesto que muchas líneas tumorales y tumores son resistentes a la apoptosis debido a una resistencia en la ruta mitocondrial.

Otra gran ventaja que tendría el uso combinado de TRAIL y roscovitina es que induce apoptosis en células tumorales de mama independientemente del estatus de p53 (ver tabla 1). Un alto porcentaje de tumores humanos tienen p53 mutado, lo cual provoca muchas veces el fracaso terapéutico. Por otra parte, la apoptosis por roscovitina y TRAIL es también independiente del estatus de receptores de estrógenos, lo cual lo convierte en una buena estrategia para cánceres de mama que se han hecho resistentes a la terapia hormonal. El tratamiento conjunto de roscovitina y TRAIL abre nuevas esperanzas en la terapia contra el cáncer.

	p53	Receptor de estrógenos
MDA-MB-231	mutado	-
MDA-MB-231 J.A.	mutado	-
MCF-7	normal	+
EVSA-T	mutado	-
MDA-MB-468	mutado	-
MDA-MB-435-S		-
SKBr-3	mutado	-
BT-474	mutado	+

AAMs sensibilizan a la apoptosis inducida por TRAIL en células tumorales de mama.

Roscovitina sensibiliza a la muerte por TRAIL en diferentes líneas tumorales de mama. Además, el tratamiento con roscovitina produce una parada evidente del ciclo celular en la fase G2/M. Para tratar de demostrar si esta parada es responsable de la sensibilización a TRAIL, las células MDA-MB-231 se trataron con diferentes agentes que provocan un arresto en G2/M como es nocodazol, taxol o doxorubicina. Estos agentes además de parar el ciclo en dicha fase, sensibilizan a la apoptosis inducida por TRAIL en las células MDA-MB-231. De hecho, el mayor acúmulo de células en G2/M que producen taxol y nocodazol, también producían una mayor sensibilización a TRAIL comparado con doxorubicina que producía menor arresto y menor sensibilización. Estos resultados sugerirían una mayor susceptibilidad a TRAIL en las células que se encuentran en fase G2/M. Por otra parte, roscovitina produce un menor arresto de células en G2/M comparado con nocodazol o taxol y sin embargo, sensibiliza más a la apoptosis inducida por TRAIL. Además, el pre-tratamiento con nocodazol o taxol no fue suficiente para sensibilizar a TRAIL a todas las líneas tumorales de mama testadas, a pesar de que sí producían una parada del ciclo en G2/M en todas ellas. Roscovitina, sin embargo, sensibilizó a todas las líneas tumorales. Conjuntamente estos resultados sugieren dos cosas, que la parada en G2/M no juega un papel tan crítico en la sensibilización producida por roscovitina, y que el mecanismo de sensibilización/acción de estos dos tipos de drogas es probablemente diferente.

Por otra parte, además de producir una parada del ciclo celular en G2/M, el tratamiento con taxol o nocodazol, al igual que roscovitina, también baja los niveles de proteína FLIP_L y FLIP_S. Se trató de ver si existía alguna correlación entre los niveles de proteína FLIP y la fase del ciclo en que estaban las células. Ya se ha descrito que en células T periféricas los niveles de FLIP varían con el ciclo celular (Algeciras-Schimnich, Griffith et al. 1999). Sin embargo, no parece existir una clara correlación entre la parada en G2/M y la reducción de los niveles de FLIP en la línea celular MDA-MB-231, por dos razones, a las 4h de tratamiento con nocodazol, ya existe un gran acúmulo de células en G2/M y sin embargo la bajada de los niveles de FLIP no es evidente hasta las 12-15h de tratamiento. Por otra parte, roscovitina produce menor parada en G2/M y sin embargo provoca una mayor reducción en los niveles de FLIP comparado con nocodazol, aunque es cierto que roscovitina podría estar afectando a los niveles de FLIP por otros mecanismos independientes de la parada en el ciclo celular.

Por otra parte, el hecho de que nocodazol o taxol reduzcan los niveles de FLIP y sin embargo no produzcan una sensibilización en todas las líneas tumorales de mama testadas, sugiere un papel relativo de la bajada de FLIP en la sensibilización de éstas células a TRAIL. Aunque para asegurar esto habría que comprobar el efecto de los AAMs sobre los niveles de FLIP en todas las líneas tumorales de mama. De igual manera, estos resultados sugieren que la bajada de FLIP, aunque puede ser necesaria, quizás no sea suficiente para la sensibilización de las células tumorales de mama a TRAIL. Probablemente la bajada de FLIP debe estar acompañada por otros sucesos como el mayor reclutamiento de caspasa-8 en el DISC (en el caso de roscovitina), o la modificación de otras proteínas que controlan la apoptosis probablemente a nivel de la ruta mitocondrial (en el caso de los AAMs). La importancia real de la caída en los niveles de FLIP en la sensibilización a la apoptosis inducida por TRAIL en células tumorales de mama es algo que está siendo estudiado actualmente en nuestro laboratorio mediante el uso de ARN de interferencia.

Parece claro que el mecanismo por el cual los AAMs sensibilizan a la apoptosis inducida por TRAIL es diferente al de roscovitina.

Tras el tratamiento con nocodazol o taxol y en menor medida también con roscovitina, las células pierden adherencia. Se ha descrito que la adhesión a la matriz extracelular protege a las células de la apoptosis inducida por receptores de muerte, y que el despegamiento de la matriz resulta en una mayor susceptibilidad a la muerte inducida por Fas (Algeciras-Schimmich, Griffith et al. 1999). Sin embargo, la pérdida de adhesión no es la causa de la sensibilización por nocodazol, taxol, o roscovitina en las células MDA-MB-231, ya que cuando se impide la adhesión de las células a la placa mediante el tratamiento de las misma con polyhema, TRAIL no es capaz de inducir apoptosis.

Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento con estos AAMs potencia el procesamiento y activación de la caspasa-8 tras el tratamiento con TRAIL. Este hecho sugiere que la sensibilización está ocurriendo en eventos apicales. Diversos autores han apuntado que taxol podría estar favoreciendo la apoptosis disparada por TRAIL aumentando los niveles de TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5 (Nimmanapalli, Perkins et al. 2001; Singh, Shankar et al. 2003; Odoux and Albers 2004), sin embargo, en los experimentos aquí mostrados no se vio ningún cambio en los receptores pro-apoptóticos, aunque taxol provoca una cierta reducción en los niveles del receptor señuelo TRAIL-R4/DcR2, lo cual podría favorecer la señalización de la apoptosis por

TRAIL en este tipo celular. Se evaluaron también cambios en la formación del DISC de TRAIL, pero no se observó diferencias significativas.

Se ha descrito que caspasa-10 también es reclutada en el DISC de TRAIL, sin embargo, su papel en la iniciación de la apoptosis por receptores de muerte es todavía bastante controvertido. Es posible que el tratamiento con AAMs facilite el reclutamiento y activación de la caspasa-10 en el DISC, y el aumento en la activación de caspasa-8 observado sea solo debido a un procesamiento por el mecanismo de retroalimentación. Si esto ocurriera, sería esperable ver también un aumento de FADD en el DISC de TRAIL, algo que no se ha observado. Sin embargo, algunos autores han descrito, en experimentos de sobreexpresión, que caspasa-10 es reclutada en el DISC de TRAIL a través de un adaptador que parece ser distinto de FADD (MacFarlane, Ahmad et al. 1997; Pan, Ni et al. 1997), lo cual podría explicar el hecho de no ver un aumento de FADD en el DISC. Por otra parte, Park y colaboradores describen que la activación de la caspasa-10 por taxol es independiente de la formación del DISC aunque dependiente de FADD (Park, Wu et al. 2004). La activación de caspasa-10 por taxol es además capaz de procesar Bid independientemente de caspasa-8, y así activar la ruta mitocondrial de apoptosis. Sería posible por tanto y dado que en los experimentos aquí mostrados se ve un mayor procesamiento de Bid, además de una mayor translocación de Bax a la mitocondria y una mayor liberación de citocromo-c tras el tratamiento con AAMs y TRAIL, que el efecto de los AAMs fuera debido a este mayor procesamiento de Bid provocado, en teoría, por una activación de caspasa-10 mediada por taxol e independiente del DISC y por un mayor procesamiento de caspasa-8 en el DISC debido quizás a la bajada de niveles de FLIP provocada por el tratamiento con AAMs. Además, FLIP también podría estar actuando a nivel de FADD-caspasa-10 independientemente del DISC.

