



Departamento de Radiología y Medicina Física  
Laboratorio de Investigaciones Médicas  
y Biología Tumoral  
Hospital Clínico Universitario  
Universidad de Granada



Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra"  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Granada

## **TESIS DOCTORAL**

---

# **PAPEL DE PARP-1 EN PROCESOS DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON EL ANTINEOPLÁSICO DOXORRUBICINA**

---

**JOSÉ ANTONIO MUÑOZ GÁMEZ**

**GRANADA, MAYO DE 2006**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: José Antonio Muñoz Gámez  
D.L.: Gr. 1223 - 2006  
ISBN: 978-84-338-4011-0

# **PAPEL DE PARP-1 EN PROCESOS DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON EL ANTINEOPLÁSICO DOXORRUBICINA**

---

Tesis Doctoral presentada por **JOSÉ ANTONIO MUÑOZ GÁMEZ**, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada

## Directores de tesis:

Dr. FRANCISCO JAVIER OLIVER POZO, Científico Titular del Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra", Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Dr. JOSÉ MARIANO RUIZ DE ALMODÓVAR RIVERA, Catedrático del Departamento de Radiología y Medicina Física y Director del Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa (IBIMER) de la Universidad de Granada.



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada por el doctorando José Antonio Muñoz Gámez en el Laboratorio de Investigaciones Médicas y Biología Tumoral del Hospital Clínico Universitario San Cecilio, y en el Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), y concluida el 5 de Mayo de 2006.

Fdo. José Antonio Muñoz Gámez



## **AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS**

---

FRANCISCO JAVIER OLIVER POZO, CIENTÍFICO TITULAR DEL CSIC, Y  
JOSÉ MARIANO RUIZ DE ALMODÓVAR RIVERA, CATEDRÁTICO DE LA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA, DEPARTAMENTO DE RADIOLOGÍA Y  
MEDICINA FÍSICA

CERTIFICAN: Que la presente Tesis, titulada "PAPEL DE PARP-1 EN PROCESOS DE MUERTE CELULAR INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO CON EL ANTINEOPLÁSICO DOXORRUBICINA", de la que es autor el Ldo. D. JOSÉ ANTONIO MUÑOZ GÁMEZ, bajo el Programa de Doctorado "Avances clínicos y desarrollo tecnológico en Radiología, Medicina Física y Física Médica" del departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada, ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Investigaciones Médicas y Biología Tumoral del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada y en el Instituto de Parasitología y Biomedicina "Lopez-Neyra" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Revisado el presente trabajo, los directores consideran que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto, por lo que:

AUTORIZAN la presentación de la presente Tesis para su defensa y obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expedimos la presente certificación en Granada a 5 de mayo de dos mil seis.

Francisco Javier Oliver Pozo

José Mariano Ruiz de Almodóvar Rivera



A mi padre José Antonio  
A mi madre Consuelo  
A mi Laura y  
a mi hermanita Yolanda



## AGRADECIMIENTOS

---

A mis directores de Tesis, el Dr. Francisco Javier Oliver Pozo y el Dr. José Mariano Ruiz de Almodóvar Rivera les agradezco que me dieran la oportunidad de realizar este proyecto. Es mi obligación reconocer el constante apoyo, búsqueda de ideas y de financiación que ha culminado en la realización de la presente Tesis Doctoral. Asimismo he de agradecer el buen trato personal, sus sabios consejos y su generosidad que han facilitado el desarrollo de este trabajo, especialmente en los momentos difíciles que todo proceso de investigación conlleva.

A la Profesora María Isabel Núñez Torres por su apoyo, consejo y ayuda prestada durante el periodo realización de esta Tesis Doctoral. Gracias por su gran calidad humana, generosidad y amistad.

A mis compañeros de laboratorio, Francisco David Martín Oliva, Rocío Aguilar Quesada, Gustavo Ortiz Ferrón, Rosa Quiles, Rubén Romero por hacer de esta etapa un momento inolvidable. Gracias por vuestra amistad, por esas maravillosas excursiones y fiestas que hemos hecho y que seguiremos realizando. Gracias por aguantarme, estar a mi lado y dar apoyo en los momentos delicados y por haber formado durante estos años con vuestra amistad una gran familia en el trabajo y fuera de el.

Al Dr. Abelardo López Rivas, a María del Carmen Ruiz Ruiz y a todo su grupo, gracias por los seminarios conjuntos en el López-Neyra y en Sevilla tras su traslado, por todas las discusiones y sugerencias surgidas de los mismos, siempre interesantes. Asimismo, debo de agradecer el haberme permitido la realización de estancias en su laboratorio con el objetivo del aprendizaje de la realización las técnicas de siRNA.

A “las niñas del Mora Lara”, Concepción Fernández España, Concepción Fernández Guerrero y Francisca Aguilar Torres, personal técnico del laboratorio de Investigaciones Médicas del Hospital Clínico San Cecilio, por su ayuda y buenos momentos vividos durante todo el tiempo.

A todos los becarios y personal del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (CSIC) que han hecho que mi estancia en el sea una experiencia agradable e inolvidable, tanto a nivel científico como personal y por el trato amable recibido.

A los Doctores Gilbert de Murcia y Jossiane Menissier-de Murcia, les quiero agradecer la ayuda experimental que me prestaron durante las estancias que realicé en su laboratorio (UPR 9003 du CNRS, Ecole de Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Strasbourg, France) para llevar a cabo parte de los experimentos de esta Tesis Doctoral.

Gracias a la "Fundación Hospital Clínico" del Hospital Universitario San Cecilio de Granada por haberme facilitado la realización de esta Tesis Doctoral.

Mi más profundo agradecimiento a mi pareja Laura, gracias por haberme comprendido y apoyado durante el periodo de redacción de este manuscrito. Siento el haberte privado de más momentos de esparcimiento, pero no te preocupes, serás recompensada con creces a partir del 7 de julio, fecha de lectura de esta Tesis. Muchas gracias por hacerme feliz en todos estos años.

A mis padres, José Antonio Muñoz Cobo y Consuelo Gámez Martínez por hacerme sentir alguien especial, por todo su cariño y continuo apoyo. Por creer siempre en mí y por facilitarme el desarrollo de los estudios que han culminado en la realización de esta Tesis Doctoral. Gracias por ser el modelo en el que reflejarme y aprender, gracias por ser como sois. También quiero hacer participe de este agradecimiento a mi hermanita Yolanda, mi Yiyi, a mi sobrinita Paula que hoy cumple un año y a mi cuñado Nicolás. No quiero olvidarme de mi abuelo Manuel y de mi abuela Josefa, que hoy ya no se encuentran entre nosotros por haberme querido tanto.

Y por último, agradecer a la Junta de Andalucía y al Fondo de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III), por la ayuda económica recibida durante los años 2001-2006, dentro de las Becas Iniciación a la Investigación (Junta de Andalucía) y las de Formación en Investigación (BEFI, Ministerio de Sanidad y Consumo).

Este trabajo de tesis ha sido posible gracias a la financiación recibida de los siguientes proyectos de investigación:

- “Oncología Experimental: La enzima PARP como diana antitumoral y como marcador de la agresividad de las neoplasias”. Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), proyecto 00/0948.
- “Nuevas funciones de la Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa-1 en la señalización y en el control de la respuesta celular durante el daño genotóxico. Entidad financiadota: CICYT-SAF: 2003-01217.
- “Interacción entre PARP y ATM en la respuesta a daños genotóxicos”. Entidad financiadora: Programa de Acciones Integradas Hispano-Francesa. Dirección General de Investigación Científica y Técnica. Referencia: HF01/67Investigador responsable: Gilbert de Murcia, Francisco Javier Oliver, José Mariano Ruiz de Almodóvar.
- “Mecanismos humorales y celulares implicados en las artritis”, Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigaciones Sanitarias. Redes de grupos temáticas. Ref. G03/152. Investigador responsable: Responsable del Grupo PARP-1 e Inflamación, Aspectos Básicos: Francisco Javier Oliver Pozo.
- “Posibilidades de diagnóstico e individualización terapéutica basadas en el conocimiento y la modulación de estado de metilación del ADN”. Entidad financiadora: CICYT SAF 2004-00889. Investigador responsable: José Mariano Ruiz de Almodóvar Rivera.



## **ÍNDICE**



<b>INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>1.-POLI (ADP-RIBOSA) POLIMERASA 1.....</b>	<b>5</b>
1.1.- FAMILIA PARP .....	5
1.1.1.- ESTRUCTURA DE LA PARP-1 .....	8
1.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP-1.....	10
1.3.- SUSTRATOS DE POLI (ADP-RIBOSILACIÓN) .....	12
1.4.- FUNCIONES DE PARP-1 .....	14
<b>2.- ESTRATEGIAS EN EL ESTUDIO DE PARP-1 .....</b>	<b>19</b>
2.1.- OBTENCIÓN DE RATONES DEFICIENTES EN PARP-1 .....	19
2.2.- DESARROLLO DE INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE PARP .....	20
<b>3.- PROCESOS DE MUERTE CELULAR .....</b>	<b>25</b>
3.1.- MUERTE CELULAR PROGRAMADA .....	25
3.1.1.- APOPTOSIS .....	26
3.1.1.2.- RUTA MITOCONDRIAL O INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS .....	30
3.1.1.3.- APOPTOSIS, P53 Y SENSIBILIDAD A LOS AGENTES ANTITUMORALES .....	33
3.1.2.- PARAPOTOSIS .....	35
3.1.3.- CATÁSTROFE MITÓTICA .....	36
3.1.4.- MUERTE CELULAR MEDIADA POR AIF .....	36
3.1.5.- MUERTE CELULAR PROGRAMADA TIPO II O AUTOFAGIA .....	38
3.1.5.1.- CARACTERÍSTICAS DE LA MUERTE CELULAR AUTOFAGICA .....	39
3.1.5.2.- LA MAQUINARIA BÁSICA DE LA AUTOFAGIA .....	41
3.1.5.3.- RELACIÓN ENTRE AUTOFAGIA Y APOPTOSIS .....	45
3.1.5.4.- AUTOFAGIA Y CÁNCER .....	47
3.1.5.5.- MUERTE CELULAR POR AUTOFAGIA INDUCIDA POR AGENTES ANTINEOPLÁSICOS .....	49
3.2.- MUERTE CELULAR POR NECROSIS O NO PROGRAMADA.....	50
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>53</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.....</b>	<b>75</b>

<b>CAPÍTULO I: LA INHIBICIÓN DE PARP-1 SENSIBILIZA A LAS CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA DEFICIENTES EN P53 A APOPTOSIS INDUCIDA POR DOXORRUBICINA .....</b>	<b>81</b>
<b>1.1.- RESUMEN.....</b>	<b>83</b>
<b>1.2.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>85</b>
<b>1.3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>88</b>
1.3.1.- CULTIVOS CELULARES .....	88
1.3.2.- REACTIVOS Y TRATAMIENTOS CELULARES.....	88
1.3.3.- ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR Y APOPTOSIS.....	89
1.3.4.- ENSAYOS DE FORMACIÓN DE COLONIAS .....	90
1.3.5.- TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA .....	90
1.3.6.- INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTH .....	91
1.3.7.- DETECCIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL .....	92
1.3.8.- OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS NUCLEARES .....	93
1.3.9.- MEDIDAS DE LA ACTIVACIÓN DE NF-KB MEDIANTE GELES DE RETARDO O BAND-SHIFT .....	94
1.3.10.- DETERMINACIÓN DE ROTURAS EN EL ADN MEDIANTE ENSAYO COMETA .....	95
<b>1.4.- RESULTADOS.....</b>	<b>97</b>
1.4.1.- EL TRATAMIENTO CON DOXORRUBICINA INDUCE LA ACTIVACIÓN DE PARP-1 .....	97
1.4.2.- EL TRATAMIENTO COMBINADO DE DOXORRUBICINA Y ANI POTENCIA LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES Y NO EN LÍNEAS CELULARES NO TUMORALES .....	97
1.4.3.- EL EFECTO POTENCIADOR QUE EJERCE ANI NO ES A TRAVÉS DE LA INACTIVACIÓN DE NF-KB .....	105
1.4.4.- EL EFECTO POTENCIADOR QUE EJERCE ANI PUEDE SER DEBIDO A DEFECTOS EN LA REPARACIÓN DE DAÑOS EN EL ADN Y ACUMULACIÓN DE LOS MISMOS.....	106
<b>1.5.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>107</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>113</b>

<b>CAPÍTULO II: LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR DOXORRUBICINA PRESENTA CARACTERÍSTICAS DE LA MUERTE CELULAR AUTOFÁGICA Y ES DEPENDIENTE DE PARP-1 .....</b>	<b>121</b>
<b>2.1.- RESUMEN.....</b>	<b>123</b>
<b>2.2.- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>125</b>
<b>2.3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>129</b>
2.3.1.- CULTIVOS CELULARES .....	129
2.3.2.- GENOTIPAJE DE LAS LÍNEAS CELULARES .....	129
2.3.3.- TRATAMIENTOS CELULARES .....	130
2.3.4.- MEDIDAS DE LA MUERTE CELULAR.....	131
2.3.5.- ANÁLISIS DE LA MUERTE CELULAR POR NECROSIS.....	132
2.3.6.- ENSAYOS DE FORMACIÓN DE COLONIAS .....	133
2.3.7.- TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA .....	133
2.3.8.- INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTH .....	134
2.3.9.- DETECCIÓN DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL .....	135
2.3.10.- MEDIDA DE LOS NIVELES CELULARES DE NAD <sup>+</sup> .....	135
2.3.11.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO CELULAR DE ATP .....	136
2.3.12.- DETERMINACIÓN DE ROTURAS EN EL ADN MEDIANTE ENSAYO COMETA .....	137
2.3.13.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA .....	138
2.3.14.- TRANSFECCIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN LC3-GFP Y ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE SU LOCALIZACIÓN INTRACELULAR.....	138
2.3.15.- REACCIÓN DE TRASCRIPCIÓN INVERSA .....	139
2.3.16.- REACCIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL .....	140
<b>2.4.- RESULTADOS.....</b>	<b>143</b>
2.4.1.- GENOTIPAJE DE LAS LÍNEAS CELULARES DE FIBROBLASTOS DERIVADAS DE RATONES <i>PARP-1<sup>+/+</sup></i> Y <i>PARP-1<sup>-/-</sup></i> MEDIANTE PCR .....	143
2.4.2.- EL TRATAMIENTO CON DOXORRUBICINA INDUCE LA ACTIVACIÓN DE PARP-1 .....	144
2.4.3.- LA POTENCIACIÓN O PREVENCIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIADA POR PARP-1 DEPENDE DE LA DOSIS DE DOXORRUBICINA UTILIZADA.....	148
2.4.4.- DOXORRUBICINA (5 µG/ML) PRODUCE UN ALTO CONSUMO DE NAD <sup>+</sup> Y ATP .....	151
2.4.5.- DOXORRUBICINA NO INDUCE MUERTE CELULAR POR NECROSIS .....	154
2.4.6.- ESTUDIO DE LOS EVENTOS MITOCONDRIALES TRAS EL TRATAMIENTO CON DOXORRUBICINA.....	155

2.4.7.- ¿EJERCE SU ACCIÓN DOXORRUBICINA A TRAVÉS DE LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO? .....	157
2.4.8.- ESTUDIO DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN LOS PROCESOS DE MUERTE GENERADOS POR DOXORRUBICINA .....	158
2.4.9.- LA MUERTE CELULAR EJERCIDA POR DOXORRUBICINA POSEE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA MUERTE CELULAR AUTOFÁGICA O MUERTE CELULAR PROGRAMADA TIPO II .....	159
2.4.10.- DOXORRUBICINA PRODUCE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE GENES PRO-AUTOFÁGICOS EN LAS CÉLULAS 3T3 MEF <i>PARP-1</i> <sup>+/+</sup> .....	163
2.4.11.- IMPLICACIÓN DE MTOR EN LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR DOXORRUBICINA .....	166
<b>2.5.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>169</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>177</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>187</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>191</b>
<b>PUBLICACIONES CIENTÍFICAS.....</b>	<b>197</b>
<b>COMUNICACIONES A CONGRESOS.....</b>	<b>245</b>

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**



**RESUMEN**

El presente trabajo de tesis doctoral se centra en el estudio de la proteína de reparación de daños en el ADN, PARP-1 y su implicación en la potenciación de los procesos de muerte celular apoptótica ejercida por el agente antitumoral doxorrubicina. Las investigaciones se han realizado sobre líneas celulares tumorales establecidas de cáncer de mama que muestran cierto grado de resistencia tanto a la radioterapia como a la quimioterapia y sobre líneas celulares de fibroblastos murinos inmortalizados deficientes en la proteína PARP-1.

Nuestros resultados revelan la relación entre el nivel de activación de PARP-1 tras daño generado en el ADN y la ejecución de distintos procesos de muerte celular. Así, daños moderados o reducidos en el genoma, la activación de PARP-1 promueve supervivencia celular mediante la activación de los procesos de reparación de daños en el ADN y su inactivación con inhibidores químicos sensibiliza a las células frente al tratamiento con el agente quimioterapéutico doxorrubicina. Además, nuestros resultados sugieren una novedosa e importante implicación de PARP-1 en la regulación de la autofagia o muerte celular programada tipo II tras daños moderadamente elevados en el ADN. La autofagia se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas como el parkinson, la enfermedad de Huntington y el Alzheimer. Los mecanismos que conducen o regulan la autofagia están siendo objeto de numerosas investigaciones y de estudio por parte de la comunidad científica y a nosotras nos parecen de especial interés por su implicación en carcinogénesis y por que la intervención farmacológica sobre ellos puede conducir a una mejora de los efectos de los agentes antitumorales clásicamente empleados en oncología.



## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **1.-POLI (ADP-RIBOSA) POLIMERASA 1**

La Poli(ADP-Ribosa) Polimerasa-1 (PARP-1; EC2.4.2.30) [también conocida como poli(ADP-ribosa) sintetasa y poli(ADP-ribosa) transferasa] es una enzima nuclear altamente expresada, presente en células eucariotas que fue por primera vez descrita hace más de 40 años por Chambon y colaboradores (Chambon et al. 1963). Esta proteína cataliza la transferencia de monómeros de ADP-ribosa obtenidos del sustrato NAD<sup>+</sup>, sobre los grupos carboxílicos de los aminoácidos glutámico y aspártico (Suzuki et al. 1986) de una serie de proteínas nucleares de las que trataré en profundidad en apartados posteriores. PARP-1 es una proteína de reconocimiento del daño en el ADN que participa activamente en los procesos de reparación de daños de cadena simple y doble. PARP-1 se activa principalmente en respuesta a daños en el ADN inducidos por diferentes agentes genotóxicos, aunque recientemente han sido descritos otros estímulos diferentes, como ciertos procesos infecciosos, estrés y hormonas derivadas de esteroides, como activadores de la enzima en lugares muy específicos de los cromosomas (Gordon-Shaag et al. 2003; Tulin and Spradling 2003). La modificación transitoria de proteínas nucleares por poli-ADP-ribosilación, constituye un tipo de modificación post-traduccional necesaria para la activación así como desactivación de una serie de procesos celulares que describiré con más puntualización en el apartado 1.4.

#### **1.1.- FAMILIA PARP**

Hasta la fecha, han sido identificadas 18 enzimas que presentan homología de secuencia con el dominio catalítico de PARP-1, si bien, sólo se conocen las propiedades enzimáticas y bioquímicas de algunos de los miembros de la familia [figura 1 (A)]. La proteína PARP-1 es el fundador y principal miembro de esta familia y se le han atribuido múltiples funciones (descritas en el apartado 1.4).