Se ha descrito que la sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-xL en células MDA-MB-231 bloquea el sinergismo por taxol y TRAIL (Singh, Shankar et al. 2003), lo cual sugiere que la mitocondria juega un papel fundamental en el sinergismo. A este respecto se ha descrito que taxol es capaz de aumentar la fosforilación de Bcl-2 inactivándolo (Bacus, Gudkov et al. 2001), que aumenta los niveles de proteína de Bax, Bak, Bad y Bim en diversos tipos de células tumorales (Singh, Shankar et al. 2003; Park, Wu et al. 2004; Shankar, Chen et al. 2005) y que baja los niveles de Bcl-xL (Liu and Stein 1997). Sin embargo, en esta tesis no se ha observado que el tratamiento con AAMs afecte a los niveles de proteína de Bcl-2, Bax o Bad en las células MDA-MB-231, aunque no se

descarta la posibilidad de que otras proteínas apoptóticas como Bak, Bcl-xL o Bim pudieran estar alteradas tras el tratamiento con AAMs favoreciendo la apoptosis por TRAIL. De hecho, se ha descrito que Bim esta modulada tras el tratamiento con taxol en células tumorales de mama (Sunters, Fernandez de Mattos et al. 2003), y que dicho aumento en la expresión de Bim media en la apoptosis disparada por taxol.

Más estudios son necesarios para aclarar cuál es exactamente el mecanismo por el que los AAMs sensibilizan a la apoptosis inducida por TRAIL en células tumorales de mama. De cualquier modo, el uso combinado de estas drogas con TRAIL es bastante prometedor, ya que a parte de sensibilizar a diferentes tipos de células tumorales *in vitro*, se han mostrado muy eficaces en la reducción del crecimiento del tumor en xenoinjertos hechos en ratón, así como aumenta de manera significativa la supervivencia de los mismos (Singh, Shankar et al. 2003; Odoux and Albers 2004). Además, parece que su efecto no depende de la existencia de un p53 funcional ni tampoco necesita que las células sean positivas para los receptores de estrógenos, fenotipos muy frecuentes en células cancerígenas, que llevan muchas veces al fracaso terapéutico.

IX. CONCLUSIONES

Conclusiones:

1. La ruta de MAPK/Erk inhibe la apoptosis mediada por TRAIL en células tumorales de mama MCF-7 de manera independiente de la síntesis de nuevas proteínas.
2. La inhibición de la muerte celular por TRAIL mediante la activación de la ruta de las MAPK ocurre específicamente en la ruta mitocondrial de apoptosis en una etapa posterior al procesamiento de caspasa-8 y de Bid.
3. La vía de MAPK inhibe la apoptosis interfiriendo en la localización mitocondrial de Bid truncado, siendo capaz incluso de revertir su localización mitocondrial. Dicha inhibición en la localización de Bid es independiente de su interacción con otros miembros de la familia Bcl-2.
4. Roscovitina sensibiliza a todas las líneas celulares de cáncer de mama analizadas a la apoptosis inducida por TRAIL.
5. Roscovitina sensibiliza a la apoptosis inducida por TRAIL en células tumorales de mama bajando los niveles de ARNm y proteína de FLIP_L y FLIP_S y facilitando la formación del DISC y la activación de la caspasa-8, sin afectar a la expresión en superficie de los receptores de TRAIL.
6. Agentes que afectan a los microtúbulos sensibilizan a la apoptosis inducida por TRAIL en células tumorales de mama aumentando la activación de la caspasa-8 y aumentando la señalización por la ruta mitocondrial de apoptosis.
7. La falta de adhesión de las células tumorales promovida por AAMs no es suficiente para explicar la sensibilización inducida por estos a la apoptosis por TRAIL. .
8. La parada en G2/M producida por AAMs no es suficiente para sensibilizar a las diferentes líneas tumorales de mama a la apoptosis inducida por TRAIL.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Algeciras-Schimmich, A., B. C. Barnhart, et al. (2002). "Apoptosis-independent functions of killer caspases." *Curr Opin Cell Biol* **14**(6): 721-6.
- Algeciras-Schimmich, A., T. S. Griffith, et al. (1999). "Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis." *J Immunol* **162**(9): 5205-11.
- Allan, L. A., N. Morrice, et al. (2003). "Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK." *Nat Cell Biol* **5**(7): 647-54.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, et al. (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature." *Cell* **87**(2): 171.
- Andre, N., D. Braguer, et al. (2000). "Paclitaxel induces release of cytochrome c from mitochondria isolated from human neuroblastoma cells'." *Cancer Res* **60**(19): 5349-53.
- Ardail, D., J. P. Privat, et al. (1990). "Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics." *J Biol Chem* **265**(31): 18797-802.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." *Science* **281**(5381): 1305-8.
- Ashkenazi, A., R. C. Pai, et al. (1999). "Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand." *J Clin Invest* **104**(2): 155-62.
- Bacus, S. S., A. V. Gudkov, et al. (2001). "Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53." *Oncogene* **20**(2): 147-55.
- Banner, D. W., A. D'Arcy, et al. (1993). "Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation." *Cell* **73**(3): 431-45.
- Bargou, R. C., C. Wagener, et al. (1996). "Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice." *J Clin Invest* **97**(11): 2651-9.
- Barnhart, B. C., P. Legembre, et al. (2004). "CD95 ligand induces motility and invasiveness of apoptosis-resistant tumor cells." *Embo J* **23**(15): 3175-85.
- Basu, A. and S. Haldar (1998). "Microtubule-damaging drugs triggered bcl2 phosphorylation-requirement of phosphorylation on both serine-70 and serine-87 residues of bcl2 protein." *Int J Oncol* **13**(4): 659-64.
- Berheide, W., Y. J. Tan, et al. (2000). "Downregulation of proapoptotic proteins Bax and Bcl-X(S) in p53 overexpressing hepatocellular carcinomas." *Biochem Biophys Res Commun* **273**(1): 54-61.
- Bertin, J., R. C. Armstrong, et al. (1997). "Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(4): 1172-6.
- Blagosklonny, M. V., Y. Chuman, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase pathway is dispensable for microtubule-active drug-induced Raf-1/Bcl-2 phosphorylation and apoptosis in leukemia cells." *Leukemia* **13**(7): 1028-36.
- Blagosklonny, M. V., T. W. Schulte, et al. (1995). "Taxol induction of p21WAF1 and p53 requires c-raf-1." *Cancer Res* **55**(20): 4623-6.
- Boatright, K. M., C. Deis, et al. (2004). "Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L)." *Biochem J* **382**(Pt 2): 651-7.
- Boatright, K. M., M. Renatus, et al. (2003). "A unified model for apical caspase activation." *Mol Cell* **11**(2): 529-41.
- Bodmer, J. L., N. Holler, et al. (2000). "TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8." *Nat Cell Biol* **2**(4): 241-3.