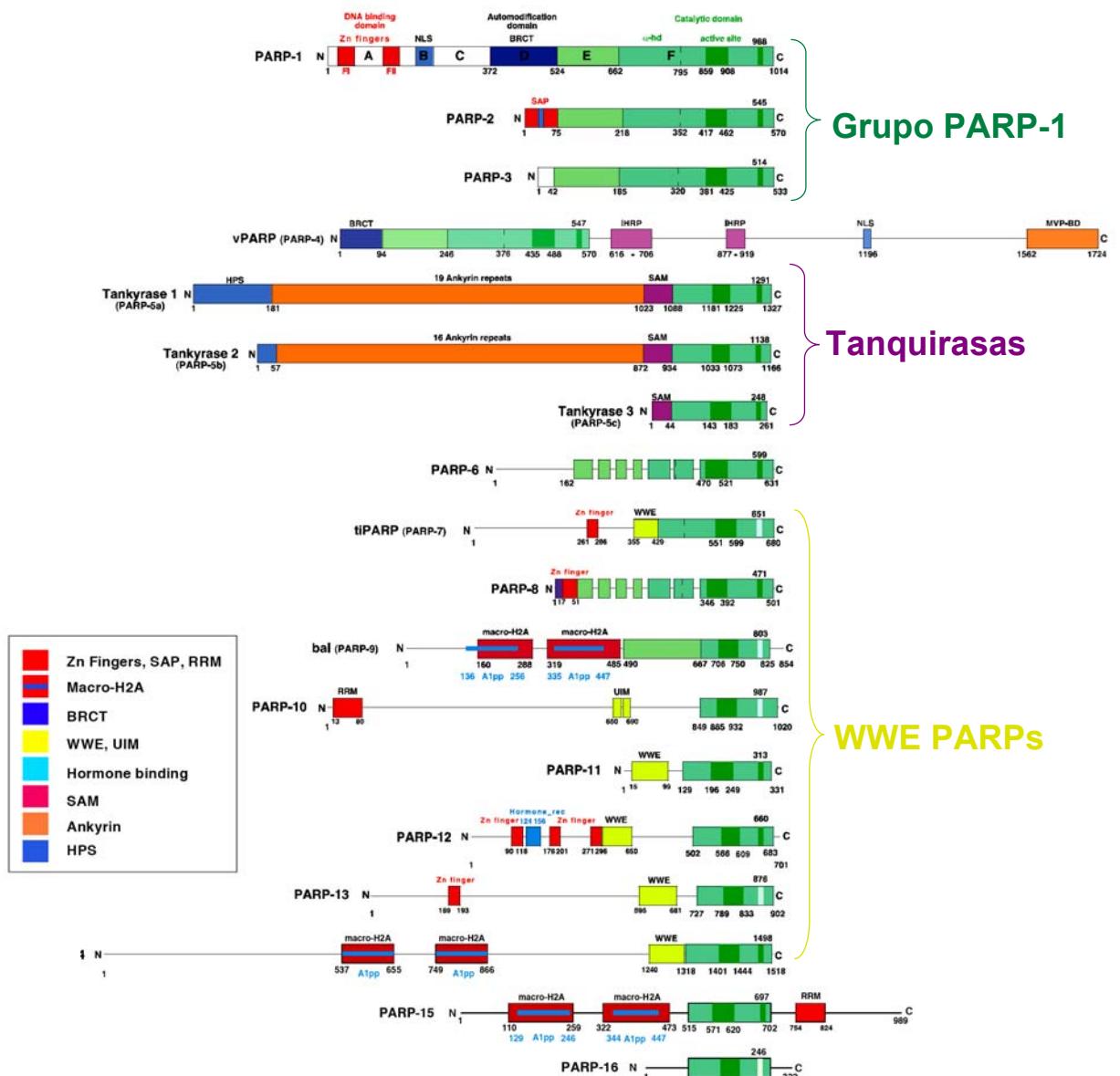
La proteína PARP-2 se descubrió como resultado de la presencia de una actividad de poli (ADP-ribosilación) residual tras daño en el ADN en fibroblastos embrionarios derivados de ratones deficientes en PARP-1

(Shieh et al. 1998; Ame et al. 1999). El dominio catalítico de la proteína PARP-2 posee una gran semejanza con el de PARP-1, presentando un 69% de homología. No obstante, contiene algunas diferencias en el dominio de modificación, que se traduce en diferencias en las proteínas con las cuales se asocia. Otras diferencias conocidas entre ambas proteínas están presentes a nivel del dominio de unión al ADN, que conlleva a la detección de diferentes daños en el ADN (Ame et al. 2004). PARP-2 actúa como un modificador de la estructura de la cromatina e interacciona con PARP-1 en los procesos de reparación mediados por BER (sistema de reparación por escisión de bases) y SSBR (sistema de reparación de roturas simples de cadena). PARP-1 y PARP-2 también interactúan con proteínas implicadas en la estructura del cinetocoro y en el punto de control del uso mitótico (mitotic spindle checkpoint). La implicación de PARP-2 en la respuesta celular tras daño en el ADN ha sido investigada en ratones deficientes en esta proteína. Las células PARP-2<sup>-/-</sup> muestran defectos en la reparación de daños en el ADN, confirmando su implicación en los sistemas de reparación a pesar de su reducida capacidad de sintetizar PAR. Además, los ratones deficientes en esta proteína muestran un fenotípico específico, lo que nos indica que las funciones de PARP-1 y PARP-2 son complementarias y no están completamente solapadas. No ha sido posible la creación de ratones deficientes para estas dos proteínas al mismo tiempo, lo que sugiere la gran importancia de ambas en el mantenimiento de la integridad genómica durante el desarrollo embrionario.

La proteína PARP-3 está asociada con el centrosoma. La actividad de esta proteína es apenas detectable. PARP-3 interacciona con PARP-1 en el centrosoma lo que sugiere una relación entre los mecanismos de supervivencia a través de la reparación de daños en el ADN y los puntos de control de la fidelidad mitótica (Kanai et al. 2003).

La proteína VPARP es la más grande de la familia con un tamaño de 192,6 KDa. Esta proteína está asociada con proteínas “vault” (bóveda), su función no está bien definida, pero se cree que participan en el transporte celular y pueden estar asociadas a la resistencia a drogas en algunas líneas celulares (Kickhoefer et al. 1999; Scheffer et al. 2000; Liu et al. 2004b). Además, se ha descrito que esta proteína está localizada en los poros nucleares y asociada al huso mitótico durante la mitosis.

Las tanquirasas 1 y 2 están asociadas con las proteínas teloméricas (Smith et al. 1998; Cook et al. 2002; Sbodio et al. 2002). Estas dos proteínas tienen un alto grado de homología (superior al 85%) y sólo difieren en el motivo HPS. Las tanquirasas 1 y 2



**Figura 1.- (A) Estructura en dominios de los miembros de la superfamilia PARP.** La caracterización de la familia de proteínas PARP se ha realizado en base a una búsqueda exhaustiva en la base de datos del NCBI usando el dominio catalítico de la PARP-1 como motor de búsqueda. Se representan con recuadros coloreados los dominios más característicos localizados en los diferentes miembros de la familia. La gran diversidad de dominios presentes en las proteínas de la familia PARP sugiere la implicación de estas proteínas en una gran variedad de procesos celulares. Figura adaptada de (Ame et al. 2004).

interaccionan con las mismas proteínas (TRF1, IRAP, Glut4, etc.) y posiblemente tengan funciones que se solapan en la homeostasis del telómero y en tráfico de vesículas (en concreto en el transporte de glucosa) (Smith and de Lange 2000; Chang et al. 2005; Seimiya 2006). Estas proteínas presentan múltiples localizaciones subcelulares, telómeros, poros nucleares, en las vesículas del Golgi, etc.

La función de la PARP-7 no está muy clara, se cree que participa en la modificación por PAR de ciertas histonas y que puede estar implicada en la función de los linfocitos T (Ma 2002; Katoh and Katoh 2003).

Los inhibidores de PARP presentan el problema de no ser específicos para cada una de estas proteínas y su empleo produce la inhibición de todos los miembros de la familia. Esto se debe a que presentan una alta homología en su dominio catalítico, blanco de la acción de los inhibidores químicos de la actividad de PARP. No obstante, las proteínas PARP-1 y PARP-2 son los únicos miembros de la familia implicadas en la reparación del daño en el ADN y su inhibición es la responsable de la sensibilización frente a la terapia antitumoral de agentes genotóxicos.

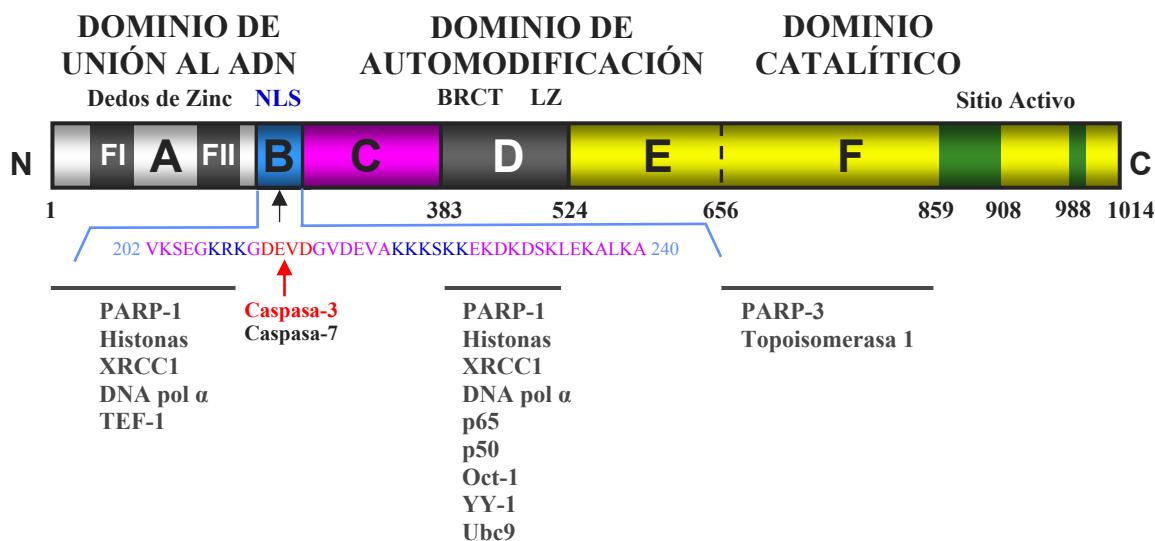
### 1.1.1.- ESTRUCTURA DE LA PARP-1

PARP-1 es una proteína de 113-kDa, altamente conservada en la escala filogenética (aunque no existen evidencias de su presencia en levaduras), formada por seis dominios estructurales [figura 1 (B)], de los cuales sólo cuatro están perfectamente descritos funcionalmente.

1. El **dominio A**, dominio de unión al ADN (DBD, *DNA Binding Domain*) de 46-kDa que se localiza en el extremo N-terminal. Este dominio presenta dos estructuras en dedos de zinc (denominadas FI y FII), mediante las cuales se produce la interacción de PARP-1 con el ADN estimulando la actividad catalítica del enzima (Lindahl et al. 1995; Caldecott et al. 1996).
2. El **dominio B**, donde se encuentra la secuencia de localización nuclear (NLS, *Nuclear Localization Sequence*), responsable del emplazamiento nuclear de PARP-1. Además, este dominio contiene la secuencia aminoacídica DEVD reconocida por las caspasas-3 y -7 y sobre la cual se realiza el corte proteolítico ejercido por estas enzimas en la muerte celular apoptosis. Este proceso es uno de los eventos más tempranos de la apoptosis y es utilizado como marcador de dicha muerte celular (Kaufmann et al. 1993; Lazebnik et al. 1994).
3. El **dominio D**, dominio de automodificación de 22-kDa. PARP-1 es el principal acceptor de polímero de ADP-ribosa (Kawaichi et al. 1981; Kreimeyer et al. 1984) y es en esta posición rica en residuos de glutamato donde se produce la

automodificación de PARP-1 por poli(ADP-ribosilación). Este cambio post-transduccional incide negativamente en la actividad del enzima por repulsión electrostática entre la proteína modificada y el ADN dañado (D'Amours et al. 1999). Otro motivo de gran importancia es el denominado cremallera de leucina (*Leucine zipper*), responsable de interacciones proteína-proteína en reacciones de homo- y/o heteromodificación. También incluye el motivo BRCT (*Breast cancer susceptibility protein, BRCA1, C-terminus*) responsable de la interacción con proteínas de respuesta a daños en el ADN [XRCC1, histonas y DNA Polimerasa  $\beta$  (Nash et al. 1997; Masson et al. 1998)] y con factores de transcripción [NF-Kb, Oct-1, Ying-Yang-1 (Nie et al. 1998; Griesenbeck et al. 1999)].

4. El **dominio F**, también conocido como dominio catalítico, de 46-kDa. Se localiza en el extremo C-terminal y es el responsable de la actividad de la enzima transformando residuos de NAD<sup>+</sup> en largos y ramificados polímeros de poli ADP-ribosa sobre proteínas nucleares aceptoras. Presenta una alta homología con otras mono-ADP-ribosil transferasas, con una estructura terciaria altamente conservada en las cuales se alternan estructuras de láminas  $\beta$  con hélices  $\alpha$  sobre las cuales se realiza la unión con el NAD<sup>+</sup>. Esta alta homología ha permitido definir la denominada “firma de PARP-1” mediante la cual se ha podido establecer una familia de proteínas PARP actualmente formada por 18 miembros (Ame et al. 2004). Aunque no se conoce la función biológica de muchos de los miembros de esta familia, si es posible sugerir que su existencia puede estar relacionada con un importante proceso de poli-ADP-ribosilación en múltiples funciones celulares.
5. Los **dominios C y E**, son los peor descritos hasta la fecha y carecen de una actividad biológica conocida. En el dominio C se localizan los motivos HTH (*Helix Turn Helix*), descritos como dominios de unión de proteínas al ADN. A través de estos motivos HTH se cree que PARP-1 puede interaccionar con el ADN no dañado, sin que por ello se produzca la activación catalítica de la proteína (D'Amours et al. 1999).

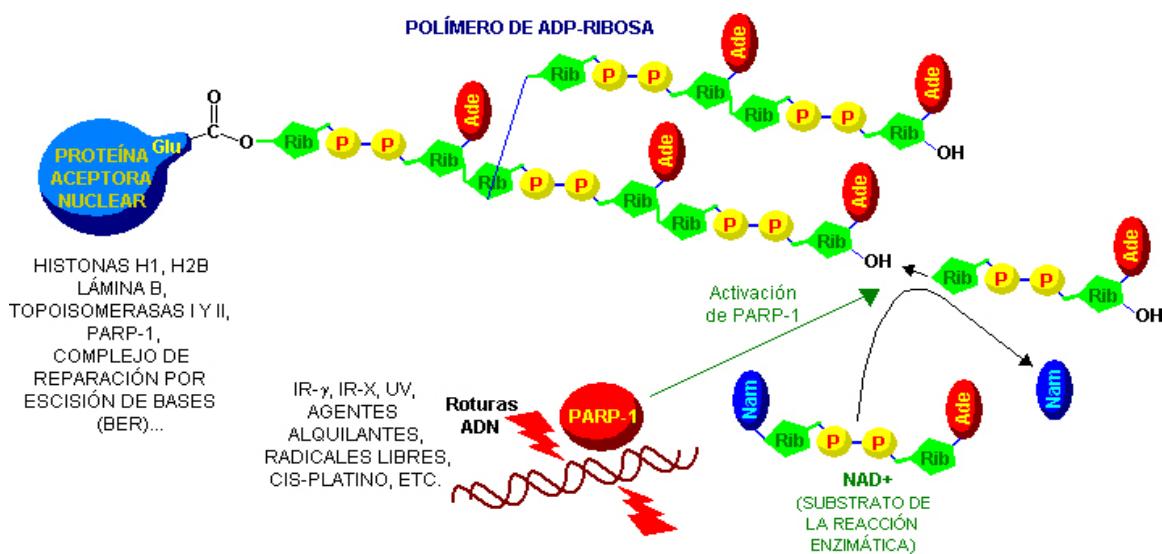


**Figura 1: (B) Dominios estructurales de PARP-1.** Dominio de unión al ADN (DBD); FI y FII, estructura en dedos de zinc; secuencia de localización nuclear (NLS); dominio de automodificación y dominio catalítico. Motivo BRCT (*BRCA1 like C-terminus*); lugar de corte de las caspasas-3 y -7; motivo cremallera de leucina (LZ, *Leucine zipper*). Además se indican los posibles sitios de interacción con otras proteínas.

## 1.2.- ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PARP-1

PARP-1 es una proteína de detección de daños en el ADN, que posee la capacidad de unirse tanto a roturas simples como a dobles de cadena, producidas por agentes genotóxicos como la radiación ionizante, los radicales libres, los inhibidores de la topoisomerasa I y II y los agentes alquilantes (figura 2). Asimismo, actúa como una proteína de señalización a los complejos de reparación del daño inducido en el ADN. Tras la detección del daño y su unión al mismo a través de las estructuras en dedos de zinc presentes en el dominio de unión al ADN, PARP-1 se activa y forma homodímeros principalmente a través de la estructura FII (segundo dedo de zinc) y cataliza la hidrólisis de  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ), en nicotinamida y monómeros de ADP-ribosa que posteriormente utilizará como sustrato para formar largos y ramificados polímeros de poli (ADP-ribosa) sobre residuos  $\gamma$ -carboxilo de ácido glutámico y ácido aspártico de determinadas proteínas nucleares mediante enlace tipo éster (figura 3) (de Murcia et al. 1994; Schreiber et al. 1994; Lindahl et al. 1995; Schreiber et al. 1995; Burkle 2000; Burkle 2001; Virag and Szabo 2002). El tamaño del polímero sintetizado varía desde unas pocas unidades hasta la unión de más de 200

monómeros unidos por enlaces O-glicosídicos de dos unidades de ribosa entre los carbonos 1''→2' formando de este modo la cadena lineal del polímero. Las ramificaciones sobre la cadena lineal se realizan mediante enlaces glicosídicos 2''→1'' entre dos unidades de ribosa.



**Figura 2: Mecanismo de activación de PARP-1 tras daño en el ADN.** Determinados agentes genotóxicos activan PARP-1. Se muestra el procedimiento de activación, síntesis de polímero a partir de  $\text{NAD}^+$  y la consiguiente modificación de determinadas proteínas nucleares.

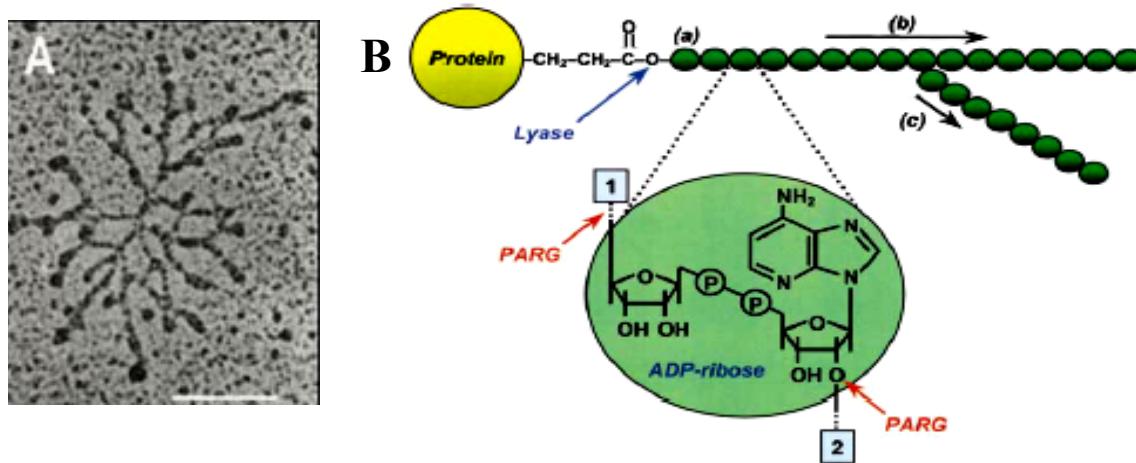
La proteína PARP-1 está dotada por lo tanto, de tres actividades enzimáticas diferentes, que le permiten la formación del polímero previamente descrito (Alvarez-Gonzalez et al. 1999):

1. Actividad de mono-ADP-ribosilación del sustrato, mediante la cual se produce el anclaje del primer monómero de ADP-ribosa al grupo carboxílico del sustrato mediante enlace tipo éster.
2. Actividad de elongación del polímero mediante la incorporación de las unidades de ADP-ribosa mediante enlace glicosídico  $\alpha\ 1''\rightarrow2'$ .
3. Actividad de ramificación, esta se produce de forma irregular con una pauta de una ramificación por cada 20-50 unidades de ADP-ribosa de la cadena principal, mediante enlace glicosídico  $2''\rightarrow1''$  (Alvarez-Gonzalez et al. 1999; Kraus and Lis 2003).

La poli ADP-ribosilación de proteínas es un proceso dinámico con una vida media del polímero inferior a un minuto (Whitacre et al. 1995). Dos enzimas son las responsables de este rápido catabolismo de la poli (ADP-ribosa) (figura 3). La

poli(ADP-ribosa) glicohidrolasa (PARG), está dotada de actividad exoglicosidasa y endoglicosidasa y actúa degradando el polímero tanto por los extremos como por el interior del mismo (D'Amours et al. 1999; Davidovic et al. 2001). La otra enzima responsable del catabolismo del polímero es la ADP-ribosil proteína liasa, encargada de la escisión del enlace éster entre la proteína modificada y el primer monómero de ADP-ribosa (D'Amours et al. 1999; Davidovic et al. 2001; Kraus and Lis 2003).

La poli ADP-ribosilación de proteínas ejercida por PARP-1 constituye un proceso rápido pero transitorio de modificación covalente de proteínas, que permite modificar su actividad biológica en un momento determinado.



**Figura 3: A) Imagen de la poli (ADP-ribosa).** Estructura ramificada del polímero de poli(ADP-ribosa) observada por microscopía electrónica (20.000x), (Gilbert de Murcia y colaboradores 1983). **B) Actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo de la poli (ADP-ribosa).** (a) Iniciación, (b) elongación y (c) ramificación, catalizadas por PARP-1; (d) actividad enzimática de PARPG; (e) actividad enzimática de la ADP-ribosa liasa. Figura adaptada de Graus y Lis (2003).

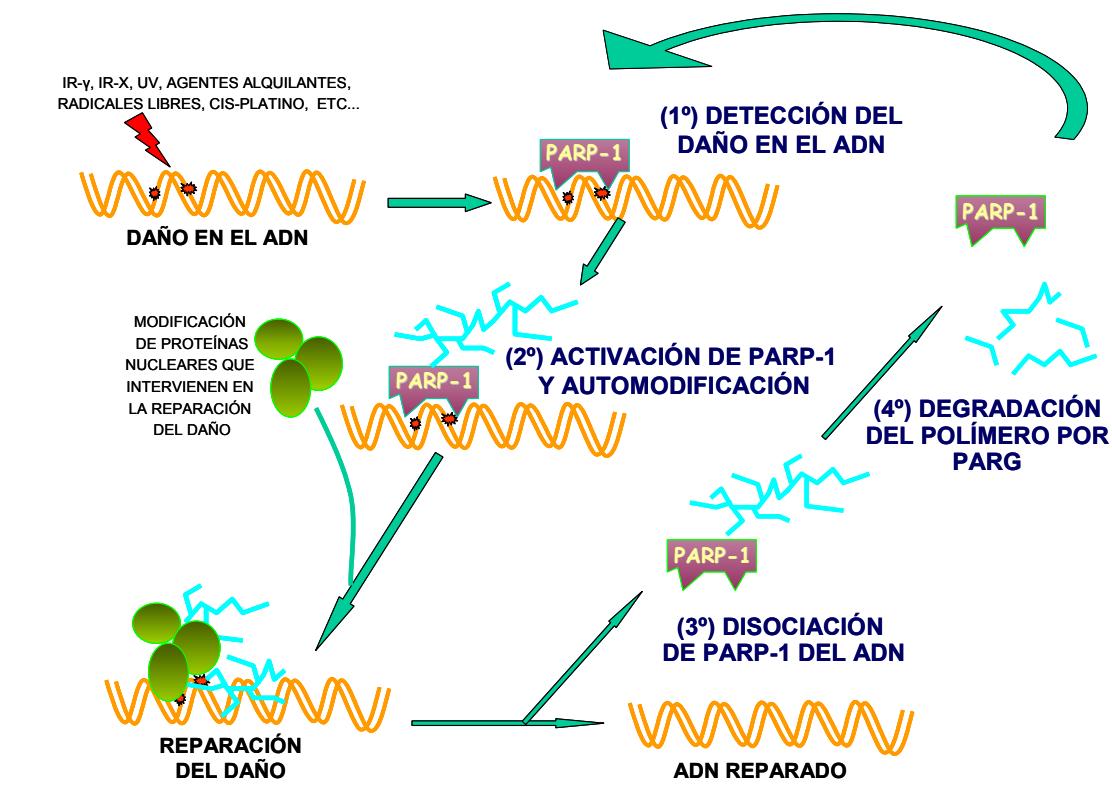
### 1.3.- SUSTRATOS DE POLI (ADP-RIBOSILACIÓN)

Tras la activación de PARP-1 se produce la modificación post-traduccional de una serie de proteínas nucleares implicadas en diversas funciones biológicas, si bien, esencialmente los principales aceptores son las proteínas implicadas en procesos de reparación del ADN (figura 2). En células sin daños en el ADN, los niveles constitutivos de polímero son relativamente bajos, sin embargo, tras la inducción del daño, la actividad del enzima se ve elevada considerablemente y los niveles de polímero aumentan entre 10 y 500 veces con respecto a su nivel basal.

In vivo, la proteína más abundantemente poli (ADP-ribosilada) es PARP-1. Esta proteína está sometida a un proceso de automodificación que regula su actividad enzimática y su unión al ADN. Han sido propuestos diferentes mecanismos para explicar la regulación de la actividad de PARP-1 ha sido explicada mediante diferentes mecanismos. El mejor caracterizado es el ***mecanismo de automodificación*** propuesto inicialmente por Kawaichi (Kawaichi et al., 1981), y posteriormente revisado por D'Amours (D'Amours et al., 1999) (figura 4). El modelo de activación-regulación de PARP-1 se basa en la transferencia de carga eléctrica sobre la proteína PARP-1 a través de los grupos fosfato presentes en el polímero. La presencia de esta carga neta negativa ejerce fuerzas de repulsión electrostática entre la proteína modificada y el ADN, lo que conlleva a su inactivación y a la separación de la unión de PARP-1 con el ADN. A continuación las proteínas encargadas del catabolismo del polímero (PARG y ADP-ribosil proteína liasa), proceden a su hidrólisis y permiten que la enzima PARP-1 esté de nuevo lista para posteriores ciclos de activación en respuesta a daños en el ADN.

Además de PARP-1 se han descrito numerosos aceptores de poli (ADP-ribosilación), entre los que podemos destacar a ***proteínas implicadas en la arquitectura de la cromatina*** como son las histonas y las proteínas HMG (*high mobility group*). Estas proteínas constituyen el principal conjunto de proteínas modificadas por poli (ADP-ribosilación) junto con la propia PARP-1 (Tanuma et al. 1985; Virag and Szabo 2002). La modificación de las histonas provoca repulsión electrostática entre el ADN y las mismas, a través de la carga eléctrica que le ha sido transferida por el polímero. Las fuerzas de repulsión originan una distensión de la cromatina en esa localización del ADN y permiten la entrada de los complejos de reparación en el caso de que la fuente de activación de PARP-1 sean daños producidos en el ADN. Además, se ha descrito la implicación de PARP-1 en transcripción génica; la modificación de las histonas y la distensión de estas regiones del ADN facilitan entrada de los complejos de transcripción convirtiendo dichas zonas en transcripcionalmente activas. Otros sustratos de poli (ADP-ribosilación) a destacar son determinados ***factores de transcripción, factores de replicación del ADN*** así como ***moléculas de señalización*** tales como NF-κB (Oliver et al. 1999), AP-2 (Kannan et al. 1999), Oct-1, YY1 (Oei et al. 1997), B-MYB (Cervellera and Sala 2000), DNA-dependent protein kinase (Ariumi et al. 1999), p53 (Mendoza-Alvarez and Alvarez-Gonzalez 2001; Wesierska-Gadek and Schmid 2001); topoisomerasa I, lamina B, y B23. Resulta muy interesante el hecho de que PARP-1 puede modificar la actividad biológica de estas proteínas por dos vías, a) por

modificación covalente por poli (ADP-ribosilación) mediante su actividad enzimática y/o b) por su interacción física mediante uniones no covalentes, modificando su actividad en diferentes procesos fisiológicos claves para el funcionamiento normal de la célula.



**Figura 4: Modelo de actuación y regulación de PARP-1** (1) PARP-1 detecta el daño y se une al mismo; (2) esta unión activa al enzima y se produce tanto su automodificación como la de otras proteínas aceptoras; (3) inactivación del enzima, separación del ADN y entrada del complejo de reparación; (4) rápida degradación del polímero por la PARG y el ciclo se ha completado, dejando libre a la PARP-1, lista para un nuevo ciclo de activación-regulación.

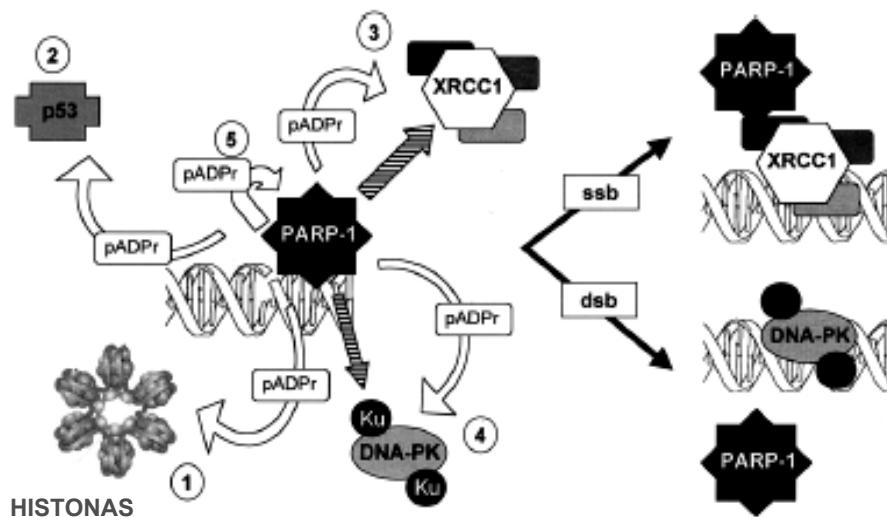
#### 1.4.- FUNCIONES DE PARP-1

El papel biológico de PARP-1 y de la poli (ADP-ribosilación) ha podido ser establecido mediante el estudio y el desarrollo de ratones deficientes en PARP-1, el establecimiento de líneas celulares deficientes en PARP-1 y el uso de inhibidores de esta proteína cada vez más específicos y potentes. Este papel es complejo e implica 4 funciones principales.

1.- PARP-1 participa activamente en los procesos de **reparación de determinados daños en el ADN y en el mantenimiento de la integridad genómica** a través de diversos medios (de Murcia et al. 1994; Schreiber et al. 1995; Chatterjee et al. 1999; Shall and de Murcia 2000). Numerosos trabajos demuestran la participación de PARP-1 en los procesos de reparación de daños de cadena simple a través de complejo de reparación por escisión de bases (BER, *Base Escisión Repair*) o mediante el sistema de reparación de daños de cadena simple (SSBR, *Single Strand Break Repair*) (Shall and de Murcia 2000). En estos sistemas PARP-1 participa en el reclutamiento y regulación funcional de las proteínas XRCC1, DNA-polimerasa β y DNA ligasa III que forman parte de estos complejos de reparación por modificación por poli (ADP-ribosilación) y por interacción directa proteína-proteína, formando de esta manera parte del complejo de reparación por escisión de bases (Figura 5) (Leppard et al. 2003; Ame et al. 2004). Además, PARP-1 también modula la reparación de daños de cadena doble a través de sistema de reparación no homologa, regulando el funcionamiento de la proteína de reparación DNA-PK mediante modificación post-transcripcional por poli (ADP-ribosilación) de esta proteína (figura 5) (Chalmers et al. 2004).

Otro mecanismo a resaltar, ya comentado en párrafos anteriores, es la capacidad de PARP-1 de modificar de forma transitoria mediante ADP-ribosilación, proteínas involucradas en la estructura de la cromatina, especialmente histonas y las proteínas HMG (*High Mobility Group*), produciendo alteraciones en la estructura de la cromatina en los lugares del ADN dañados facilitando la reparación (D'Amours et al. 1999).

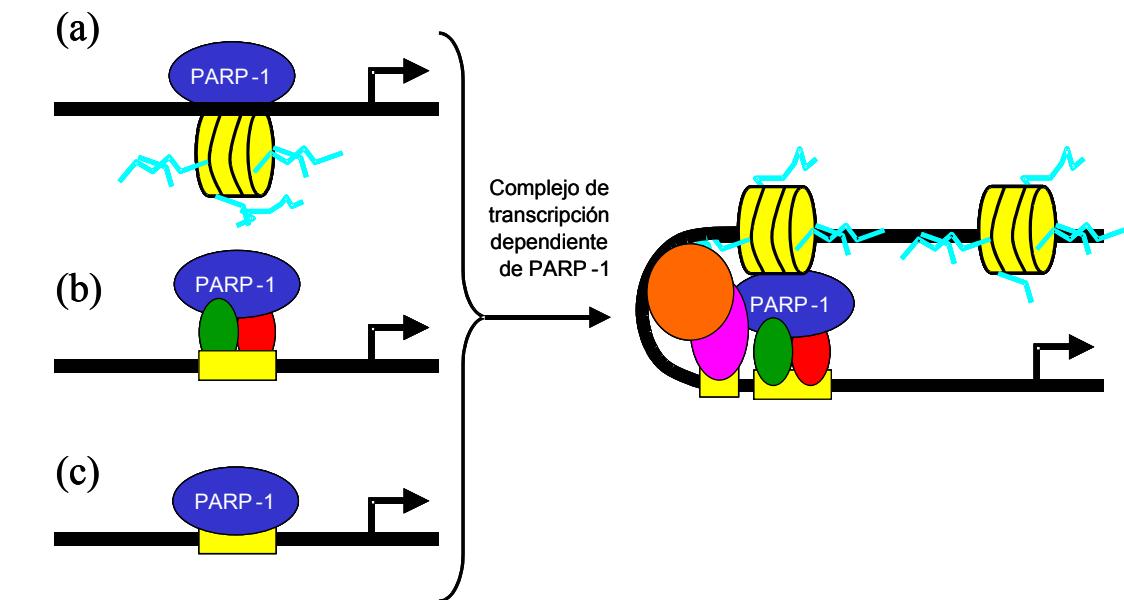
El papel de PARP-1 en el mantenimiento de la integridad genómica se ha puesto de manifiesto en numerosos trabajos en los cuales se ha observado que la deficiencia o inhibición de PARP-1 produce retrasos en el sistema de reparación por escisión de bases (BER) y una alta frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas, en modelos murinos y en líneas celulares expuestas a radiación ionizante o tratadas con agentes alquilantes (de Murcia et al. 1997).



**Figura 5: PARP-1 y reparación.** (1) PARP-1 modifica a las histonas y produce relajación de la cromatina en las zonas dañadas. (2) p53 es modificada por poli (ADP-ribosilación) en respuesta a daños en el ADN. (3) PARP-1 participa en BER (*Base Excisión Repair*), tanto por modificación de sus componentes como por interacción directa con los mismos. (4) Modificación de DNA-PK por el polímero como consecuencia de roturas dobles de cadena. (5) Automodificación de PARP-1 que implica perdida de afinidad por el ADN. Figura adaptada de Chalmers y colaboradores (2004).

2.- Recientemente se ha demostrado que **PARP-1 regula la transcripción génica**. PARP-1 tiene un efecto dual en la regulación de la transcripción, comportándose como un estimulador o como un represor de la misma (Simbulan-Rosenthal et al. 2000; Chiarugi 2002; Ha et al. 2002; Kraus and Lis 2003). De especial importancia es la regulación por PARP-1 de la producción de mediadores inflamatorios como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*) (Le Page et al. 1998; Szabo et al. 1998; Oliver et al. 1999), la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule*) (Zingarelli et al. 1998) y el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (Otsuka et al. 1991). NF-κB es el factor de transcripción responsable de la expresión de este conjunto de proteínas y ha sido descrito que PARP-1 actúa como coactivador transcripcional de NF-κB en estos procesos (Hassa and Hottiger 1999; Oliver et al. 1999; Kameoka et al. 2000; Chang and Alvarez-Gonzalez 2001; Hassa et al. 2001; Martin-Oliva et al. 2004). Hoy en día se conoce que PARP-1 puede regular la expresión proteica mediante tres procesos no excluyentes entre sí como son: i) la alteración de la estructura de la cromatina a través de la modificación de histonas y proteínas HMGs [Figura 6 (a)]; ii), actuando como coactivador o como correpresor a través de la interacción física con factores de transcripción (Figura 6 (b)) y iii),

uniéndose a secuencias reguladoras o promotoras de distintos genes (Figura 6 (c)) (Kraus and Lis 2003).



**Figura 6: Mecanismos de activación de la transcripción génica regulados por PARP-1.** Figura adaptada de (Kraus and Lis 2003).

3.- **PARP-1 regula la replicación.** Numerosos trabajos han puesto de manifiesto que durante la replicación del material genético el metabolismo de la poli-ADP-ribosa se encuentra acelerado en el núcleo celular (Tanuma et al. 1978; Kanai et al. 1981; Leduc et al. 1988; Bakondi et al. 2002). Otros indicios nos indican que PARP-1 forma parte del multicomplejo proteico encargado de la replicación (MRC, *Multiprotein Replication Complex*) (Simbulan-Rosenthal et al. 1996). En este sentido, se sabe que PARP-1 se co-purifica junto a las DNA polimerasas  $\alpha$  y  $\beta$ , DNA primasa, DNA helicasa, DNA ligasa, topoisomerasas I y II (Simbulan-Rosenthal et al. 1996; Dantzer et al. 1998; Bauer et al. 2001). Además se conoce que algunas de estas proteínas como las topoisomerasas I y II, y DNA polimerasa  $\alpha$  sufren, además, modificaciones por poli-ADP-ribosilación. Otro mecanismo por el cual PARP-1 puede regular estos procesos nucleares es por la poli(ADP-ribosilación) de histonas facilitando la inserción del complejo de replicación sobre el ADN (Boulikas 1990). Aunque todos estos estudios indican que PARP-1 interviene en replicación, el mecanismo por el cual PARP-1 participa en dicho proceso no se conoce aún con exactitud.