- Bodmer, J. L., P. Schneider, et al. (2002). "The molecular architecture of the TNF superfamily." *Trends Biochem Sci* **27**(1): 19-26.
- Bonni, A., A. Brunet, et al. (1999). "Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms." *Science* **286**(5443): 1358-62.
- Borner, C. (2003). "The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions." *Mol Immunol* **39**(11): 615-47.
- Bossy-Wetzel, E., D. D. Newmeyer, et al. (1998). "Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization." *Embo J* **17**(1): 37-49.
- Boucher, M. J., J. Morisset, et al. (2000). "MEK/ERK signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells." *J Cell Biochem* **79**(3): 355-69.
- Bouillet, P., D. Metcalf, et al. (1999). "Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity." *Science* **286**(5445): 1735-8.
- Bratton, S. B., G. Walker, et al. (2001). "Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes." *Embo J* **20**(5): 998-1009.
- Bredesen, D. E. (1995). "Neural apoptosis." *Ann Neurol* **38**(6): 839-51.
- Breitschopf, K., A. M. Zeiher, et al. (2000). "Ubiquitin-mediated degradation of the proapoptotic active form of bid. A functional consequence on apoptosis induction." *J Biol Chem* **275**(28): 21648-52.
- Brunet, A., G. Pages, et al. (1994). "Constitutively active mutants of MAP kinase kinase (MEK1) induce growth factor-relaxation and oncogenicity when expressed in fibroblasts." *Oncogene* **9**(11): 3379-87.
- Buckley, S., B. Driscoll, et al. (1999). "ERK activation protects against DNA damage and apoptosis in hyperoxic rat AEC2." *Am J Physiol* **277**(1 Pt 1): L159-66.
- Burns, T. F. and W. S. El-Deiry (2001). "Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL-sensitive colon carcinoma cell line SW480 using a genetic approach." *J Biol Chem* **276**(41): 37879-86.
- Byrd, J. C., C. Shinn, et al. (1998). "Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via activation of caspase-3 without evidence of bcl-2 modulation or dependence on functional p53." *Blood* **92**(10): 3804-16.
- Callans, L. S., H. Naama, et al. (1995). "Raf-1 protein expression in human breast cancer cells." *Ann Surg Oncol* **2**(1): 38-42.
- Carre, M., N. Andre, et al. (2002). "Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel." *J Biol Chem* **277**(37): 33664-9.
- Cartron, P. F., P. Juin, et al. (2003). "Nonredundant role of Bax and Bak in Bid-mediated apoptosis." *Mol Cell Biol* **23**(13): 4701-12.
- Chadebech, P., I. Truchet, et al. (2000). "Up-regulation of cdc2 protein during paclitaxel-induced apoptosis." *Int J Cancer* **87**(6): 779-86.
- Chang, B. S., A. J. Minn, et al. (1997). "Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2." *Embo J* **16**(5): 968-77.
- Chang, D. W., Z. Xing, et al. (2002). "c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis." *Embo J* **21**(14): 3704-14.

- Chaudhary, P. M., M. Eby, et al. (1997). "Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway." *Immunity* **7**(6): 821-30.
- Chawla-Sarkar, M., S. I. Bae, et al. (2004). "Downregulation of Bcl-2, FLIP or IAPs (XIAP and survivin) by siRNAs sensitizes resistant melanoma cells to Apo2L/TRAIL-induced apoptosis." *Cell Death Differ* **11**(8): 915-23.
- Chen, M., H. He, et al. (2001). "Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion." *J Biol Chem* **276**(33): 30724-8.
- Chen, W. J. and J. K. Lin (2004). "Induction of G1 arrest and apoptosis in human jurkat T cells by pentagalloylglucose through inhibiting proteasome activity and elevating p27Kip1, p21Cip1/WAF1, and Bax proteins." *J Biol Chem* **279**(14): 13496-505.
- Cheng, E. H., D. G. Kirsch, et al. (1997). "Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases." *Science* **278**(5345): 1966-8.
- Cheng, E. H., M. C. Wei, et al. (2001). "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis." *Mol Cell* **8**(3): 705-11.
- Chou, J. J., H. Li, et al. (1999). "Solution structure of BID, an intracellular amplifier of apoptotic signaling." *Cell* **96**(5): 615-24.
- Conus, S., T. Kaufmann, et al. (2000). "Bcl-2 is a monomeric protein: prevention of homodimerization by structural constraints." *Embo J* **19**(7): 1534-44.
- Cory, S. and J. M. Adams (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch." *Nat Rev Cancer* **2**(9): 647-56.
- Cory, S., D. C. Huang, et al. (2003). "The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis." *Oncogene* **22**(53): 8590-607.
- Cryns, V. and J. Yuan (1998). "Proteases to die for." *Genes Dev* **12**(11): 1551-70.
- Dai, Y. and S. Grant (2003). "Cyclin-dependent kinase inhibitors." *Curr Opin Pharmacol* **3**(4): 362-70.
- Dai, Y., M. Rahmani, et al. (2003). "Proteasome inhibitors potentiate leukemic cell apoptosis induced by the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol through a SAPK/JNK- and NF-kappaB-dependent process." *Oncogene* **22**(46): 7108-22.
- Degli Esposti, M., G. Ferry, et al. (2003). "Post-translational modification of Bid has differential effects on its susceptibility to cleavage by caspase 8 or caspase 3." *J Biol Chem* **278**(18): 15749-57.
- Degterev, A., M. Boyce, et al. (2003). "A decade of caspases." *Oncogene* **22**(53): 8543-67.
- Deng, X., S. M. Kornblau, et al. (2001). "Regulation of Bcl2 phosphorylation and potential significance for leukemic cell chemoresistance." *J Natl Cancer Inst Monogr* **(28)**: 30-7.
- Deng, Y., Y. Lin, et al. (2002). "TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO." *Genes Dev* **16**(1): 33-45.
- Desagher, S., A. Osen-Sand, et al. (2001). "Phosphorylation of bid by casein kinases I and II regulates its cleavage by caspase 8." *Mol Cell* **8**(3): 601-11.
- Desagher, S., A. Osen-Sand, et al. (1999). "Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis." *J Cell Biol* **144**(5): 891-901.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." *Genes Dev* **13**(3): 239-52.
- Donepudi, M., A. Mac Sweeney, et al. (2003). "Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation." *Mol Cell* **11**(2): 543-9.