4.- **PARP-1 y muerte celular.** PARP-1 es uno de los primeros sustratos conocidos de las caspasas, las principales ejecutoras de la apoptosis (Kaufmann et al.

1993; Lazebnik et al. 1994; Germain et al. 1999). El motivo DEVD situado en el dominio de localización nuclear (NLS) (figura 1), es el responsable del reconocimiento y fragmentación de PARP-1 por las caspasas-3 y -7. Dicho corte genera los fragmentos de 89 y 24 KDa y separa el dominio de unión al ADN del dominio catalítico, inactivando a la enzima. Además, estos fragmentos contribuyen a la retro-inhibición de la enzima no proteolizada (intacta), impidiendo su homodimerización y su unión al ADN (Kim et al. 2000; D'Amours et al. 2001). Este proceso de proteólisis y retro-inhibición, facilita el adecuado funcionamiento de la maquinaria apoptótica, preservando la energía celular necesaria para la correcta ejecución de todos los procesos apoptóticos.

PARP-1 también ha sido relacionada con procesos de muerte celular no programada o muerte por necrosis. La necrosis a diferencia de la apoptosis es un proceso pasivo, caracterizado por la ruptura de la membrana plasmática de tal forma que el contenido celular escapa a los tejidos ocasionando una respuesta inflamatoria a su alrededor. La carga energética de una célula es determinante para que la muerte celular se produzca por apoptosis o por necrosis; de esta manera, una activación elevada de PARP-1 produce un alto consumo en NAD<sup>+</sup> y por lo tanto un gran consumo en ATP, lo que conduce a un colapso energético y a la muerte celular por necrosis. En este sentido PARP-1 ha sido descrita como un interruptor entre apoptosis y necrosis, a través de la modulación del contenido energético celular (Los et al. 2002; Virág and Szabó 2002).

Recientemente, se ha demostrado que PARP-1 juega un papel crucial en los procesos de muerte celular programada dependiente de AIF e independiente de caspasas (Yu et al. 2002; Wang et al. 2003; Yu et al. 2003). La formación del polímero resultante de la activación de PARP-1 inicia una señal nuclear que se propaga hasta la mitocondria, por mecanismos aún desconocidos. Esto produce la liberación de AIF de la mitocondria, que se dirige al núcleo, donde induce la condensación periférica de la cromatina y la fragmentación del ADN a gran escala.

Además hay que señalar la potenciación de los efectos citotóxicos de agentes antitumorales que basan su acción en la inducción de daños en el ADN, mediante el uso de inhibidores químicos de PARP-1. Este resultado se debe a defectos en los procesos de reparación tras el uso de inhibidores y nos presentan a PARP-1 como un potencial blanco de investigación frente al tratamiento antitumoral.

## 2.- ESTRATEGIAS EN EL ESTUDIO DE PARP-1

Durante los últimos años se han desarrollado estrategias que han permitido un mayor conocimiento de las funciones fisiológicas de PARP-1. Entre ellas nos encontramos el desarrollo de ratones deficientes en PARP-1, la obtención de líneas celulares carentes de la proteína PARP-1 y la generación de nuevos fármacos inhibidores de la actividad enzimática de poli (ADP-ribosilación) de PARP-1 cada vez más potentes y selectivos. Con estas herramientas se ha podido constatar la implicación de PARP-1 en los procesos de reparación del ADN, de señalización celular, de transcripción génica, en la muerte celular y en el desarrollo de procesos tisulares causantes de la inflamación (Banasik et al. 1992; Shall and de Murcia 2000; Virág 2005).

### 2.1.- OBTENCIÓN DE RATONES DEFICIENTES EN PARP-1

Se han generado tres líneas de ratones deficientes en PARP-1 por diferentes laboratorios y esto ha supuesto un gran avance en el estudio de la función biológica de esta proteína. Todos ellos se han generado mediante eliminación genética por recombinación homóloga de diferentes exones del gen de PARP-1 (tabla 1).

INVESTIGADOR/ANO	EXÓN
Wang y col. 1995	Exón 2
Menissier de Murcia y col. 1997	Exón 4
Masutani y col. 1999	Exón 1

**Tabla 1: Ratones deficientes en PARP-1.**

Los datos obtenidos con el estudio de estos ratones, nos muestran un fenotipo similar, con independencia del fondo genético del ratón y del exón eliminado. En los ratones deficientes en PARP-1 son destacables las siguientes características fenotípicas: 1) deficiencias en la reparación de daños en el ADN y alta inestabilidad genómica frente a estímulos genotóxicos (de Murcia et al. 1997; Shall and de Murcia 2000), 2) parada del ciclo en G2/M y retraso en el crecimiento (Trucco et al. 1998; Conde et al. 2001), 3)

resistencia a distintas patologías como: diabetes inducida por estreptomicina (Burkart et al. 1999; Masutani et al. 1999; Pieper et al. 1999; Serra et al. 2002), artritis inducida por peroxinitrito (Szabo et al. 1998), Parkinson inducido por MPTP (Mandir et al. 1999), isquemia cerebral (Eliasson et al. 1997) y choque séptico inducido por LPS (Kuhnle et al. 1999; Oliver et al. 1999) y acortamiento de los telómeros (d'Adda di Fagagna et al. 1999).

A partir de estos ratones se han obtenido líneas celulares inmortalizadas con las que se han podido estudiar a nivel celular las funciones fisiológicas de PARP-1. En nuestro laboratorio hemos establecido líneas celulares de fibroblastos murinos inmortalizados que expresan PARP-1 así como las líneas celulares deficientes en PARP-1, con las que se ha desarrollado parte de este trabajo de tesis doctoral.

No obstante, la información obtenida a través del estudio de estos ratones, nos proporciona una visión parcial del papel biológico de PARP-1, ya que no podemos distinguir con estas aproximaciones si la función principal de PARP-1 en estos procesos se debe a interacciones físicas con otras proteínas o a su actividad enzimática de poli (ADP-ribosilación). Por este motivo, estos estudios se han completado mediante el uso de inhibidores químicos de la actividad enzimática de PARP.

## 2.2.- DESARROLLO DE INHIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE PARP.

Desde su descubrimiento, hace ya más de 40 años, la proteína PARP-1 ha suscitado una profunda investigación en el campo de la síntesis química de compuestos con actividad inhibidora. La gran mayoría de los inhibidores químicos de PARP-1 basan su acción en la unión al dominio catalítico de PARP-1, ejerciendo una inhibición competitiva mediante la ocupación transitoria del centro de unión para NAD<sup>+</sup>. No es de extrañar por tanto, que los primeros inhibidores en utilizarse fueron en su mayoría compuestos con estructuras análogas al NAD<sup>+</sup>. Estos compuestos constituyen los denominados *inhibidores clásicos o de primera generación*. En este grupo podemos destacar a las nicotinamidas ( $IC_{50} = 210 \mu\text{M}$ ), originadas por el catabolismo del NAD<sup>+</sup> por PARP-1, que actúan como inhibidores endógenos de PARP-1 produciendo una regulación negativa por retroalimentación. Las nicotinamidas presentan una débil actividad inhibitoria que se ve incrementada mediante la incorporación de otros grupos químicos a su estructura. De hecho, la mayoría de los inhibidores químicos de PARP-1 contienen en su composición a la nicotinamida (Purnell and Whish 1980). Entre los

inhibidores clásicos más utilizados tenemos a la benzamida ( $IC_{50} = 22 \mu M$ ) y la 3-aminobenzamida (3-ABA,  $IC_{50} = 33 \mu M$ ) (figura 7, compuesto 1). Los resultados obtenidos con el uso de los inhibidores clásicos muestran efectos importantes en la sensibilización de células tumorales a la radiación ionizante y agentes alquilantes como resultado de una deficiente reparación del daño inducido por estos agentes en el ADN. Sin embargo, la interpretación de los datos obtenidos es complicada debido a que son compuestos poco potentes y se necesitan concentraciones elevadas (3-10 mM) para producir quimio- y radioprotección. Estas altas concentraciones de inhibidor han mostrado una elevada falta de especificidad ya que se ha observado que obstaculizan la biosíntesis de purinas, que son capaces de actuar como antioxidantes y que interfieren en el metabolismo glucídico y en la viabilidad celular (Milam and Cleaver 1984; Virag and Szabo 2002). Asimismo, el uso de estos inhibidores potencia la muerte celular inducida por agentes no genotóxicos (como el cis-platino), mostrando su baja especificidad hacia PARP-1.

Los esperanzadores resultados obtenidos mediante el uso de los inhibidores clásicos en el campo de la quimio- y radiosensibilización atrajo el interés de los científicos hacia el desarrollo de nuevos fármacos cada vez más potentes y más selectivos frente a PARP. Gracias al mayor conocimiento adquirido sobre la estructura del centro catalítico de PARP-1, una **segunda generación de inhibidores** más potentes y específicos fue desarrollada durante la década de los 90. La mayor contribución a la evolución de los inhibidores de PARP fue realizada por Banasik (Banasik et al. 1992), a través del estudio de 170 fármacos como potenciales drogas inhibitorias de PARP-1 y permitió identificar una gran variedad de compuestos con potente actividad inhibitoria, entre los cuales destacan: 1,5-dihidroxi-isoquinolina, 2-methylquinazolin-4-[3H]-one, 4-amino-1,8-naphthalimida y 2-nitro-6-[5H]-phenanthridinone (Fig. 7. compuestos 2, 3, 6 y 7). Estos compuestos presentan una alta selectividad y potencia como inhibidores de PARP-1 ( $IC_{50} < 1 \mu M$ ).

Mediante estos estudios hemos podido conocer las características moleculares necesarias que debe de presentar un potente inhibidor que eficazmente bloquee la actividad enzimática de PARP-1 (figura 8); entre ellas está la de poseer un anillo aromático o un sistema heterocíclico poliaromático rico en electrones que presente un enlace en la posición 3 de la benzamida y un grupo amida (-CONH<sub>2</sub>) con al menos un protón sin sustituir. Además se observó que este si este grupo amida en la posición 2 del

anillo aromático estaba en conformación anti con respecto al enlace de la posición 3 del anillo aromático mejoraba el comportamiento del compuesto como inhibidor de PARP-1.

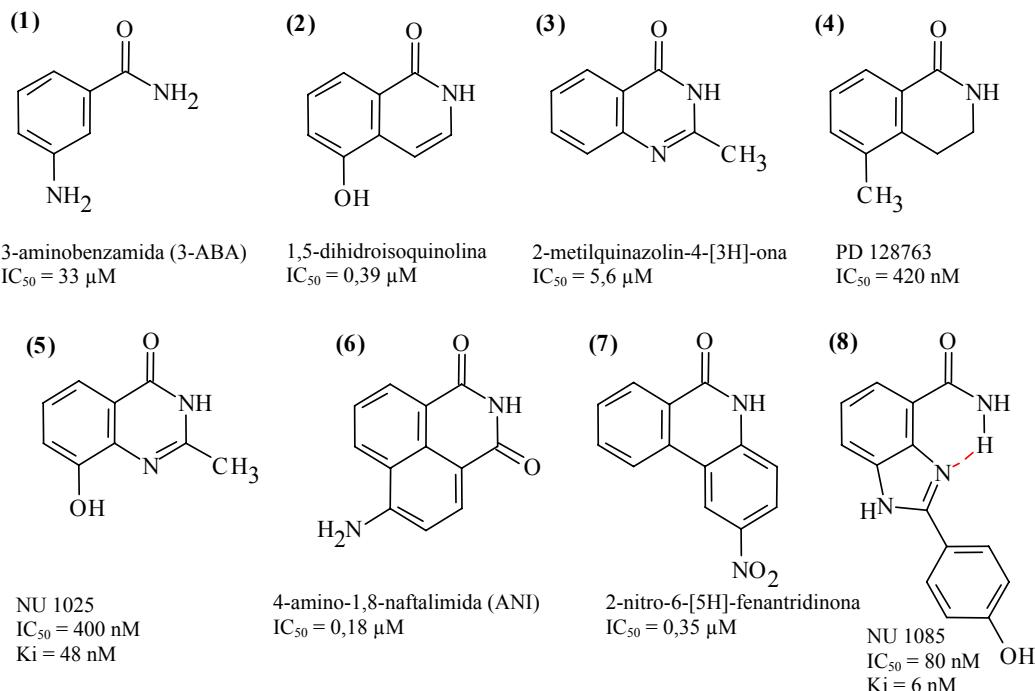


Figura 7: Estructura de los inhibidores de PARP.

Los trabajos con los inhibidores de segunda generación de PARP-1 a concentraciones de 50-100  $\mu M$  han mostrado efectos de sensibilización de la potenciación de la radiación ionizante y de agentes monoalquilantes mayores que el observado con los inhibidores de primera generación a concentraciones de 1-5 mM (3-ABA). Además, se ha podido resolver las discrepancias resultantes de los estudios con las benzamidas y el empleo de cis-platino. Se ha demostrado que estos inhibidores más selectivos no potencian los efectos citotóxicos producidos por agentes que no producen daños en el ADN como el cis-platino.

Otro hecho importante en el perfeccionamiento de los inhibidores lo constituye la resolución de la estructura cristalina del dominio catalítico de PARP-1 (Ruf et al. 1996). La cristalización de los inhibidores PD128763, 4-amino-1,8-naftalimida y NU1025 en el sitio de unión del NAD<sup>+</sup> en el dominio catalítico de la proteína PARP-1, reveló la importancia de los enlaces de hidrógeno realizados entre el grupo amida y la ser904 y la gly863 de la proteína. Estos enlaces son más fuertes y por tanto mayor la potencia y selectividad del inhibidor, con la presencia del grupo amida con una

conformación fija insertado en un anillo heteroaromático. Basándose en estos estudios cristalográficos se han obtenido los **inhibidores de tercera generación**, como son los compuestos tricíclicos derivados de lactano-indoles y los benzamidazoles (Canan Koch et al. 2002; Calabrese et al. 2004). Estos compuestos presentan una alta selectividad y son extremadamente potentes con IC<sub>50</sub> del rango de nanomolar (figura 9).

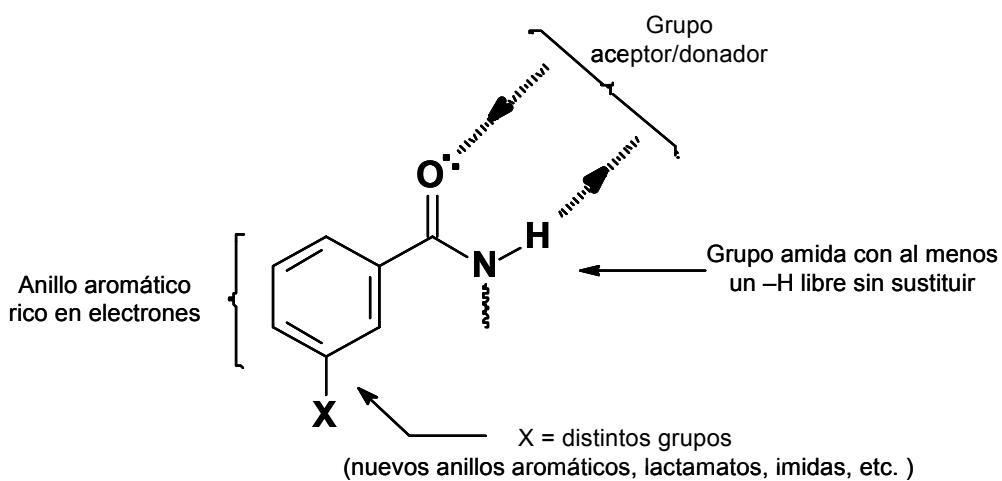
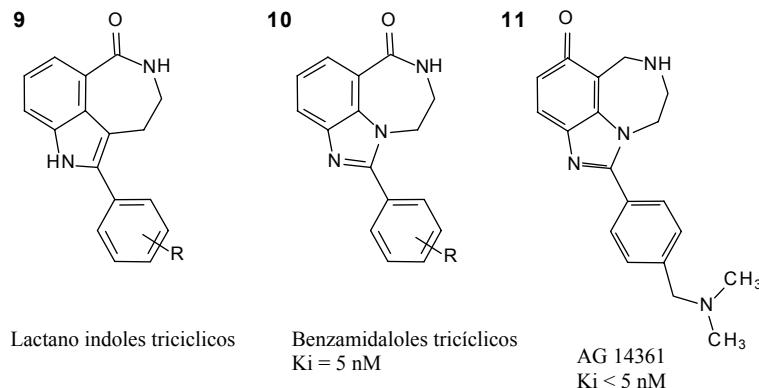


Figura 8: Características estructurales necesarias para los inhibidores de PARP-1.

Uno de estos compuestos, AG14361, está siendo objeto de estudio en ensayos clínicos que se vienen realizando en combinación con el agente alquilante temozolomida desde junio del 2003 (<http://science.cancerresearchuk.org/fandm/drugdevelopment/cureearlycts/>). El uso de inhibidores ha proporcionado evidencias convincentes de que la inhibición de PARP-1 produce un incremento de la sensibilidad con agentes alquilantes, inhibidores de la topoisomerasa I y radiación ionizante, además se ha demostrado igualmente, que no produce ningún efecto en tratamientos con productos antitumorales que no basan su acción en la inducción de daños en el ADN, demostrando de esta forma su alta especificidad. No está claro el papel de los inhibidores de PARP utilizados en combinación con otras moléculas de importancia en oncología clínica, por ejemplo, con la doxorrubicina, un inhibidor de la topoisomerasa II. Esta es una de las razones que justifica que este trabajo haya sido focalizado al estudio de los efectos celulares de la combinación de inhibidores de PARP con doxorrubicina.

Otro hecho interesante a destacar son los efectos beneficiosos de la inhibición farmacológica de PARP-1 en determinadas condiciones fisiopatológicas como es el caso de procesos de isquemia y repercusión, ataques de corazón, diabetes, choque séptico y

procesos inflamatorios (artritis, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, etc). Este tema se tratará en mayor detalle en el apartado de muerte celular por necrosis.



**Figura 9: Estructura molecular de los nuevos inhibidores de PARP.**

En definitiva, gracias al uso de inhibidores de PARP-1 se ha podido demostrar que la actividad catalítica del enzima está implicada directamente en los procesos de reparación del ADN dañado y que la inhibición de la reparación de este daño sensibiliza a las células tumorales frente a la radiación ionizante y a los agentes alquilantes.

### 3.- PROCESOS DE MUERTE CELULAR.

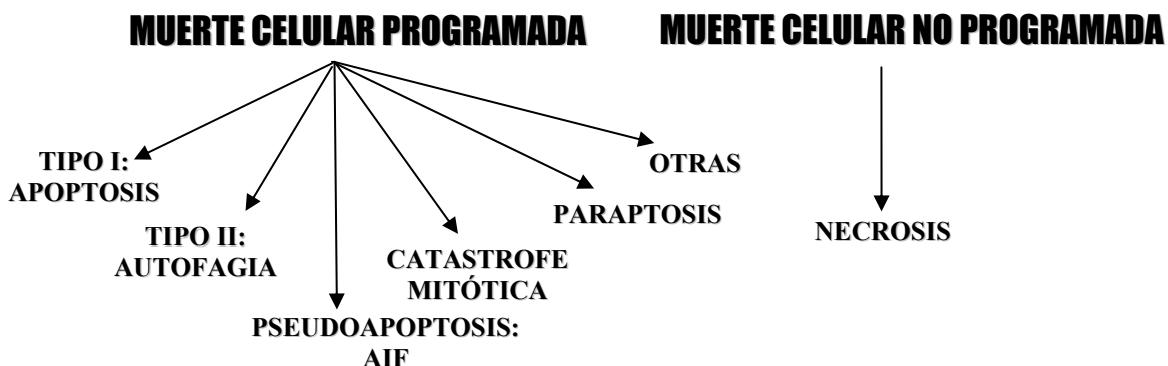
La muerte celular se produce continuamente en muchos tejidos de nuestro organismo y constituye un aspecto esencial para su desarrollo, mantenimiento y reparación y se origina como respuesta a lesiones físicas y genéticas, en la homeostasis celular y en el desarrollo embrionario, privación de oxígeno o nutrientes, pérdida de contacto con las células vecinas o infección por virus, etc. (Broker et al. 2005). Los procesos de muerte celular se han clasificado en dos grandes grupos: la **muerte celular programada** y los procesos de muerte celular por **necrosis** (Figura 10).

#### 3.1.- MUERTE CELULAR PROGRAMADA.

Se denomina *muerte celular programada* al mecanismo estrictamente regulado que lleva a la célula a un proceso de autolisis en respuesta a un conjunto de señales de muerte. El balance entre la división y muerte celular es de vital importancia para el desarrollo y el mantenimiento de los organismos multicelulares. El desarrollo embrionario exige una proporción considerable de eliminación celular para la organización estructural compleja de los tejidos. Se conoce que como media en un adulto humano, entre 50 y 70 millones de células mueren diariamente de forma programada como consecuencia de la renovación de los tejidos (Reed 1999). La muerte celular programada es también una defensa vital frente a las enfermedades infecciosas y el cáncer (Cory and Adams 2002; Cory et al. 2003). El cáncer no se caracteriza sólo por el crecimiento celular desordenado, sino también por la muerte celular insuficiente debido a deficiencias genéticas en los mecanismos de activación y ejecución de los procesos de muerte celular. Además muchas enfermedades degenerativas que afectan a los sistemas inmunitario, nervioso y cardiovascular, como el SIDA, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson o la aterosclerosis, tienen en común la activación inadecuada de los procesos de muerte celular programada y en consecuencia el descenso del número de células funcionales vitales en tejidos importantes.

La muerte celular programada se ha clasificado en los siguientes subgrupos (Figura 10): *Apoptosis* (muerte celular programada Tipo I), *Autofagia* (muerte celular Tipo II), *muerte celular mediada por AIF* (Apoptosis Inducing Factor, también denominada like-apoptosis), la *Paraptosis* y la *Catrástope Mitótica*.

(Lockshin and Zakeri 2002; Assuncao Guimaraes and Linden 2004; Lockshin and Zakeri 2004a; Lockshin and Zakeri 2004b; Broker et al. 2005).



**Figura 10:** Clasificación de los diferentes tipos de muerte celular.

### 3.1.1.- APOPTOSIS

La apoptosis se caracterizó por primera vez por Kerr en 1972 (Kerr et al. 1972). El mecanismo molecular en que se basa la apoptosis se ha conservado muy bien a lo largo de toda la evolución y buena parte del conocimiento que tenemos de su naturaleza procede del estudio del diminuto gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*. En él se identificaron por primera vez los genes implicados en la apoptosis (*ced-3*, *ced-4* y *ced-9*) (*Hengartner and Horvitz 1994a; Hengartner and Horvitz 1994b; Hengartner 1996; Chinnaiyan et al. 1997; James et al. 1997*). Como resultado de este trabajo, el Premio Nobel de Fisiología y Medicina del año 2002, recayó en los científicos Sydney Brenner, John E. Sulston y H. Robert. Tras los trabajos iniciales se han caracterizado los genes homólogos a *ced-3*, *ced-4* y *ced-9* en células de mamíferos. Estos estudios han sido cruciales en el campo de la investigación biomédica y han permitido profundizar en el conocimiento de patologías como el cáncer, el SIDA, enfermedades autoinmunes, o enfermedades degenerativas como el Alzheimer.

El término apoptosis ha sido frecuentemente asociado como sinónimo de muerte celular programada, si bien hoy se conocen múltiples formas de muerte celular programada diferentes de la apoptosis.

El proceso apoptótico se caracteriza por la aparición de una serie de eventos bioquímicos y morfológicos que ocurren de forma secuencial y que están muy bien

definidos (Wyllie et al. 1980), que pueden resumirse en las siguientes etapas: 1) Condensación del citoplasma y compactación de la cromatina, 2) activación de las endonucleasas nucleares y fragmentación oligonucleosomal del ADN (fragmentos de 180 pares de bases o múltiplos de estos), y 3) fragmentación celular en unas estructuras características denominadas cuerpos apoptóticos. La activación de las caspasas (proteasas de la familia de las cisteína proteasas) es la responsable de los cambios en la morfología celular que caracterizan a la apoptosis (figura 11). Los cuerpos apoptóticos resultantes de la degradación celular son fagocitados por los macrófagos y por las células vecinas y eliminados impidiendo la exposición del material intracelular al sistema inmune y evitando el desarrollo de cualquier respuesta inflamatoria.

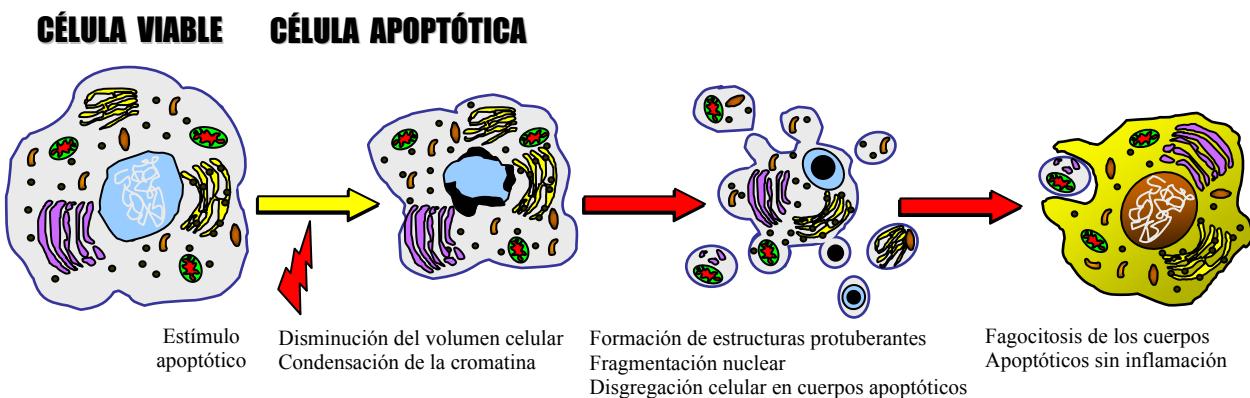


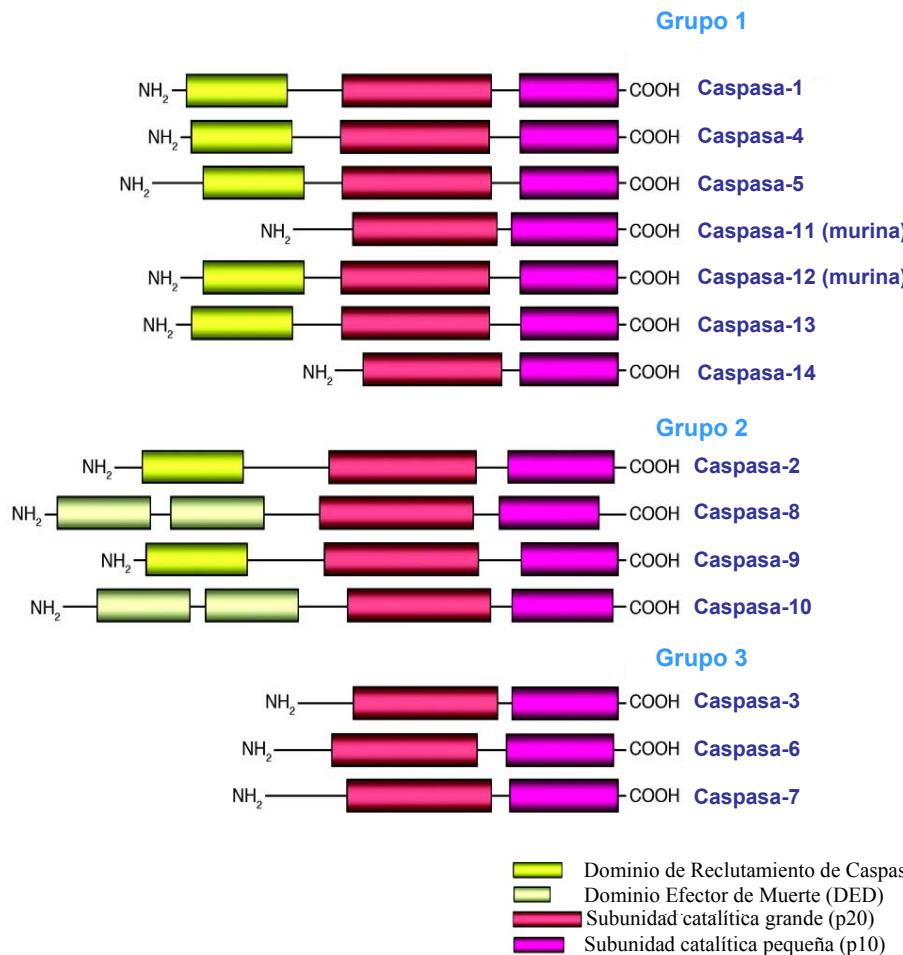
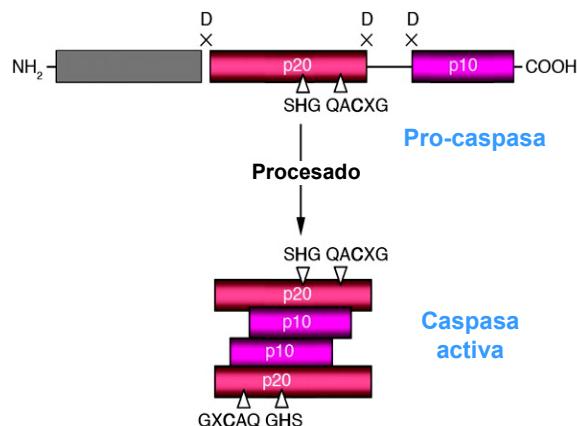
Figura 11: Características morfológicas de la apoptosis.

Las caspasas (*cysteine aspartyl-specific proteases*), son las proteasas encargadas del desarrollo del proceso. En las células están constitutivamente expresadas como proenzimas (zimógenos) y se activan por proteólisis tras la estimulación de la vía apoptótica. Se conocen 11 miembros en humanos y se clasifican en *caspasas iniciadoras* y *caspasas ejecutoras* o ejecutoras (figura 12). Las caspasas iniciadoras se activan tras la recepción de la señal apoptótica y por autocatálisis por proximidad y transmiten la señal apoptótica a las caspasas ejecutoras. Las caspasas-8, -9, -10, -2, -1, -4 y -5 constituyen este grupo de caspasas. Conjuntamente, las caspasas -1, -4 y -5, además de estar involucradas en la respuesta apoptótica, participan en el control de ciertas respuestas inflamatorias. Por otra parte, las caspasas ejecutoras o ejecutoras son las encargadas del desmantelamiento celular mediante la proteólisis de una gran variedad de proteínas implicadas en supervivencia celular como proteínas del citoesqueleto

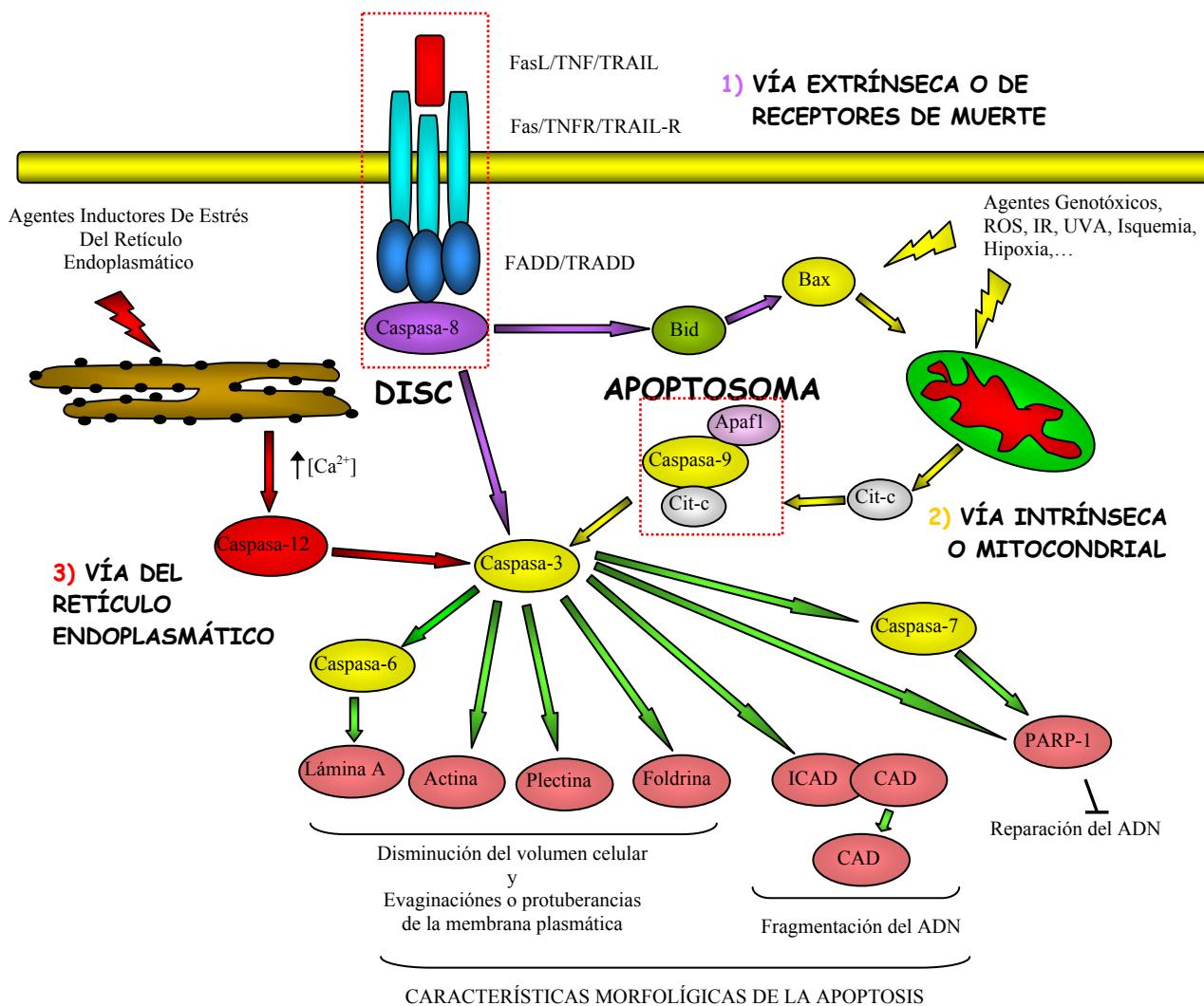
(actina, fodrina y plectina), proteínas encargadas de la reparación del daño en el ADN (PARP-1 entre otras) y proteínas implicadas en el control del ciclo celular (por ejemplo MDM2). Las caspasas-3, -6 y -7 son los miembros de este grupo. Las caspasas efectoras son normalmente activadas por las caspasas iniciadoras por proteólisis, de ahí que a la ruta de apoptosis se la denomine a veces cascada apoptótica.

Se conocen tres vías principales que llevan a la activación de las caspasas y por lo tanto a la muerte celular (Figura 13):

1. La vía de activación de a través de **receptores de muerte**, también conocida como **vía extrínseca** en la cual la caspasa iniciadora 8 es la principal responsable de la iniciación del proceso. Esta ruta se activa a través de la unión de distintos ligandos de muerte (TNF- $\alpha$ , Fas-L, TRAIL), a sus respectivos receptores localizados en la membrana celular. Tras esta activación se produce la trimerización del receptor y la formación de un complejo multiproteico inicial conocido como DISC (complejo inductor de señales de muerte), sobre el cual se recluta la caspasa iniciadora 8 que se auto-activa por aproximación (Strasser et al. 2000; Igney and Krammer 2002; Lavrik et al. 2003; Lavrik et al. 2005a).
2. La **vía mitocondrial o ruta intrínseca**, activada principalmente como respuesta a daños celulares producidos por radiación ultravioleta, agentes genotóxicos y retirada de factores de crecimiento. Esta caracterizada por la liberación de proteínas mitocondriales al citoplasma (citocromo c entre otras) y la activación de la caspasa iniciadora 9 mediante la estructura proteica denominada apoptosoma (Li et al. 1997). También se activa como mecanismo de amplificación de la ruta extrínseca. Esta ruta esta controlada por proteínas de la familia BCL-2 (Green and Reed 1998). Por su importancia en relación con este trabajo, la ruta motocondrial se describirá detalladamente en próximos apartados de esta memoria.
3. Por último, se ha descrito una vía de activación de la caspasa iniciadora 12 en modelos murinos. Esta vía es dependiente del retículo endoplasmático en respuesta a distintas formas de estrés, aunque no está muy claro el papel del retículo en la activación de la apoptosis en humanos (Nakagawa et al. 2000; Morishima et al. 2002).

**A****B**

**Figura 12: Estructura de las caspasas.** (A) La familia de las caspasas en mamíferos clasificadas en grupo 1, Caspasas inflamatorias; grupo 2, caspasas iniciadoras; grupo 3, caspasas efectoras. (B) Esquema de la activación de las pro-caspasas. La fragmentación de la procaspasa se realiza específicamente sobre los enlaces Asp-x y dirige a la formación de la caspasa activa, la cual está formada por el heterotetrámero p20<sub>2</sub>-p10<sub>2</sub> y a la liberación del predominio (figura adaptada de (Lavrik et al. 2005b))



**Figura 13: Rutas de inducción de la apoptosis.** 1) Ruta extrínseca o de receptores de muerte, 2) Vía intrínseca o mitocondrial, 3) Vía del retículo endoplasmático. DISC, Complejo Señalización de Inducción de Muerte.