- Du, C., M. Fang, et al. (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." Cell **102**(1): 33-42.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins, et al. (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." Annu Rev Biochem **68**: 383-424.
- Edamatsu, H., C. L. Gau, et al. (2000). "Cdk inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergize with farnesyltransferase inhibitor (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines." Oncogene **19**(27): 3059-68.
- Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2004). "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy." Curr Opin Cell Biol **16**(6): 663-9.
- Eguchi, Y., S. Shimizu, et al. (1997). "Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis." Cancer Res **57**(10): 1835-40.
- Engels, I. H., A. Stepczynska, et al. (2000). "Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis." Oncogene **19**(40): 4563-73.
- Epanand, R. F., J. C. Martinou, et al. (2002). "The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature." J Biol Chem **277**(36): 32632-9.
- Erhardt, P., E. J. Schremser, et al. (1999). "B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway." Mol Cell Biol **19**(8): 5308-15.
- Eskes, R., S. Desagher, et al. (2000). "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane." Mol Cell Biol **20**(3): 929-35.
- Faccio, L., C. Fusco, et al. (2000). "Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia." J Biol Chem **275**(4): 2581-8.
- Filgueira de Azevedo, W., Jr., R. T. Gaspar, et al. (2002). "Molecular model of cyclin-dependent kinase 5 complexed with roscovitine." Biochem Biophys Res Commun **297**(5): 1154-8.
- Fischer, P. M. (2004). "The use of CDK inhibitors in oncology: a pharmaceutical perspective." Cell Cycle **3**(6): 742-6.
- Frisch, S. M. and R. A. Screaton (2001). "Anoikis mechanisms." Curr Opin Cell Biol **13**(5): 555-62.
- Fukazawa, T., T. Fujiwara, et al. (2001). "Accelerated degradation of cellular FLIP protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells." Oncogene **20**(37): 5225-31.
- Fulda, S., E. Meyer, et al. (2002). "Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression." Oncogene **21**(15): 2283-94.
- Gadducci, A., S. Cosio, et al. (2002). "Molecular mechanisms of apoptosis and chemosensitivity to platinum and paclitaxel in ovarian cancer: biological data and clinical implications." Eur J Gynaecol Oncol **23**(5): 390-6.
- Gajate, C., I. Barasoain, et al. (2000). "Induction of apoptosis in leukemic cells by the reversible microtubule-disrupting agent 2-methoxy-5-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one: protection by Bcl-2 and Bcl-X(L) and cell cycle arrest." Cancer Res **60**(10): 2651-9.
- Gajkowska, B., U. Wojewodzka, et al. (2004). "Translocation of Bax and Bid to mitochondria, endoplasmic reticulum and nuclear envelope: possible control points in apoptosis." J Mol Histol **35**(1): 11-9.
- Garrett, M. D. and A. Fattaey (1999). "CDK inhibition and cancer therapy." Curr Opin Genet Dev **9**(1): 104-11.

- Germain, M., E. B. Affar, et al. (1999). "Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7." J Biol Chem **274**(40): 28379-84.
- Gibson, S. B., R. Oyer, et al. (2000). "Increased expression of death receptors 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL." Mol Cell Biol **20**(1): 205-12.
- Gong, X. M., J. Choi, et al. (2004). "Conformation of membrane-associated proapoptotic tBid." J Biol Chem **279**(28): 28954-60.
- Grant, S. and J. D. Roberts (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 G. I. Evan (2002). "A matter of life and death." Cancer Cell **1**(1): 19-30.
- Green, D. R. and G. Kroemer (2004). "The pathophysiology of mitochondrial cell death." Science **305**(5684): 626-9.
- Griffith, T. S., W. A. Chin, et al. (1998). "Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells." J Immunol **161**(6): 2833-40.
- Griffith, T. S. and D. H. Lynch (1998). "TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms." Curr Opin Immunol **10**(5): 559-63.
- Griffiths, G. J., L. Dubrez, et al. (1999). "Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis." J Cell Biol **144**(5): 903-14.
- Grinberg, M., R. Sarig, et al. (2002). "tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis." J Biol Chem **277**(14): 12237-45.
- Guo, B. C. and Y. H. Xu (2001). "Bcl-2 over-expression and activation of protein kinase C suppress the trail-induced apoptosis in Jurkat T cells." Cell Res **11**(2): 101-6.
- Hacki, J., L. Egger, et al. (2000). "Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2." Oncogene **19**(19): 2286-95.
- Hagemann, C. and J. L. Blank (2001). "The ups and downs of MEK kinase interactions." Cell Signal **13**(12): 863-75.
- Hagting, A., C. Karlsson, et al. (1998). "MPF localization is controlled by nuclear export." Embo J **17**(14): 4127-38.
- Hahntow, I. N., F. Schneller, et al. (2004). "Cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells." Leukemia **18**(4): 747-55.
- Haldar, S., A. Basu, et al. (1997). "Bcl2 is the guardian of microtubule integrity." Cancer Res **57**(2): 229-33.
- Harper, N., S. N. Farrow, et al. (2001). "Modulation of tumor necrosis factor apoptosis-inducing ligand- induced NF-kappa B activation by inhibition of apical caspases." J Biol Chem **276**(37): 34743-52.
- Harper, N., M. A. Hughes, et al. (2003). "Protein kinase C modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by targeting the apical events of death receptor signaling." J Biol Chem **278**(45): 44338-47.
- He, L. and J. J. Lemasters (2002). "Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function?" FEBS Lett **512**(1-3): 1-7.
- He, Q., Y. Huang, et al. (2004). "Proteasome inhibitor MG132 upregulates death receptor 5 and cooperates with Apo2L/TRAIL to induce apoptosis in Bax-proficient and -deficient cells." Oncogene **23**(14): 2554-8.

- Hegde, R., S. M. Srinivasula, et al. (2002). "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction." *J Biol Chem* **277**(1): 432-8.
- Heibin, J. A., I. S. Goping, et al. (2000). "Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax." *J Exp Med* **192**(10): 1391-402.
- Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." *Nature* **407**(6805): 770-6.
- Hirumura, K., J. W. Pippin, et al. (2002). "The subcellular localization of cyclin dependent kinase 2 determines the fate of mesangial cells: role in apoptosis and proliferation." *Oncogene* **21**(11): 1750-8.
- Holmstrom, T. H., I. Schmitz, et al. (2000). "MAPK/ERK signaling in activated T cells inhibits CD95/Fas-mediated apoptosis downstream of DISC assembly." *Embo J* **19**(20): 5418-28.
- Hsu, S. Y., A. Kaipia, et al. (1997). "Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(23): 12401-6.
- Hu, S., C. Vincenz, et al. (1997). "I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis." *J Biol Chem* **272**(28): 17255-7.
- Huang, D. C. and A. Strasser (2000). "BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death." *Cell* **103**(6): 839-42.
- Huang, H., C. A. Joazeiro, et al. (2000). "The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7." *J Biol Chem* **275**(35): 26661-4.
- Huisman, C., C. G. Ferreira, et al. (2002). "Paclitaxel triggers cell death primarily via caspase-independent routes in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460." *Clin Cancer Res* **8**(2): 596-606.
- Inoue, S., M. MacFarlane, et al. (2004). "Histone deacetylase inhibitors potentiate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in lymphoid malignancies." *Cell Death Differ* **11 Suppl 2**: S193-206.
- Ionov, Y., H. Yamamoto, et al. (2000). "Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(20): 10872-7.
- Irmiler, M., M. Thome, et al. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP." *Nature* **388**(6638): 190-5.
- Janes, P. W., R. J. Daly, et al. (1994). "Activation of the Ras signalling pathway in human breast cancer cells overexpressing erbB-2." *Oncogene* **9**(12): 3601-8.
- Janicke, R. U., M. L. Sprengart, et al. (1998). "Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis." *J Biol Chem* **273**(16): 9357-60.
- Jessenberger, V. and S. Jentsch (2002). "Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(2): 112-21.
- Jo, M., T. H. Kim, et al. (2000). "Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." *Nat Med* **6**(5): 564-7.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." *Science* **298**(5600): 1911-2.
- Joza, N., S. A. Susin, et al. (2001). "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death." *Nature* **410**(6828): 549-54.
- Kandasamy, K., S. M. Srinivasula, et al. (2003). "Involvement of proapoptotic molecules Bax and Bak in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced mitochondrial disruption and apoptosis: differential

- regulation of cytochrome c and Smac/DIABLO release." *Cancer Res* **63**(7): 1712-21.
- Karin, M. and Y. Ben-Neriah (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity." *Annu Rev Immunol* **18**: 621-63.
- Keane, M. M., S. A. Ettenberg, et al. (1999). "Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines." *Cancer Res* **59**(3): 734-41.
- Kelekar, A. and C. B. Thompson (1998). "Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis." *Trends Cell Biol* **8**(8): 324-30.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *Br J Cancer* **26**(4): 239-57.
- Khleif, S. N., S. I. Abrams, et al. (1999). "A phase I vaccine trial with peptides reflecting ras oncogene mutations of solid tumors." *J Immunother* **22**(2): 155-65.
- Kim, E. H., S. U. Kim, et al. (2004). "Roscovitine sensitizes glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by downregulation of survivin and XIAP." *Oncogene* **23**(2): 446-56.
- Kim, T. H., Y. Zhao, et al. (2004). "Bid-cardiolipin interaction at mitochondrial contact site contributes to mitochondrial cristae reorganization and cytochrome C release." *Mol Biol Cell* **15**(7): 3061-72.
- Kim, Y., N. Suh, et al. (2002). "An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis." *J Biol Chem* **277**(25): 22320-9.
- Kischkel, F. C., D. A. Lawrence, et al. (2000). "Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5." *Immunity* **12**(6): 611-20.
- Knudson, C. M., K. S. Tung, et al. (1995). "Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death." *Science* **270**(5233): 96-9.
- Koenig, U., L. Eckhart, et al. (2001). "Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene." *Biochem Biophys Res Commun* **285**(5): 1150-4.
- Koistinaho, J., K. J. Hicks, et al. (1993). "Long-term induction of c-jun mRNA and Jun protein in rabbit retinal ganglion cells following axotomy or colchicine treatment." *J Neurosci Res* **34**(2): 250-5.
- Kokoszka, J. E., K. G. Waymire, et al. (2004). "The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore." *Nature* **427**(6973): 461-5.
- Kolch, W., G. Heidecker, et al. (1993). "Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation." *Nature* **364**(6434): 249-52.
- Kondo, S., Y. Shinomura, et al. (2000). "Mutations of the bak gene in human gastric and colorectal cancers." *Cancer Res* **60**(16): 4328-30.
- Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, et al. (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." *Cell Death Differ* **7**(12): 1166-73.
- Kovacs, D. M. and B. B. Kaplan (1992). "Discordant estimates of heterologous promoter activity as determined by reporter gene mRNA levels and enzyme activity." *Biochem Biophys Res Commun* **189**(2): 912-8.
- Krajewski, S., M. Krajewska, et al. (1996). "Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family." *Cancer Res* **56**(12): 2849-55.
- Krajewski, S., M. Krajewska, et al. (1994). "Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2." *Am J Pathol* **145**(6): 1323-36.

- Krueger, A., I. Schmitz, et al. (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): 20633-40.
- Kuwana, T., M. R. Mackey, et al. (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." *Cell* **111**(3): 331-42.
- Lam, L. T., O. K. Pickeral, et al. (2001). "Genomic-scale measurement of mRNA turnover and the mechanisms of action of the anti-cancer drug flavopiridol." *Genome Biol* **2**(10): RESEARCH0041.
- Lamkanfi, M., W. Declercq, et al. (2002). "Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man." *Cell Death Differ* **9**(4): 358-61.
- Lee, J. T., Jr. and J. A. McCubrey (2002). "The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia." *Leukemia* **16**(4): 486-507.
- Lei, K. and R. J. Davis (2003). "JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(5): 2432-7.
- Leist, M. and M. Jaattela (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(8): 589-98.
- Letai, A., M. C. Bassik, et al. (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." *Cancer Cell* **2**(3): 183-92.
- Leverkus, M., M. R. Sprick, et al. (2003). "Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation." *Mol Cell Biol* **23**(3): 777-90.
- Ley, R., K. Balmanno, et al. (2003). "Activation of the ERK1/2 signaling pathway promotes phosphorylation and proteasome-dependent degradation of the BH3-only protein, Bim." *J Biol Chem* **278**(21): 18811-6.
- Li, F., G. Ambrosini, et al. (1998). "Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin." *Nature* **396**(6711): 580-4.
- Li, H., H. Zhu, et al. (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." *Cell* **94**(4): 491-501.
- Li, L. Y., X. Luo, et al. (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." *Nature* **412**(6842): 95-9.
- Li, S., Y. Zhao, et al. (2002). "Relief of extrinsic pathway inhibition by the Bid-dependent mitochondrial release of Smac in Fas-mediated hepatocyte apoptosis." *J Biol Chem* **277**(30): 26912-20.
- Li, T. and J. A. Sparano (2003). "Inhibiting Ras signaling in the therapy of breast cancer." *Clin Breast Cancer* **3**(6): 405-16; discussion 417-20.
- Lin, B., S. K. Kolluri, et al. (2004). "Conversion of Bcl-2 from protector to killer by interaction with nuclear orphan receptor Nur77/TR3." *Cell* **116**(4): 527-40.
- Lindenboim, L., J. Yuan, et al. (2000). "Bcl-xS and Bax induce different apoptotic pathways in PC12 cells." *Oncogene* **19**(14): 1783-93.
- Lindsten, T., A. J. Ross, et al. (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." *Mol Cell* **6**(6): 1389-99.
- Ling, Y. H., C. Tornos, et al. (1998). "Phosphorylation of Bcl-2 is a marker of M phase events and not a determinant of apoptosis." *J Biol Chem* **273**(30): 18984-91.

- Liu, Q. Y. and C. A. Stein (1997). "Taxol and estramustine-induced modulation of human prostate cancer cell apoptosis via alteration in bcl-xL and bak expression." *Clin Cancer Res* **3**(11): 2039-46.
- Ljungman, M. and M. T. Paulsen (2001). "The cyclin-dependent kinase inhibitor roscovitine inhibits RNA synthesis and triggers nuclear accumulation of p53 that is unmodified at Ser15 and Lys382." *Mol Pharmacol* **60**(4): 785-9.
- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* **94**(4): 481-90.
- Lutter, M., M. Fang, et al. (2000). "Cardiolipin provides specificity for targeting of tBid to mitochondria." *Nat Cell Biol* **2**(10): 754-61.
- Lutter, M., G. A. Perkins, et al. (2001). "The pro-apoptotic Bcl-2 family member tBid localizes to mitochondrial contact sites." *BMC Cell Biol* **2**(1): 22.
- Maass, A., S. J. Langer, et al. (2003). "Rational promoter selection for gene transfer into cardiac cells." *J Mol Cell Cardiol* **35**(7): 823-31.
- MacFarlane, M., M. Ahmad, et al. (1997). "Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL." *J Biol Chem* **272**(41): 25417-20.
- MacFarlane, M., N. Harper, et al. (2002). "Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia." *Oncogene* **21**(44): 6809-18.
- MacFarlane, M., W. Merrison, et al. (2002). "Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro." *J Biol Chem* **277**(39): 36611-6.
- Mackay, H. J. and C. J. Twelves (2003). "Protein kinase C: a target for anticancer drugs?" *Endocr Relat Cancer* **10**(3): 389-96.
- Mai, H., W. S. May, et al. (2003). "A functional role for nicotine in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis." *J Biol Chem* **278**(3): 1886-91.
- Majewski, N., V. Nogueira, et al. (2004). "Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases." *Mol Cell Biol* **24**(2): 730-40.
- Makin, G. and J. A. Hickman (2000). "Apoptosis and cancer chemotherapy." *Cell Tissue Res* **301**(1): 143-52.
- Manthey, C. L., M. E. Brandes, et al. (1992). "Taxol increases steady-state levels of lipopolysaccharide-inducible genes and protein-tyrosine phosphorylation in murine macrophages." *J Immunol* **149**(7): 2459-65.
- Marzo, I., C. Brenner, et al. (1998). "Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis." *Science* **281**(5385): 2027-31.
- Mattson, M. P. and G. Kroemer (2003). "Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection." *Trends Mol Med* **9**(5): 196-205.
- May, W. S., P. G. Tyler, et al. (1994). "Interleukin-3 and bryostatin-1 mediate hyperphosphorylation of BCL2 alpha in association with suppression of apoptosis." *J Biol Chem* **269**(43): 26865-70.
- McClue, S. J., D. Blake, et al. (2002). "In vitro and in vivo antitumor properties of the cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine)." *Int J Cancer* **102**(5): 463-8.
- Meijer, L. (2000). "Cyclin-dependent kinases inhibitors as potential anticancer, antineurodegenerative, antiviral and antiparasitic agents." *Drug Resist Updat* **3**(2): 83-88.