### 3.1.1.2.- RUTA MITOCONDRIAL O INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS

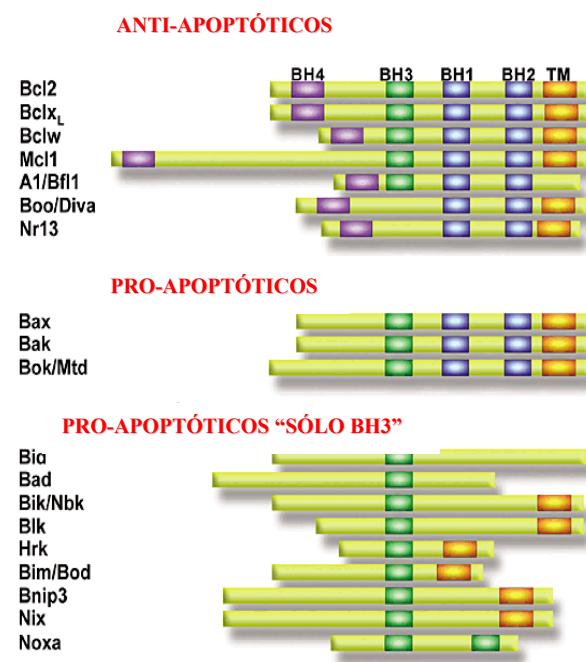
La principal función de las mitocondrias es generar energía para mantener la actividad celular mediante procesos de respiración aerobia y por esta misión se dice que las mitocondrias son el motor de la célula. No obstante, las mitocondrias también ejercen un papel importante en los procesos de muerte celular en respuesta a determinados tipos de estrés. La ruta de apoptosis por la cual se activa inicialmente la mitocondria y en la cual la mitocondria juega el papel principal se le denomina ruta intrínseca de la apoptosis. Muchos agentes inductores de apoptosis como drogas genotóxicas, radiación ionizante, radiación ultravioleta, etc., inducen apoptosis activando la ruta mitocondrial mediante liberación desde el espacio intermembranoso

mitocondrial al citosol, de una serie de proteínas claves para el desarrollo del programa de muerte celular como son: citocromo c, Smac/diablo, AIF, Omi/HtrA2 y endonucleasa G, entre otras (Green and Reed 1998; Shimizu et al. 1999; Lemasters et al. 2002; Bras et al. 2005).

Esta ruta está controlada por proteínas de la familia BCL-2 (Green and Reed 1998). En humanos se conocen más de 20 miembros de esta familia y se han clasificado en tres grupos en función a su estructura y función (figura 14).

1) *Miembros anti-apoptóticos:* como su nombre indica, interfieren en la ejecución de la ruta apoptótica mediante su unión a los miembros pro-apoptóticos descritos a continuación (Zha et al. 1996). Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, Bfl-1 y Bcl-w. Bcl-2 es la proteína que da nombre a esta familia. El gen *Bcl-2* fue descrito como un proto-oncogén que se activa como resultado de una translocación cromosómica que aparece en linfomas foliculares humanos de células B, de aquí el origen del nombre de Bcl-2 (linfoma de células B). Bcl-2 se encuentra anclado en la membrana nuclear, en la membrana del retículo endoplasmático y en la membrana externa mitocondrial (Krajewski et al. 1993; Lithgow et al. 1994). Mcl-1 se presenta en el citosol (Nijhawan et al. 2003). Las proteínas Bcl-x<sub>L</sub> y Bcl-w son citosólicas y tras la señal citotóxica que induce un cambio conformacional sobre ellas, se unen fuertemente a membrana (Hsu et al. 1997; Wilson-Annan et al. 2003).

2) *Miembros pro-apoptóticos tipo Bax:* este conjunto de proteínas son claves en la ejecución de la apoptosis mitocondrial. Bax, Bak y Bok son los miembros conocidos de este grupo de proteínas. Se ha propuesto que ejercen su función apoptótica mediante la permeabilización de la membrana externa mitocondrial produciendo la liberación de las proteínas pro-apoptóticas alojadas en dicho compartimento



**Figura 14: Miembros anti- y pro-apoptóticos de la familia Bcl-2.** La familia Bcl-2 posee cuatro dominios de homología (BH1-BH4). Algunos miembros también presentan un dominio hidrofóbico transmembrana en su extremo carboxi-terminal (TM). Adaptado de (Ranger et al. 2001).

(Korsmeyer et al. 2000; Wei et al. 2001). La proteína Bax se encuentra localizada en el citosol en forma de monómero (Hsu et al. 1997) tras su activación oligomeriza y se desplaza a la membrana mitocondrial donde induce permeabilización mitocondrial. Bak por el contrario es una proteína integrada en la membrana externa mitocondrial que se encuentra presente en forma de oligómeros (Chittenden et al. 1995).

3) *Miembros “solo BH3”*: Este grupo esta formado por Bid, Bim<sub>L</sub>, Bad, Noxa, Puma, Bmf y Hrk. Se caracterizan por poseer sólo el dominio de homología BH3, el cual es necesario y suficiente para inducir apoptosis. Las proteínas Bid y Bim ejercen su función (tras ser activadas por diversos mecanismos), mediante interacción con los miembros pro-apoptóticos Bax y Bak, produciendo en estos cambios conformacionales que inducen a su oligomerización y desencadenando en su activación (Korsmeyer et al. 2000). Las proteínas Bad, Bik y Noxa interaccionan con Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> impidiendo de esta manera su acción como inhibidores de la apoptosis (Willis and Adams 2005).

El modelo secuencial propuesto para la activación de la ruta apoptótica mitocondrial tras la exposición al estímulo inductor, consiste en la activación de las proteínas tipo Bcl-2 pro-apoptóticas tipo Bax, su desplazamiento a la mitocondria lo que produce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y la consecuente caída del potencial mitocondrial, salida de las proteínas implicadas en apoptosis (citocromo c entre otras), formación del complejo multiproteico conocido como apoptosoma compuesto por las proteínas Apaf-1, citocromo c y ATP o dATP. Posteriormente, la caspasa iniciadora-9 se une al apoptosoma y se auto-procesa dando lugar a la formación de un complejo holoenzimático que es capaz de reclutar y activar a las caspasas efectoras (Figura 13).

Se han propuesto varios modelos que intentan explicar la permeabilización de la membrana externa mitocondrial dirigido por las proteínas de la familia Bcl-2: 1) En el primero de ellos se ha descrito que las proteínas pro-apoptóticas tipo Bax, forman canales multiméricos en la membrana mitocondrial externa por los que saldrían citocromo c y demás proteínas apoptogénicas al citosol. Estas proteínas tipo Bax serían activadas por proteínas “solo BH3” como Bid y Bim las cuales ejercen su función mediante cambios conformacionales que inducirían a su oligomerización e inserción en la mitocondria (Eskes et al. 2000). 2) El otro mecanismo propuesto indica que estos mismos miembros pro-apoptóticos pueden interaccionar y regular la apertura de canales ya existentes, como el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM), en la membrana mitocondrial. Dicha apertura produciría la caída del potencial de membrana,

de ATP y la entrada de agua en la matriz mitocondrial que desencadenaría en un hinchamiento progresivo y en la rotura de la membrana mitocondrial externa, liberándose las proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembranal (Shimizu et al. 1999).

### **3.1.1.3.- APOPTOSIS, P53 Y SENSIBILIDAD A LOS AGENTES ANTITUMORALES**

El desarrollo de un organismo es un proceso complejo y equilibrado de proliferación y muerte celular. Estos procesos son muy complejos e implican la participación de muchos genes. En ambos procesos, el *gen supresor de tumores p53* es uno de los genes más importantes y desde su descubrimiento en 1979 (Linzer and Levine 1979) se ha convertido en el centro de intensos estudios. Más del 50% de los cánceres humanos presentan mutaciones en este gen y en la actualidad existe un catálogo de sus mutaciones en más de 50 tejidos diferentes (Hollstein et al. 1994). La resistencia celular al cáncer puede ser adquirida a través de diversas estrategias. Si embargo, las mutaciones en *p53* son las más frecuentes y están asociadas con resistencia a la inducción de muerte celular por apoptosis inducida por los agentes antitumorales (Lowe et al. 1993; Aas et al. 1996; Brown and Wouters 1999; Wallace-Brodeur and Lowe 1999). *p53* se encuentra mutado en el 50-55% de todos los tipos de cáncer en humanos. Estas mutaciones se encuentran localizadas principalmente en el dominio de unión al ADN, lo que resulta en la pérdida de su actividad biológica. Este factor de transcripción activa una gran variedad de genes que tiene como resultado el control de diversos procesos celulares, como la regulación del ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación del ADN, diferenciación celular y angiogénesis (Levine 1997; Sionov and Haupt 1999; Evan and Vousden 2001).

En condiciones normales, *p53* es una proteína poco abundante ya que tiene una vida media relativamente corta (inferior a 20 minutos) y se encuentra de forma inactiva. La actividad de esta proteína se regula fundamentalmente a través del control de su estabilidad. *p53* es rápidamente poli-ubiquitinizada y degradada por el proteosoma, lo que se traduce en que está presente en niveles muy bajos en circunstancias normales (Kubbutat and Vousden 1998). La vía principal de esta regulación de *p53* es realizada por la proteína Mdm2, que a su vez es regulada a nivel transcripcional por la proteína *p53*, a través de un mecanismo de auto-regulación de esta proteína (*p53*). Mdm2 se une

a la región N-terminal de p53, en el dominio de trans-activación que utiliza p53 en su unión a otros componentes de la maquinaria de transcripción basal, evitando de esta manera que p53 active la expresión de sus genes diana (Momand et al. 1992). Además, Mdm2 funciona como una subunidad E3-ligasa que une directamente grupos de ubiquitininas a p53, actuando directamente en el proceso de degradación de esta proteína (Honda et al. 1997).

La proteína p53 se estabiliza y por lo tanto se acumula como respuesta a diversas formas de estrés, principalmente tras daños originados en el genoma. Existen diversas formas de estabilizar a p53, todas relacionadas con la proteína Mdm2. La más conocida es la fosforilación de p53 en ciertos residuos aminoacídicos que impiden la unión de Mdm2 y su degradación por el proteosoma. Dos proteínas quinasas han sido implicadas directamente en la modificación de p53 tras daño inducido en el ADN por radiación- $\gamma$ , ATM durante las fases iniciales en respuesta al daño y ATR involucrada en la modificación de p53 en las fases tardías de este proceso. Una vez activada, ATM produce la fosforilación de p53 en la serina-15, así como la modificación del inhibidor Mdm2, interfiriendo en la interacción entre estas dos proteínas y permitiendo la acumulación y posterior iniciación de los procesos dependientes de p53 (Canman et al. 1998; Khosravi et al. 1999). Otro proceso de activación transcurre con la fosforilación de la proteína Chk2 (a su vez fosforilada por ATM) y la posterior modificación de la serina-20 mediante fosforilación, esto induce la disociación de Mdm2 de p53, evitando que sea transportada al citoplasma donde se degradaría.

Una vez activada, p53 homodimeriza en forma de tetrámeros e induce parada del ciclo celular en G1 mediante la inducción de la transcripción de p21<sup>WAF/Cip1</sup> (Waldman et al. 1997; el-Deiry 1998). Otro punto en el cual p53 puede detener el ciclo celular es en el punto de control de G2 (Cross et al. 1995).

p53 induce apoptosis de varias maneras. Una de ellas es actuando como factor de transcripción activando la transcripción de genes implicados en apoptosis como Bax (Miyashita and Reed 1995; Yin et al. 1997; Schuler et al. 2000), Noxa (Oda et al. 2000), Puma (Nakano and Vousden 2001), Bid (Sax et al. 2002), Apaf-1 (Kannan et al. 2001; Rozenfeld-Granot et al. 2002) y de receptores de muerte Fas/APO-1 y TRAIL (Owen-Schaub et al. 1995; Sheikh et al. 1998; Sheikh et al. 1999; Liu et al. 2004a). Además se han descrito formas alternativas de activar la apoptosis de forma independiente a su actividad como factor de transcripción. Tal es el caso de que su acumulación en el citoplasma como respuesta a ciertos tipos de estrés celular que origina su localización

en la superficie de la mitocondria y la liberación de citocromo-c así como la posterior activación de las caspasas (Mihara et al. 2003; Mihara and Moll 2003). Otro mecanismo conocido es la activación de Bax de forma directa por p53, ya que esta proteína puede funcionar como un análogo de proteínas “sólo BH3” y de esta forma activa a Bax e induce apoptosis (Chipuk et al. 2004).

Como ya se ha mencionado, las mutaciones en el *gen supresor de tumores p53* provocan resistencia a la quimioterapia y la radioterapia. En concreto se ha descrito que dichas mutaciones confieren resistencia al tratamiento con doxorrubicina en pacientes con cáncer de mama (Aas et al. 1996). Esta razón justifica la investigación de posibles tratamientos con agentes que sensibilicen a tales células deficientes en p53 al tratamiento con doxorrubicina. El tratamiento con inhibidores de PARP-1 podría constituir una vía alternativa y poderosa de sensibilización en tumores deficientes en p53 y resistentes a la quimioterapia.

### **3.1.2.- PARAPTOsis.**

Otro mecanismo de muerte celular descrito es la paraptosis. La paraptosis ha sido recientemente caracterizada morfológicamente y comprende las siguientes particularidades: vacuolización citosólica que comienza con una progresiva dilatación del retículo endoplasmático e hinchamiento mitocondrial, además es caspasa-independiente y transcurre sin la formación de cuerpos apoptóticos (Sperandio et al. 2000). La ejecución de la paraptosis es mediada por la ruta de las MAP quinasas (*mitogen-activated protein kinases*) (Sperandio et al. 2004) y puede ser activada por las proteínas TAJ/TROY, miembros de la familia de receptores de TNF (*tumor necrosis factor*) (Wang et al. 2004b) además del receptor del factor I de crecimiento similar a la insulina (IGFIR, *insulin-like growth factor I receptor*) (Sperandio et al. 2004). La paraptosis se inhibe específicamente por AIP1/Alix, proteína que interacciona con ALG-2 (*cell calcium-binding cell death-related protein*), lo que parece indicar que interviene en un proceso controlado por proteínas no implicadas en apoptosis y por lo tanto que constituye un mecanismo diferente de la apoptosis. La paraptosis constituye un campo emergente en la investigación de los procesos de muerte celular sobre la cual existen pocos datos bibliográficos y aún quedan muchas incógnitas por despejar, entre otras si la paraptosis y la autofagia son dos formas diferenciadas o no, de muerte celular.

### **3.1.3.- CATÁSTROFE MITÓTICA.**

La catástrofe mitótica esta provocada por fallos en los procesos de mitosis debidos a defectos en los puntos de control del ciclo celular y puede derivar en el desarrollo de células aneuploides que están condenadas a morir (Broker et al. 2005). La catástrofe mitótica puede ser provocada por determinados agentes que producen estabilización de los microtúbulos y daños en el ADN (Roninson et al. 2001). Ha sido descrito que puede ocurrir a dos niveles, en primer lugar durante la metafase con la implicación de p53 y en segundo lugar, en células que han superado la mitosis errónea, durante la activación del punto de control de poliploidía, de una forma parcialmente dependiente de p53 (Castedo and Kroemer 2004). Se caracteriza morfológicamente por la aparición de células gigantes con núcleos multinucleados. Existe un intenso debate sobre si es una muerte caspasa-dependiente o independiente, es decir, si constituye una forma de muerte celular por apoptosis o es un proceso realmente independiente y existen datos bibliográficos en ambos sentidos (Roninson et al. 2001; Castedo et al. 2004a; Castedo et al. 2004b).

### **3.1.4.- MUERTE CELULAR MEDIADA POR AIF.**

La mitocondria juega un papel clave en la regulación de diferentes procesos de muerte celular. En su espacio intermembranal contiene varias proteínas que se liberan a través de la membrana externa al citosol para participar en los procesos de degradación que transcurren tras la activación de los procesos de muerte celular programada. AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), es una flavoproteína que se localiza en dicho espacio intermembranal y que participa en procesos de muerte celular programada independiente de caspasas (Daugas et al. 2000; Bras et al. 2005). AIF tiene una alta homología con las oxidoreductasas bacterianas y de plantas (Quesada et al. 2003), aunque su función mitocondrial se desconoce actualmente, se cree que puede actuar como una oxidoreductasa en la cadena de transporte electrónico y además podría estar implicada en la eliminación de especies reactivas de oxígeno en células como método de prevención de posibles daños inducidos por estas especies en células sanas (Lipton and Bossy-Wetzel 2002).

Después del estímulo de muerte, AIF se desplaza de la mitocondria al núcleo donde induce fragmentación del ADN en grandes residuos no oligonucleosomales (> 50

kbp) (Zhang et al. 2002). El mecanismo por el cual AIF induce la condensación de la cromatina y fragmentación nuclear no está claro. AIF se une a ADN mediante interacciones electrostáticas y se ha demostrado que esta unión es condición necesaria para el desarrollo de la muerte celular (Ye et al. 2002). Además se conoce que la actividad oxidoreductasa de AIF no se requiere para este papel en muerte celular (Zhong and Simons 1999). Una vez unida al ADN, AIF podría reclutar nucleasas como Endo G (nucleasa mitocondrial que migra junto con AIF al núcleo), para inducir la fragmentación del ADN (Wang et al. 2002; Ishitsuka et al. 2005). Una vez liberado de la mitocondria, AIF actúa sobre ella produciendo la caída del potencial mitocondrial, la liberación de citocromo-c y más salida de AIF, como proceso de amplificación. Además, AIF promueve la exposición de residuos de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática. La liberación mitocondrial de AIF está controlada por Bcl-2, pero una vez liberado no influye sobre su desplazamiento a la mitocondria y sobre el posterior desarrollo de los procesos de muerte celular (Bras et al. 2005).

Se ha descrito que la activación de PARP-1 tras daños en el ADN puede desencadenar en la activación de procesos de muerte celular, que tradicionalmente se han descritos como necróticos tras colapso energético producidos por su sobreactivación. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la existencia de una muerte celular mediada por PARP-1 en la que AIF participa activamente (Yu et al. 2002; Wang et al. 2003; Yu et al. 2003; Wang et al. 2004a). Se ha observado que los fibroblastos deficientes en PARP-1 o células PARP-1 parentales tratadas con inhibidores de PARP-1, son más resistentes a agentes que dañan el ADN debido a que no se libera AIF de la mitocondria. Por el momento, no está dilucidado cual es el mecanismo de señalización ejercido por PARP-1 (nuclear) sobre AIF (mitocondrial), pero se ha postulado que el descenso en los niveles de NAD<sup>+</sup> producidos tras la activación de PARP-1 podría ser la señal que induce a la mitocondria a la liberación de AIF (Yu et al. 2002). Otro mecanismo propuesto es la señalización por parte del polímero producido por PARP-1 tras su activación, como la señal de indicación a la mitocondria de la activación de los procesos de muerte celular mediados por AIF (Zhong and Simons 1999). Otro tema que queda por dilucidar además de esta vía de comunicación núcleo-mitocondria, es el mecanismo de salida selectiva de AIF de la misma.

### 3.1.5.- MUERTE CELULAR PROGRAMADA TIPO II O AUTOFAGIA.

Históricamente el término apoptosis ha sido usado como sinónimo de muerte celular programada desde la publicación de Kerr en 1972 (Kerr et al. 1972), en la cual se clasificaba la muerte celular en programada o apoptosis y “accidental” o necrosis. Desde ese momento la apoptosis ha centrado la atención de la comunidad científica y se ha desarrollado una profunda investigación en este campo que ha provocado el profundo conocimiento de los mecanismos moleculares que gobiernan este fenómeno. Sin embargo, existían datos tanto estructurales (disponibles desde 1960), como moleculares que sugerían la existencia de formas alternativas de muerte celular programada. Así, clasificaciones posteriores han incluido estas discrepancias (Schweichel and Merker 1973), pero han pasado desapercibidas. No fue hasta 1990, cuando Clarke revisó las clasificaciones previas y amplió los conocimientos sobre posibles vías alternativas a la apoptosis y realizó una nueva clasificación con cierta relevancia en la comunidad científica, basándose en las características morfológicas de los diferentes tipos de muerte celular (Clarke 1990). Según esta clasificación, la muerte celular tipo II o autofagia se caracteriza por ser un proceso dinámico en el que estructuras membranosas intracelulares recubren y engullen proteínas y orgánulos con el objetivo de degradar y reciclar todos estos componentes celulares. La autofagia es un proceso conservado evolutivamente y está presente en todas las células eucariotas, desde levaduras (sistema en el que fue identificada por primera vez la maquinaria básica de este proceso), hasta los mamíferos (Klionsky and Emr 2000; Levine and Klionsky 2004; Meijer and Codogno 2004). Al iniciarse la autofagia, porciones de citoplasma así como orgánulos intracelulares, son incluidos en estructuras de doble membrana denominadas **autofagosomas** (figura 15). Estas estructuras se fusionan con los lisosomas para formar los **autolisosomas**, donde se degrada su contenido por acción de las hidrolasas lisosomales. De esta forma se obtienen los componentes necesarios para la nueva síntesis de ácidos grasos y aminoácidos (Gozuacik and Kimchi 2004; Kondo et al. 2005).