- Meijer, L., A. Borgne, et al. (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): 527-36.
- Meijer, L. and E. Raymond (2003). "Roscovitine and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials." *Acc Chem Res* **36**(6): 417-25.
- Meng, X. W., M. P. Heldebrant, et al. (2002). "Phorbol 12-myristate 13-acetate inhibits death receptor-mediated apoptosis in Jurkat cells by disrupting recruitment of Fas-associated polypeptide with death domain." *J Biol Chem* **277**(5): 3776-83.
- Mgbonyebi, O. P., J. Russo, et al. (1999). "Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells." *Cancer Res* **59**(8): 1903-10.
- Micheau, O., M. Thome, et al. (2002). "The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex." *J Biol Chem* **277**(47): 45162-71.
- Mihara, M., S. Shintani, et al. (2002). "Cyclin-dependent kinase inhibitor (roscovitine) suppresses growth and induces apoptosis by regulating Bcl-x in head and neck squamous cell carcinoma cells." *Int J Oncol* **21**(1): 95-101.
- Mollinedo, F. and C. Gajate (2003). "Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis." *Apoptosis* **8**(5): 413-50.
- Monaco, E. A., 3rd, C. M. Beaman-Hall, et al. (2004). "Roscovitine, olomoucine, purvalanol: inducers of apoptosis in maturing cerebellar granule neurons." *Biochem Pharmacol* **67**(10): 1947-64.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, et al. (1996). "FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex." *Cell* **85**(6): 817-27.
- Nagane, M., G. Pan, et al. (2000). "Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo." *Cancer Res* **60**(4): 847-53.
- Nakano, K. and K. H. Vousden (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." *Mol Cell* **7**(3): 683-94.
- Nechushtan, A., C. L. Smith, et al. (1999). "Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death." *Embo J* **18**(9): 2330-41.
- Nimmanapalli, R., C. L. Perkins, et al. (2001). "Pretreatment with paclitaxel enhances apo-2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of prostate cancer cells by inducing death receptors 4 and 5 protein levels." *Cancer Res* **61**(2): 759-63.
- Nutley, B. P., F. I. Raynaud, et al. (2005). "Metabolism and pharmacokinetics of the cyclin-dependent kinase inhibitor R-roscovitine in the mouse." *Mol Cancer Ther* **4**(1): 125-39.
- O'Connor, R. (1998). "Survival factors and apoptosis." *Adv Biochem Eng Biotechnol* **62**: 137-66.
- Oda, E., R. Ohki, et al. (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." *Science* **288**(5468): 1053-8.
- Odoux, C. and A. Albers (2004). "Additive effects of TRAIL and paclitaxel on cancer cells: implications for advances in cancer therapy." *Vitam Horm* **67**: 385-407.
- Ogasawara, J., R. Watanabe-Fukunaga, et al. (1993). "Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice." *Nature* **364**(6440): 806-9.

- Oh, K. J., S. Barbuto, et al. (2005). "Conformational Changes in BID, a Pro-apoptotic BCL-2 Family Member, upon Membrane Binding: A SITE-DIRECTED SPIN LABELING STUDY." *J Biol Chem* **280**(1): 753-67.
- Ott, M., J. D. Robertson, et al. (2002). "Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1259-63.
- Oya, M., M. Ohtsubo, et al. (2001). "Constitutive activation of nuclear factor-kappaB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells." *Oncogene* **20**(29): 3888-96.
- Pan, G., J. Ni, et al. (1997). "An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL." *Science* **277**(5327): 815-8.
- Park, S. J., C. H. Wu, et al. (2004). "Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis." *J Biol Chem* **279**(49): 51057-67.
- Pastorino, J. G., N. Shulga, et al. (2002). "Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis." *J Biol Chem* **277**(9): 7610-8.
- Peter, M. E. (2004). "The flip side of FLIP." *Biochem J* **382**(Pt 2): e1-3.
- Petros, A. M., A. Medek, et al. (2001). "Solution structure of the antiapoptotic protein bcl-2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(6): 3012-7.
- Pistritto, G., M. Jost, et al. (2002). "Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia." *Cell Death Differ* **9**(9): 995-1006.
- Puthalakath, H., D. C. Huang, et al. (1999). "The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex." *Mol Cell* **3**(3): 287-96.
- Puthalakath, H. and A. Strasser (2002). "Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins." *Cell Death Differ* **9**(5): 505-12.
- Puthalakath, H., A. Villunger, et al. (2001). "Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis." *Science* **293**(5536): 1829-32.
- Ramaswamy, M., E. V. Efimova, et al. (2004). "IG20 (MADD splice variant-5), a proapoptotic protein, interacts with DR4/DR5 and enhances TRAIL-induced apoptosis by increasing recruitment of FADD and caspase-8 to the DISC." *Oncogene* **23**(36): 6083-94.
- Rasper, D. M., J. P. Vaillancourt, 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): 271-88.
- Ravi, R., G. C. Bedi, et al. (2001). "Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB." *Nat Cell Biol* **3**(4): 409-16.
- Reed, J. C. (1999). "Dysregulation of apoptosis in cancer." *J Clin Oncol* **17**(9): 2941-53.
- Reed, J. C. (2003). "Apoptosis-targeted therapies for cancer." *Cancer Cell* **3**(1): 17-22.
- Renshaw, S. A., C. E. Dempsey, et al. (2004). "Three novel Bid proteins generated by alternative splicing of the human Bid gene." *J Biol Chem* **279**(4): 2846-55.
- Ricci, M. S., Z. Jin, et al. (2004). "Direct repression of FLIP expression by c-myc is a major determinant of TRAIL sensitivity." *Mol Cell Biol* **24**(19): 8541-55.
- Riedl, S. J. and Y. Shi (2004). "Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(11): 897-907.
- Rippo, M. R., S. Moretti, et al. (2004). "FLIP overexpression inhibits death receptor-induced apoptosis in malignant mesothelial cells." *Oncogene* **23**(47): 7753-60.

- Roberts, D. L., W. Merrison, et al. (2001). "The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity." J Cell Biol **153**(1): 221-8.
- Roucou, X., S. Montessuit, et al. (2002). "Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein." Biochem J **368**(Pt 3): 915-21.
- Roucou, X., T. Rostovtseva, et al. (2002). "Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes." Biochem J **363**(Pt 3): 547-52.
- Rowinsky, E. K., L. A. Cazenave, et al. (1990). "Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent." J Natl Cancer Inst **82**(15): 1247-59.
- Ruiz de Almodovar, C., C. Ruiz-Ruiz, et al. (2001). "The differential sensitivity of Bcl-2-overexpressing human breast tumor cells to TRAIL or doxorubicin-induced apoptosis is dependent on Bcl-2 protein levels." Oncogene **20**(48): 7128-33.
- Ruiz-Ruiz, C., C. Munoz-Pinedo, et al. (2000). "Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program." Cancer Res **60**(20): 5673-80.
- Ruiz-Ruiz, C., G. Robledo, et al. (1999). "Protein kinase C inhibits CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis by at least two different mechanisms in Jurkat T cells." J Immunol **163**(9): 4737-46.
- Ryan, K. M., A. C. Phillips, et al. (2001). "Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 332-7.
- Salomoni, P. and P. P. Pandolfi (2002). "The role of PML in tumor suppression." Cell **108**(2): 165-70.
- Salvesen, G. S. and V. M. Dixit (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 10964-7.
- Santen, R. J., R. X. Song, et al. (2002). "The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **80**(2): 239-56.
- Sarker, M., C. Ruiz-Ruiz, et al. (2001). "Activation of protein kinase C inhibits TRAIL-induced caspases activation, mitochondrial events and apoptosis in a human leukemic T cell line." Cell Death Differ **8**(2): 172-81.
- Sarker, M., C. Ruiz-Ruiz, et al. (2002). "Stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway antagonizes TRAIL-induced apoptosis downstream of BID cleavage in human breast cancer MCF-7 cells." Oncogene **21**(27): 4323-7.
- Sattler, M., H. Liang, et al. (1997). "Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis." Science **275**(5302): 983-6.
- Sausville, E. A. (2002). "Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs." Trends Mol Med **8**(4 Suppl): S32-7.
- Sax, J. K., P. Fei, et al. (2002). "BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity." Nat Cell Biol **4**(11): 842-9.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." Embo J **17**(6): 1675-87.
- Scaffidi, C., I. Schmitz, et al. (1999). "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis." J Biol Chem **274**(3): 1541-8.
- Scheid, M. P., K. M. Schubert, et al. (1999). "Regulation of bad phosphorylation and association with Bcl-x(L) by the MAPK/Erk kinase." J Biol Chem **274**(43): 31108-13.
- Schiff, P. B., J. Fant, et al. (1979). "Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol." Nature **277**(5698): 665-7.