La autofagia constituye la mayor ruta celular de reciclado de proteínas y de orgánulos citoplasmáticos. La autofagia juega un papel importante en situaciones fisiológicas o patofisiológicas. En el caso de depleción de nutrientes en el entorno celular la autofagia proporciona las materias primas necesarias para el mantenimiento celular, mientras que en condiciones de infección a través de agentes patógenos, la

autofagia proporciona un método de eliminación de los mismos (Kondo et al. 2005), suministrando las condiciones necesarias para la adaptación a las condiciones del medio, favoreciendo la supervivencia. Otro asunto importante a destacar es la relación existente entre la autofagia y cáncer. Se ha descrito la desregulación de ciertas proteínas y de las vías de señalización implicadas en la activación de la autofagia durante la transformación neoplásica de las células. Este hecho sugiere que la autofagia puede funcionar, bajo ciertas circunstancias, como un mecanismo de salvaguarda capaz de restringir el crecimiento celular incontrolado (Gozuacik and Kimchi 2004). Otro punto ha sido considerado con respecto a la relación autofagia-cáncer es la observación de que ciertos tumores responden frente a los agentes antitumorales a través de la inducción de muerte de sus elementos celulares por autofagia, indicando el papel de este de este tipo de muerte celular tras la terapia del cáncer.

### **3.1.5.1.- CARACTERÍSTICAS DE LA MUERTE CELULAR AUTOFAGICA.**

La autofagia constituye un mecanismo de *supervivencia celular* frente a circunstancias adversas. En condiciones de necesidades energéticas, falta de aminoácidos o de ácidos grasos necesarios para nuevos procesos de biosíntesis, la autofagia suministra tales requerimientos e influye en la supervivencia celular. Además, la autofagia es un proceso fisiológico importante en el reciclado y eliminación de orgánulos dañados, como peroxisomas, mitocondrias y retículo endoplasmático (Gozuacik and Kimchi 2004). Se ha observado que las mitocondrias despolarizadas son rápidamente eliminadas por autofagia (Elmore et al. 2001), constituyendo un mecanismo de protección frente a la liberación de proteínas apoptogénicas del espacio intermembranal mitocondrial y por lo tanto actúa como mecanismo de retraso y prevención frente a la apoptosis. Sin embargo, frente a este mecanismo de protección, un exceso de actividad autofágica es capaz de destruir la mayor parte del citosol y de los orgánulos dirigiendo finalmente a la célula hacia el colapso total de sus funciones y haciendo irreversible el desencadenamiento de la muerte celular tipo II o autofagia. A este punto en el cual el proceso de degradación adquiere unos niveles que imposibilita las actividades vitales de las células, se le ha denominado *punto de no retorno* (Gozuacik and Kimchi 2004).

Las características principales de la muerte celular tipo II son las siguientes: **I) Nucleares:** a diferencia de la apoptosis los núcleos permanecen intactos hasta los

últimos momentos y no se observa fragmentación del ADN. **2) Citoplasmáticas:** la característica principal es la presencia de las vesículas autofágicas y de autolisomas, que va acompañada de un incremento en la actividad lisosomal. Se aprecia dilatación del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi. Junto con la elevada formación de autofagosomas, la característica principal que define a la autofagia, es la de ser una muerte celular **independiente de caspasas** (tabla II).

Los métodos de detección de la muerte celular tipo II son por el momento reducidos, si bien están en continuo avance debido al conocimiento cada vez mayor de la maquinaria autofágica y de las proteínas implicadas en la misma, desconocidas hasta hace muy pocos años a pesar de que la autofagia estaba descrita desde los años 70.

Características	Muerte celular Tipo I: apoptosis	Muerte celular Tipo II: autofagia
<b>Núcleo</b>	Condensación de la cromatina Picnosis de los núcleos Fragmentación oligonucleosomal del ADN Fragmentación nuclear	Condensación parcial de la A veces, picnosis nuclear Sin fragmentación del ADN Núcleos intactos
<b>Citoplasma</b>	Condensación del citoplasma Formación de cuerpos apoptóticos Perdida de los ribosomas del R. Endo. Rugoso Caída del potencial mitocondrial Dependiente de caspasas Preservación de los orgánulos	Formación de vesículas autofágicas Elevado número de autolisomas Elevada actividad lisosomal Dilatación del RE y Golgi Independiente de caspasas Degradación de los orgánulos
<b>Membrana celular</b>	Formación de evaginaciones	Formación de evaginaciones
<b>Método detección</b>	Microscopía electrónica Detección de la fragmentación del ADN Ensayos TUNEL Actividad de las caspasas Tinción con Anexina-V Medida de la población Sub-G1 Tinción nuclear con hoechst	Microscopía electrónica Detección de LC3, relocalización Tinción naranja acridina

**Tabla II: Características morfológicas y bioquímicas así como los métodos de detección de los procesos apoptóticos y autofágicos.**

El experimento estrella para la determinación de la presencia de las vesículas autofágicas es la *microscopía electrónica* y es el método más usado para la determinación de la actividad autofágica. Posteriormente, se han desarrollado otros

métodos de biología celular de entre los que cabe destacar el cambio de localización intracelular de la *proteína LC3* (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*, ATG8 en levaduras), pasando de una distribución citosólica a una localización en la superficie de las vesículas autofágicas, lo que constituye el primer marcador molecular de detección de actividad autofágica (Gozuacik and Kimchi 2004; Kondo et al. 2005).

### **3.1.5.2.- LA MAQUINARIA BÁSICA DE LA AUTOFAGIA.**

La autofagia es una vía de degradación lisosomal regulada. El origen de las membranas que forman el autofagosoma permanece todavía por dilucidar. Se ha propuesto como fuente de las mismas tanto el retículo endoplasmático, como el aparato de Golgi así como ciertas estructuras denominadas fagoforos (*phagophores*), también llamadas estructuras preautofagosomales, las cuales no están hasta la fecha, muy bien caracterizadas. No obstante, recientes estudios indican que las vesículas pueden ser formadas de novo a través de los pasos de nucleación, ensamblaje y elongación de pequeñas estructuras membranosas (Noda et al. 2002). El cierre de estas estructuras membranosas da como resultado la formación de los autofagosomas, constituidos por una doble membrana (figura 15). Posteriormente, los autofagosomas se fusionan con los lisosomas y se produce la degradación del contenido de estos recién formadas estructuras con una sola membrana denominadas autolisosomas. La degradación se lleva a cabo por las enzimas lisosomales.

La autofagia es un proceso dinámico que se realiza en múltiples pasos. Varias vías de señalización han sido implicadas en su sobre- o baja-regulación. No obstante, la información molecular disponible sobre la regulación de la autofagia está fragmentada y necesita de más investigación para poder ser completamente entendida. Se ha descrito a la proteína Tor Kinasa (*Target Of Rapamycin*), como la proteína clave en los procesos de iniciación de la autofagia (Noda and Ohsumi 1998; Kamada et al. 2000; Kamada et al. 2004; Yang et al. 2005). Tor es un sensor de falta de nutrientes y de energía intracelulares que además, integra las señales de factores de crecimiento recibidas a nivel de la membrana plasmática a través de la ruta PI3K clase I-AKT-Tor y constituye la señal más importante de inhibición de la autofagia en las condiciones de abundancia de nutrientes y energía o en respuesta a factores de crecimiento (figura 16). Por el contrario, PTEN es una proteína supresora de tumores que actúa como regulador positivo de la autofagia. PTEN desfosforila a las proteínas PI3K clase I produciendo su

inactivación , lo que dirige a la supresión de la actividad AKT y permite que se active el proceso autofágico (Arico et al. 2001).

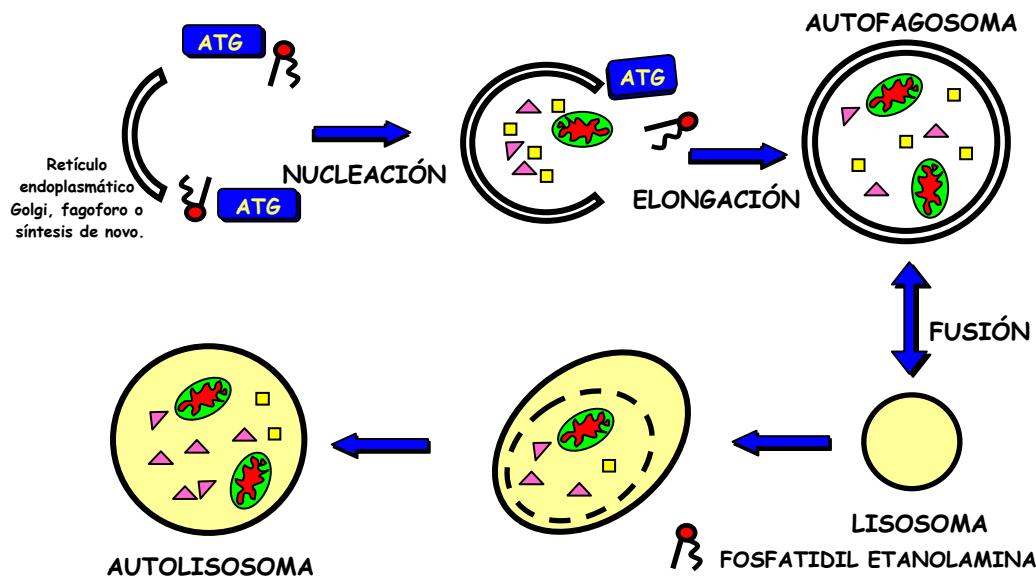
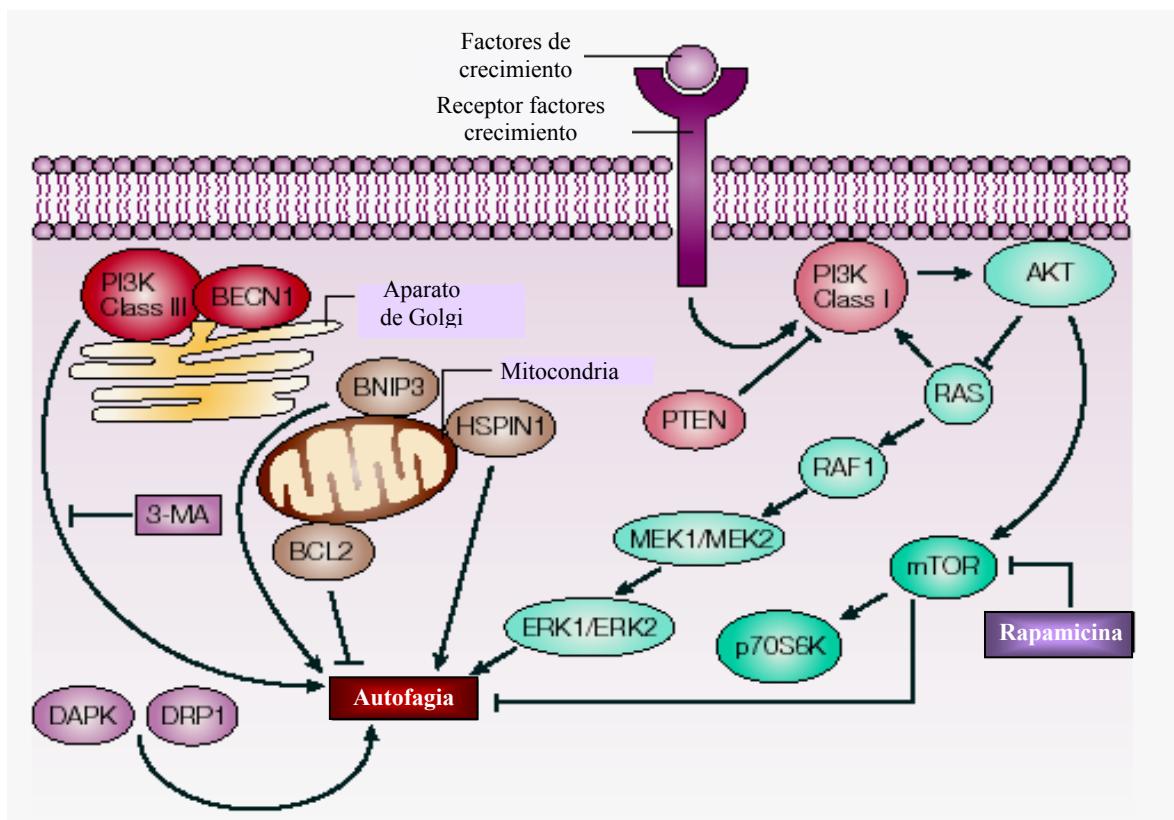


Figura 15: Formación del autolisosoma.

Otra ruta implicada en la regulación de la autofagia es la constituida por las PI3K clase III junto con la proteína pro-autofágica Beclina-1, a nivel del Trans-Golgi. PI3K clase I y clase III regulan la autofagia de forma diferente. Las de clase I (PI3K-AKT-mTor), actúan inhibiendo la autofagia tras su activación como respuesta a factores de crecimiento o a niveles óptimos de nutrientes y energía. Sin embargo, las PI3K clase III participan directamente en la formación y promoción de autofagosoma y por tanto promocionando la autofagia (Petiot et al. 2000).

Además de las PI3K se han descrito diferentes proteínas implicadas en los mecanismos reguladores de la autofagia. La forma oncogénica de RAS modula negativamente la autofagia a través de la activación de las PI3K clase I (Furuta et al. 2004). Particularmente interesante resulta el papel de la familia Bcl-2 como reguladores no solo de la apoptosis, sino que también se han descrito como moduladores de la autofagia. La ausencia de las proteínas tipo Bcl-2, Bax y Bak induce muerte celular autofágica dependiente de los genes pro-autofágicos APG-5 y Beclina-1, tras tratamiento de las células con el etopóxido (Shimizu et al. 2004). La sobre-expresión de BNIP-3, un miembro de la familia Bcl-2 (clase sólo BH3), dirige a la célula hacia la muerte celular programada tipo II o autofágica (Vande Velde et al. 2000).



**Figura 16: Mecanismos de control de la activación de la autofagia.** Figura adaptada de (Kondo et al. 2005)

BNIP-3 se desplaza a la membrana mitocondrial donde se integra y produce la permeabilidad de la misma a través del poro de transición mitocondrial. Los inhibidores de la apertura de dicho poro y la sobre-expresión de Bcl-2, bloquean la muerte celular inducida por BNIP-3. Esta muerte celular debida a la sobre-expresión de BNIP-3, ocurre sin la liberación de citocromo c y AIF. Además BNIP-3 está sobre-regulada en líneas celulares derivadas de gliomas malignos tras tratamiento con trióxido de arsénico (Kanzawa et al. 2005) y ceramidas (Daido et al. 2004), induciendo muerte celular por autofagia.

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), han sido implicadas en la regulación de un amplio rango de respuestas celulares como respuesta a factores de crecimiento. En particular, las vías extracelulares de señalización que activan a ERK1/2 mediante la estimulación de RAS-RAF1-MEK, inducen autofagia en líneas de cáncer de colon (Ogier-Denis et al. 2000). Y por último, también se ha relacionado a la proteína DAPK (*Death-Associated Protein Kinase*), (figura 16), con la ejecución de la muerte celular programada tipo II (Inbal et al. 2002).

Por debajo de todas estas vías de señalización, se han descrito aproximadamente 17 proteínas relacionadas con la ejecución de la autofagia en levaduras y en ciertos casos se conocen las proteínas homólogas en mamíferos. Los genes que codifican estas proteínas han sido denominados *atg* (*Autophagy-relaTed Genes*) y codifican proteínas necesarias para la inducción, generación, maduración y reciclado de los autófagosomas. Estas proteínas se han clasificado en cuatro grupos funcionales (figura 17): A) complejos de proteínas serina/treonina quininas (Atg-1, Atg-13, Atg-17) que actúan como sustratos de Tor quinasa en la señalización y transmisión de la señal autófágica. B) Complejo de señalización lípido-quinasa (Atg-6 (conocida como beclina-1 en mamíferos), Atg-14, Atg-34, Atg-15) que participan en los procesos de nucleación vesicular descritos anteriormente. C) La novedosa vía de señalización “similar a la ubiquitina” (*Ubiquitin-like conjugation system*) [Atg-8 (conocida como LC3 en mamíferos), Atg-12] que participa en la elongación de la membrana vesicular y por último D) las implicadas en la ruta de reciclado y que median el desmontaje de las proteínas Atg de los autófagosomas maduros (Atg-2, Atg-9, Atg-18) (Levine and Yuan 2005).

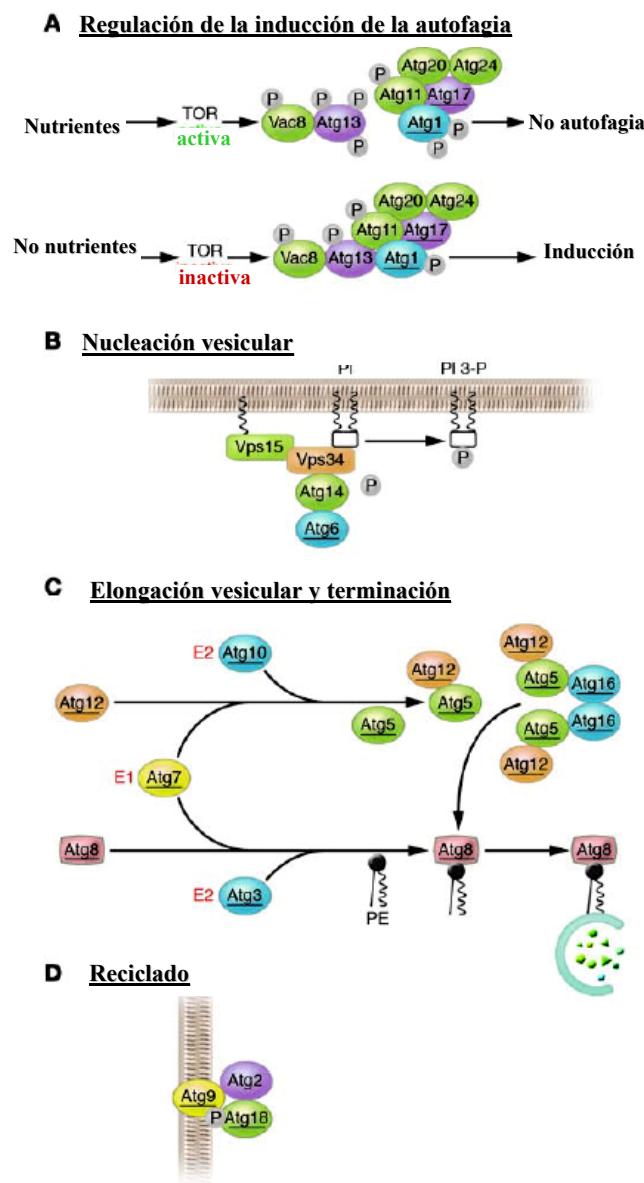


Figura 17: Mecanismos moleculares de la autofagia, implicación de las proteínas ATGs. Figura adaptada de (Kondo et al. 2005)

### 3.1.5.3.- RELACIÓN ENTRE AUTOFAGIA Y APOPTOSIS.

¿Existe relación entre la apoptosis y la autofagia? Los datos de los que disponemos actualmente nos proponen que la autofagia y la apoptosis pueden estar interconectadas en algunos casos. Se han propuesto diferentes modelos de interconexión, entre ellos se citan los siguientes: A) la autofagia puede actuar como mecanismo previo e indispensable para la ejecución de la apoptosis (figura 18, A). B) En otras circunstancias, la autofagia actúa como inhibidor de la apoptosis, eliminando las mitocondrias dañadas y evitando la emisión al citosol de los factores proapoptogénicos mitocondriales. Esta vía, supone por lo tanto, un mecanismo de supervivencia celular (Bauvy et al. 2001; Boya et al. 2005).