- Schlesinger, P. H., A. Gross, et al. (1997). "Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11357-62.
- Schwartz, G. K., D. Ilson, et al. (2001). "Phase II study of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol administered to patients with advanced gastric carcinoma." J Clin Oncol **19**(7): 1985-92.
- Schwartz, L. M., S. W. Smith, et al. (1993). "Do all programmed cell deaths occur via apoptosis?" Proc Natl Acad Sci U S A **90**(3): 980-4.
- Scorrano, L., M. Ashiya, et al. (2002). "A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis." Dev Cell **2**(1): 55-67.
- Scorrano, L., S. A. Oakes, et al. (2003). "BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis." Science **300**(5616): 135-9.
- Sebolt-Leopold, J. S. (2000). "Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway." Oncogene **19**(56): 6594-9.
- Shankar, S., X. Chen, et al. (2005). "Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer in vitro and in vivo." Prostate **62**(2): 165-86.
- Shankar, S. and R. K. Srivastava (2004). "Enhancement of therapeutic potential of TRAIL by cancer chemotherapy and irradiation: mechanisms and clinical implications." Drug Resist Updat **7**(2): 139-56.
- Shapiro, G. I., J. G. Supko, et al. (2001). "A phase II trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol in patients with previously untreated stage IV non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **7**(6): 1590-9.
- Sheikh, M. S., T. F. Burns, et al. (1998). "p53-dependent and -independent regulation of the death receptor KILLER/DR5 gene expression in response to genotoxic stress and tumor necrosis factor alpha." Cancer Res **58**(8): 1593-8.
- Shen, S. C., T. S. Huang, et al. (1998). "Taxol-induced p34cdc2 kinase activation and apoptosis inhibited by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in human breast MCF-7 carcinoma cells." Cell Growth Differ **9**(1): 23-9.
- Sheridan, J. P., S. A. Marsters, et al. (1997). "Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors." Science **277**(5327): 818-21.
- Sherr, C. J. (2000). "The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited." Cancer Res **60**(14): 3689-95.
- Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." Mol Cell **9**(3): 459-70.
- Shibuya, E. K. and J. V. Ruderman (1993). "Mos induces the in vitro activation of mitogen-activated protein kinases in lysates of frog oocytes and mammalian somatic cells." Mol Biol Cell **4**(8): 781-90.
- Shimizu, S., M. Narita, et al. (1999). "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC." Nature **399**(6735): 483-7.
- Shonai, T., M. Adachi, et al. (2002). "MEK/ERK pathway protects ionizing radiation-induced loss of mitochondrial membrane potential and cell death in lymphocytic leukemia cells." Cell Death Differ **9**(9): 963-71.
- Siegmund, D., P. Hadwiger, et al. (2002). "Selective inhibition of FLICE-like inhibitory protein expression with small interfering RNA oligonucleotides is sufficient to sensitize tumor cells for TRAIL-induced apoptosis." Mol Med **8**(11): 725-32.
- Singh, T. R., S. Shankar, et al. (2003). "Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand

- on apoptosis and on regression of breast carcinoma in vivo." Cancer Res **63**(17): 5390-400.
- Sivaraman, V. S., H. Wang, et al. (1997). "Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer." J Clin Invest **99**(7): 1478-83.
- Slee, E. A., S. A. Keogh, et al. (2000). "Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release." Cell Death Differ **7**(6): 556-65.
- Soderstrom, T. S., M. Poukkula, et al. (2002). "Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase signaling in activated T cells abrogates TRAIL-induced apoptosis upstream of the mitochondrial amplification loop and caspase-8." J Immunol **169**(6): 2851-60.
- Sprick, M. R., M. A. Weigand, et al. (2000). "FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2." Immunity **12**(6): 599-609.
- Stoka, V., B. Turk, et al. (2001). "Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route." J Biol Chem **276**(5): 3149-57.
- Strasser, A., D. C. Huang, et al. (1997). "The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy." Biochim Biophys Acta **1333**(2): F151-78.
- Subbaramaiah, K., J. C. Hart, et al. (2000). "Microtubule-interfering agents stimulate the transcription of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of ERK1/2 AND p38 mitogen-activated protein kinase pathways." J Biol Chem **275**(20): 14838-45.
- Sugiyama, T., S. Shimizu, et al. (2002). "Activation of mitochondrial voltage-dependent anion channel by pro-apoptotic BH3-only protein Bim." Oncogene **21**(32): 4944-56.
- Sunters, A., S. Fernandez de Mattos, et al. (2003). "FoxO3a transcriptional regulation of Bim controls apoptosis in paclitaxel-treated breast cancer cell lines." J Biol Chem **278**(50): 49795-805.
- Susin, S. A., E. Dugas, et al. (2000). "Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis." J Exp Med **192**(4): 571-80.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, et al. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**(6718): 441-6.
- Suzuki, Y., Y. Imai, et al. (2001). "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death." Mol Cell **8**(3): 613-21.
- Takeda, K., M. J. Smyth, et al. (2001). "Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth." Cell Immunol **214**(2): 194-200.
- Tan, K. O., K. M. Tan, et al. (1999). "A novel BH3-like domain in BID is required for intramolecular interaction and autoinhibition of pro-apoptotic activity." J Biol Chem **274**(34): 23687-90.
- Tang, C., M. C. Willingham, et al. (1994). "High levels of p26BCL-2 oncoprotein retard taxol-induced apoptosis in human pre-B leukemia cells." Leukemia **8**(11): 1960-9.

- Tartaglia, L. A. and D. V. Goeddel (1992). "Tumor necrosis factor receptor signaling. A dominant negative mutation suppresses the activation of the 55-kDa tumor necrosis factor receptor." *J Biol Chem* **267**(7): 4304-7.
- Thome, M., P. Schneider, et al. (1997). "Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors." *Nature* **386**(6624): 517-21.
- Thompson, E. B. (1998). "Special topic: apoptosis." *Annu Rev Physiol* **60**: 525-32.
- Thomson, B. J. (2001). "Viruses and apoptosis." *Int J Exp Pathol* **82**(2): 65-76.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998). "Caspases: enemies within." *Science* **281**(5381): 1312-6.
- Townsend, K. J., J. L. Trusty, et al. (1998). "Expression of the antiapoptotic MCL1 gene product is regulated by a mitogen activated protein kinase-mediated pathway triggered through microtubule disruption and protein kinase C." *Oncogene* **17**(10): 1223-34.
- Tran, S. E., T. H. Holmstrom, et al. (2001). "MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors." *J Biol Chem* **276**(19): 16484-90.
- Tschopp, J., F. Martinon, et al. (1999). "Apoptosis: Silencing the death receptors." *Curr Biol* **9**(10): R381-4.
- Tsujimoto, Y. and S. Shimizu (2000). "VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins." *Cell Death Differ* **7**(12): 1174-81.
- van Gurp, M., N. Festjens, et al. (2003). "Mitochondrial intermembrane proteins in cell death." *Biochem Biophys Res Commun* **304**(3): 487-97.
- van Loo, G., X. Saelens, et al. (2002). "The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet." *Cell Death Differ* **9**(10): 1031-42.
- Vantieghem, A., Y. Xu, et al. (2002). "Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis." *J Biol Chem* **277**(40): 37718-31.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, et al. (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." *Cell* **102**(1): 43-53.
- Verhagen, A. M., J. Silke, et al. (2002). "HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins." *J Biol Chem* **277**(1): 445-54.
- Vitali, L., J. S. Yakisich, et al. (2002). "Roscovitine inhibits ongoing DNA synthesis in human cervical cancer." *Cancer Lett* **180**(1): 7-12.
- von Haefen, C., T. Wieder, et al. (2003). "Paclitaxel-induced apoptosis in BJAB cells proceeds via a death receptor-independent, caspases-3/-8-driven mitochondrial amplification loop." *Oncogene* **22**(15): 2236-47.
- Wahl, A. F., K. L. Donaldson, et al. (1996). "Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis." *Nat Med* **2**(1): 72-9.
- Wajant, H. (2004). "TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship." *Vitam Horm* **67**: 101-32.
- Walczak, H., R. E. Miller, et al. (1999). "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo." *Nat Med* **5**(2): 157-63.
- Walensky, L. D., A. L. Kung, et al. (2004). "Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix." *Science* **305**(5689): 1466-70.
- Wang, H. G., N. Pathan, et al. (1999). "Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD." *Science* **284**(5412): 339-43.

- Wang, K., X. M. Yin, et al. (1996). "BID: a novel BH3 domain-only death agonist." *Genes Dev* **10**(22): 2859-69.
- Wang, T. H. and H. S. Wang (1996). "p53, apoptosis and human cancers." *J Formos Med Assoc* **95**(7): 509-22.
- Wang, X. (2001). "The expanding role of mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* **15**(22): 2922-33.
- Wang, X., M. Gorospe, et al. (1997). "p27Kip1 overexpression causes apoptotic death of mammalian cells." *Oncogene* **15**(24): 2991-7.
- Wang, X., J. L. Martindale, et al. (1998). "The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival." *Biochem J* **333** (Pt 2): 291-300.
- Watanabe, K., K. Okamoto, et al. (2005). "Sensitization of osteosarcoma cells to death receptor-mediated apoptosis by HDAC inhibitors through downregulation of cellular FLIP." *Cell Death Differ* **12**(1): 10-8.
- Wei, M. C., T. Lindsten, et al. (2000). "tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c." *Genes Dev* **14**(16): 2060-71.
- Wei, M. C., W. X. Zong, et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." *Science* **292**(5517): 727-30.
- Werlen, G., E. Jacinto, et al. (1998). "Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes." *Embo J* **17**(11): 3101-11.
- Whitehurst, C. E., T. G. Boulton, et al. (1992). "Extracellular signal-regulated kinases in T cells. Anti-CD3 and 4 beta-phorbol 12-myristate 13-acetate-induced phosphorylation and activation." *J Immunol* **148**(10): 3230-7.
- Whittaker, S. R., M. I. Walton, et al. (2004). "The Cyclin-dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) inhibits retinoblastoma protein phosphorylation, causes loss of Cyclin D1, and activates the mitogen-activated protein kinase pathway." *Cancer Res* **64**(1): 262-72.
- Widmann, C., S. Gibson, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." *Physiol Rev* **79**(1): 143-80.
- Widmann, C., S. Gibson, et al. (1998). "Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals." *J Biol Chem* **273**(12): 7141-7.
- Wiley, S. R., K. Schooley, et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." *Immunity* **3**(6): 673-82.
- Wojciechowski, J., M. Horky, et al. (2003). "Rapid onset of nucleolar disintegration preceding cell cycle arrest in roscovitine-induced apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells." *Int J Cancer* **106**(4): 486-95.
- Wolf, B. B. and D. R. Green (1999). "Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases." *J Biol Chem* **274**(29): 20049-52.
- Woo, M., A. Hakem, et al. (1999). "In vivo evidence that caspase-3 is required for Fas-mediated apoptosis of hepatocytes." *J Immunol* **163**(9): 4909-16.
- Wyllie, A. H. (1980). "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation." *Nature* **284**(5756): 555-6.
- Xing, C. and W. Imagawa (1999). "Altered MAP kinase (ERK1,2) regulation in primary cultures of mammary tumor cells: elevated basal activity and sustained response to EGF." *Carcinogenesis* **20**(7): 1201-8.
- Yakisich, J. S., A. Siden, et al. (1998). "Early inhibition of DNA synthesis in the developing rat cerebral cortex by the purine analogues olomoucine and roscovitine." *Biochem Biophys Res Commun* **243**(3): 674-7.

- Yamaguchi, H. and H. G. Wang (2002). "Bcl-XL protects BimEL-induced Bax conformational change and cytochrome C release independent of interacting with Bax or BimEL." *J Biol Chem* **277**(44): 41604-12.
- Yamamoto, K., H. Ichijo, et al. (1999). "BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M." *Mol Cell Biol* **19**(12): 8469-78.
- Yang, Y., S. Fang, et al. (2000). "Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli." *Science* **288**(5467): 874-7.
- Yeh, J. H., S. C. Hsu, et al. (1998). "Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression." *J Exp Med* **188**(10): 1795-802.
- Yeh, W. C., A. Itie, et al. (2000). "Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development." *Immunity* **12**(6): 633-42.
- Yin, X. M., K. Wang, et al. (1999). "Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis." *Nature* **400**(6747): 886-91.
- Yu, D., T. Jing, et al. (1998). "Overexpression of ErbB2 blocks Taxol-induced apoptosis by upregulation of p21Cip1, which inhibits p34Cdc2 kinase." *Mol Cell* **2**(5): 581-91.
- Yuan, X. J. and Y. E. Whang (2002). "PTEN sensitizes prostate cancer cells to death receptor-mediated and drug-induced apoptosis through a FADD-dependent pathway." *Oncogene* **21**(2): 319-27.
- Zamzami, N. and G. Kroemer (2001). "The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(1): 67-71.
- Zelent, A., K. Petrie, et al. (2005). "Molecular target-based treatment of human cancer: summary of the 10th international conference on differentiation therapy." *Cancer Res* **65**(4): 1117-23.
- Zha, J., S. Weiler, et al. (2000). "Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis." *Science* **290**(5497): 1761-5.
- Zhang, X., T. G. Jin, et al. (2004). "Persistent c-FLIP(L) expression is necessary and sufficient to maintain resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in prostate cancer." *Cancer Res* **64**(19): 7086-91.
- Zhang, X. D., J. M. Borrow, et al. (2003). "Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria." *Oncogene* **22**(19): 2869-81.
- Zinkel, S. S., C. C. Ong, et al. (2003). "Proapoptotic BID is required for myeloid homeostasis and tumor suppression." *Genes Dev* **17**(2): 229-39.
- Zong, W. X., T. Lindsten, et al. (2001). "BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak." *Genes Dev* **15**(12): 1481-6.