C) Por último, la apoptosis y la autofagia constituyen en función del agente citotóxico y del tipo celular, mecanismos de muerte bien definidos e independientes. Por ejemplo, (i) sobre distintas líneas celulares el mismo agente puede inducir diferentes mecanismos de muerte; así, líneas celulares de glioma maligno mueren por autofagia en respuesta a trióxido de arsénico (Kanzawa et al. 2003; Kanzawa et al. 2005), por otra lado, el trióxido de arsénico induce apoptosis en líneas celulares de leucemia (Pellicano et al. 2003).

(ii) Sobre un mismo modelo celular, la respuesta puede variar en función del agente citotóxico empleado. Así, en células de glioma maligno tratadas con el agente alquilante cis-platino, se produce muerte celular por apoptosis y no autofagia, sin embargo, sobre este mismo modelo celular, el agente alquilante temozolomida induce autofagia y no apoptosis (Kanzawa et al. 2004).

No obstante, aunque se ha observado que los procesos apoptóticos y autofágicos pueden constituir mecanismos independientes en respuesta a la terapia (como se ha

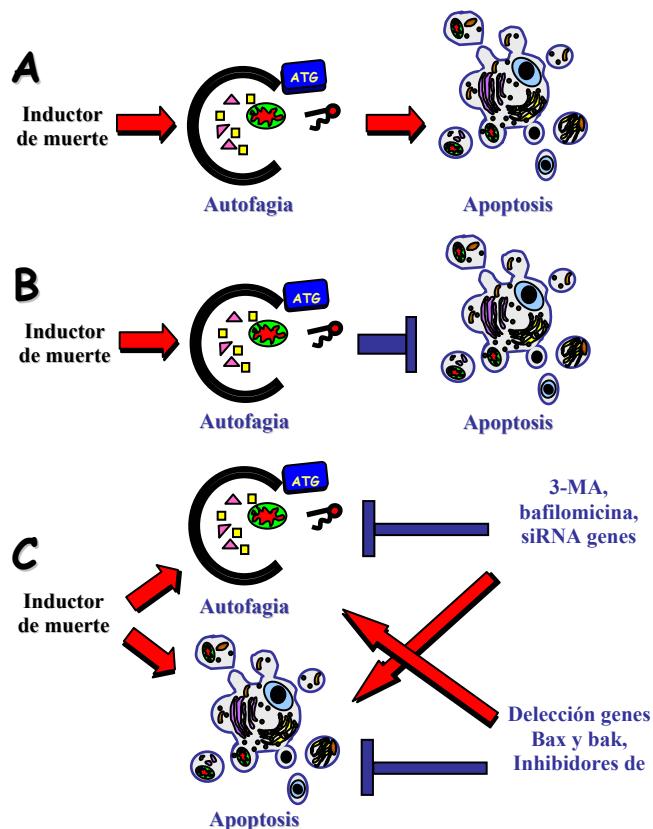


Figura 18: Esquema de las relaciones propuestas entre autofagia y apoptosis.

comentado en el apartado c), también se ha descrito una interconexión entre ambas vías. En muchos casos, la inhibición de la muerte celular por autofagia induce apoptosis y la inhibición de la apoptosis induce muerte celular por autofagia (figura 18 c). Es decir, actúan como mecanismos independientes pero alternativos que intentan suplir las deficiencias en alguno de ellos. Por ejemplo, la eliminación de los genes pro-apoptóticos *Bax* y *Bak* o el uso de inhibidores de caspasas, desencadena en muerte celular autofágica dependiente de los genes pro-autofágicos *atg-7* y *Beclin-1*, en líneas celulares de fibroblastos inmortalizados y en células de médula ósea (Shimizu et al. 2004; Yu et al. 2004; Lum et al. 2005). Por el contrario, el uso de inhibidores de la autofagia como la 3-metil adenina (3-MA, inhibidor de las PI3K) y bafilomicina A1 (inhibidor de H<sup>+</sup>-ATPasa, inhibe la autofagia mediante el bloqueo de la acidificación de las vesículas autofágicas), o mediante el uso de siRNA de genes pro-autofágicos, induce apoptosis en células neuronales HeLa y CHO (Xue et al. 2001). Además, determinadas señales pro-apoptóticas inducen autofagia (TNF, TRAIL Y FADD) (Jia et al. 1997; Mills et al. 2004; Pyo et al. 2005). Además, la vía PI3K clase I / Akt / mTOR, regula negativamente la ejecución de ambos procesos. El mecanismo que controla y decide la ejecución uno u otro proceso de muerte permanece todavía por descifrar. Se ha propuesto a la mitocondria como el centro de control de ambos procesos (Gozuacik and Kimchi 2004; Kondo et al. 2005; Levine and Yuan 2005). La mitocondria genera señales pro-apoptóticas que intentan ser eliminadas por autofagia mediante la destrucción de las mitocondrias dañadas, por lo tanto, la mitocondria puede representar un nexo entre ambas vías. Además, miembros de la familia Bcl-2 pueden regular la autofagia. Una reducción en la expresión de Bcl-2 incrementa la muerte celular por autofagia, independiente de caspasas, en células de leucemia humana (Saeki et al. 2000) y su sobre-expresión inhibe a ambos procesos (Cardenas-Aguayo Mdel et al. 2003; Canu et al. 2005). Se ha propuesto que Bcl-2 actúa como inhibidor de la autofagia mediante su capacidad de interacción directa con la proteína pro-autofágica Beclin-1, controlando de esta manera los niveles de ejecución de los procesos fisiológicos autofágicos compatibles con la vida (Pattingre et al. 2005). Otras proteínas Bcl-2 relacionadas con la ejecución y control de los procesos de muerte celular tipo II son BNIP-3 y Hspin (Vande Velde et al. 2000; Yanagisawa et al. 2003). De especial relevancia es el caso de BNIP-3, una proteína con dominios BH3 inducible por hipoxia, cuya sobre-expresión dirige a la célula a la muerte celular tipo II como se ha demostrado en diversas líneas celulares de cáncer en las que el tratamiento con trióxido

de arsénico y ceramidas induce muerte celular autofágica mediada por BNIP-3 (Vande Velde et al. 2000; Daido et al. 2004; Kanzawa et al. 2005). Esta proteína se encuentra localizada en la membrana exterior mitocondrial e induce la apertura del poro de transición mitocondrial, este proceso se regula por Bcl-2 mediante interacción física con BNIP-3. La apertura del poro no origina la salida de citocromo-c ni de AIF de la mitocondria (Vande Velde et al. 2000).

### **3.1.5.4.- AUTOFAGIA Y CÁNCER.**

Durante la década de los 70 y de los 80, coincidiendo con las primeras descripciones morfológicas de la autofagia, se puso de manifiesto la existencia de una relación inversa entre actividad autofágica y transformación maligna de las células (Gunn et al. 1977; Lockwood and Minassian 1982). Más recientemente, múltiples estudios han demostrado que la autofagia juega un papel importante en los procesos de carcinogénesis. Se ha podido constatar un descenso en la actividad autofágica en células tumorales comparadas con células no transformadas (Kisen et al. 1993; Kirkegaard et al. 2004). Además, trabajos con carcinógenos químicos o con el virus SV40 demuestran la existencia de una disminución de los procesos autofágicos durante la transformación maligna celular (Otsuka and Moskowitz 1978; Schwarze and Seglen 1985).

Asimismo, estudios genéticos en líneas de cáncer de mama han puesto de manifiesto la existencia la de pérdida monoalélica del gen *beclin-1* (homólogo en mamíferos del gen *atg-6* en levaduras). La restauración del alelo delecionado de dicho gen en la línea celular de cáncer de mama MCF7, reactiva los procesos autofágicos e inhibe la tumorogenicidad (Liang et al. 1999). Igualmente, estudios sobre muestras de cáncer de mama humano han mostrado una reducción en la expresión del gen *beclin-1* en relación con células epiteliales de mama no transformadas en 18 de las 32 muestras analizadas (Liang et al. 1999). Esta pérdida alélica de dicho gen localizado en el cromosoma 17q21, no ocurre como hecho aislado en cáncer de mama, sino que también ha sido observado en tumores de ovario y próstata, lo que nos indica que esta eliminación mono-alélica puede estar relacionada con la transformación y formación de múltiples tipos de cáncer. La observación que relaciona la supresión mono-alélica del gen *beclin-1* con la presencia de cáncer ha sido demostrada fehacientemente en estudios sobre ratones *beclin-1* <sup>+/−</sup>. Estos ratones han mostrado una elevada incidencia de cáncer de pulmón, carcinoma hepático y linfoma (Qu et al. 2003; Yue et al. 2003).

Otros ejemplos de reducción de autofagia y cáncer son la regulación negativa de los genes asociados con el desarrollo de la autofagia, PTEN y DAPK. Mutaciones en el gen supresor de tumores PTEN o su silenciamiento por cambios epigenéticos mediante hipermetilación de su promotor, llevan a la activación constitutiva de la vía de supervivencia celular AKT / mTor y a la reducción de la autofagia (Arico et al. 2001) (ruta descrita en el apartado 3.1.5.2). Este proceso contribuye a la transformación de las células en tumorales mediante la inhibición simultánea de la apoptosis y de la autofagia (Gozuacik and Kimchi 2004). De especial relevancia es la metilación del promotor de dicho gen PTEN en cáncer de mama, donde se le ha relacionado con carcinogénesis y con capacidad invasiva (Garcia et al. 2004; Khan et al. 2004). De igual forma, el gen de la DAPK actúa como un gen supresor de tumores y la pérdida de expresión por hipermetilación del promotor ha sido observada en líneas celulares derivadas de linfomas de células B, en cáncer de vejiga, mama y carcinoma renal (Kissil et al. 1997) y en muestras de tumores de linfomas, cáncer de pulmón, mama, ovario, colon, vejiga, cáncer de cabeza y cuello, cerebro y próstata (Raveh and Kimchi 2001). Sin embargo, no se ha establecido si el silenciamiento del gen DAPK y su relación con carcinogénesis ocurre a través de la reducción de los procesos autófágicos y más investigación sobre el tema parece necesaria.

Entre las hipótesis propuestas para explicar la interconexión autofagia-cáncer se encuentran las siguientes: a) El funcionamiento adecuado de la maquinaria de la autofagia permite la eliminación de orgánulos dañados, los cuales si no son degradados, pueden contribuir al proceso de tumorogénesis mediante la producción de radicales libres y el consiguiente desarrollo de estrés genotóxico (Edinger and Thompson 2003), b) En los procesos de transformación, las células pre-cancerosas requieren de una elevada síntesis proteica para desarrollar el crecimiento celular tumoral y mediante la autofagia se controlarían los niveles proteicos impidiendo dicho crecimiento. c) Asimismo, mediante la autofagia se podrían eliminar aquellas proteínas procedentes de oncogenes necesarias para la transformación y por último d) la disminución de los procesos de muerte celular por autofagia podría constituir un modo de escape de las células iniciadas y contribuir a la desregulación propia de los crecimientos tumorales.

Además de su implicación en carcinogénesis, se ha relacionado la muerte celular tipo II autófágica con la inhibición de la angiogénesis. Se ha descrito que la endostatina, un inhibidor de la angiogénesis, induce muerte celular endotelial con características de la muerte celular tipo II (independiente de caspasas, elevada actividad autófágica y es

sensible a la acción del inhibidor de la autofagia 3-MA) (Chau et al. 2003). Interesantemente, el gen supresor de tumores PTEN, también ha sido descrito como un inhibidor de la neovascularización en modelos de xenotransplantes de células tumorales cerebrales en ratones inmunosuprimidos (Wen et al. 2001).

Aunque, como se ha comentado, la autofagia puede ser suprimida o reducida en los primeros pasos de la tumorogénesis, también se ha propuesto que la autofagia puede ser sobre-regulada como mecanismo de supervivencia en los últimos estadios de la progresión tumoral, suministrando nutrientes y energía a las células cancerosas localizadas en las áreas centrales del tumor mal vascularizadas (Ogier-Denis and Codogno 2003; Cuervo 2004). Sin embargo, no está muy clara la razón por la qué la falta de nutrientes puede inducir autofagia en algunos tumores y en otros no. Creemos necesario destacar que la inhibición de la autofagia puede constituir una novedosa vía de potencial interés en la investigación de nuevas formas terapéuticas contra el cáncer.

### **3.1.5.5.- MUERTE CELULAR POR AUTOFAGIA INDUCIDA POR AGENTES ANTINEOPLÁSICOS.**

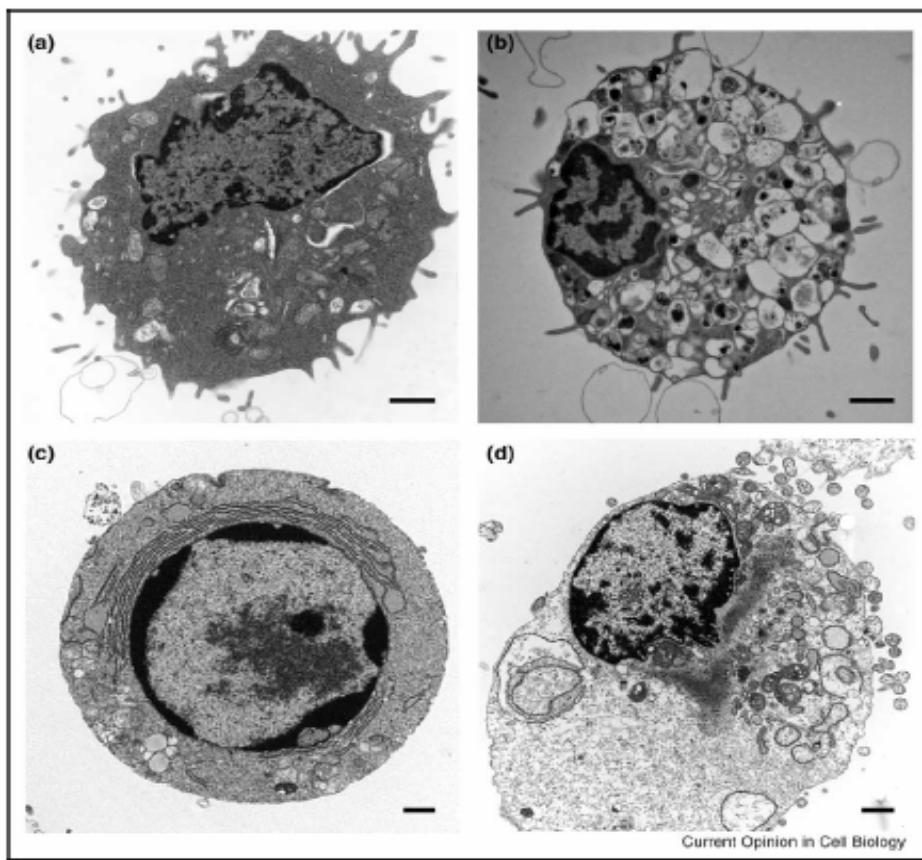
La muerte celular inducida por determinados agentes antitumorales es autofágica. El tratamiento con tamoxifeno (antagonista de estrógenos), induce muerte celular por autofagia en líneas celulares de cáncer de mama asociada a la regulación negativa de la proteína AKT y este proceso de muerte puede ser bloqueado mediante el uso de estradiol así como por el inhibidor de la autofagia 3-MA (Bursch et al. 1996). El trióxido de arsénico induce parada del ciclo celular en G2/M y muerte celular por autofagia en líneas celulares de glioma maligno (Kanzawa et al. 2003; Kanzawa et al. 2005). Otro agente antitumoral que induce muerte celular por autofagia es la radiación  $\gamma$  sobre líneas celulares de cáncer de mama, próstata, colon y glioma maligno (Paglin et al. 2001; Yao et al. 2003). Derivados de la prostaglandina J inducen muerte celular autofágica en células de cáncer de próstata (Butler et al. 2000). Otros ejemplos, los constituyen los inhibidores de las histonas deacetilasas en células HeLa (Shao et al. 2004), el resveratrol (producto natural presente en la uva y el vino tinto), en cáncer ovárico (Opipari et al. 2004) y la rapamicina (inhibidor de la proteína mTor que a su vez es inhibidor de la autofagia), en gliomas malignos (Takeuchi et al. 2005). Por lo tanto, es de gran importancia el estudio y el desarrollo sobre nuevos fármacos pro-autofágicos y su posible utilización en terapia tumoral, sobre todo, en aquellos tumores que han

demonstrado ser resistentes a los procesos apoptóticos inducidos por la terapéutica convencional.

### **3.2.- MUERTE CELULAR POR NECROSIS O NO PROGRAMADA.**

A diferencia de la muerte celular programada, la necrosis ha sido considerada tradicionalmente como una forma pasiva de muerte celular. La necrosis puede ser el resultado de dos procesos: 1) daño mecánico o físico inflingido sobre la célula que desencadena en rotura de la membrana plasmática y 2) como resultado de una catástrofe bioenergética derivada de un alto consumo en ATP. La depleción de los niveles energéticos puede alcanzar niveles incompatibles con la supervivencia celular y con la activación de los procesos de muerte celular programada dependientes de energía (apoptosis y autofagia). Por lo tanto, la necrosis ha sido considerada un proceso pasivo de muerte que transcurre con vacuolización del citoplasma, hinchamiento celular, rotura de la membrana plasmática y, a nivel tisular, la inducción de procesos inflamatorios en las zonas próximas a la necrosis debido a la liberación del contenido intracelular (moléculas pro-inflamatorias), desde las células en necrosis. Las células que sufren muerte celular por necrosis frecuentemente manifiestan cambios en su morfología nuclear, pero no sufren la condensación perinuclear ni la fragmentación oligonucleosomal típica de la apoptosis (figura 19).

Por otra parte, se ha descrito la implicación de PARP-1 en los procesos fisiopatológicos de muerte celular por necrosis. De esta forma, el estrés oxidativo originado en diversas patologías induce la sobre-activación de PARP-1 y como consecuencia de ello se la célula se ve privada de sus reservas en NAD<sup>+</sup> y ATP, culminando en disfunción celular y necrosis. Este mecanismo de muerte celular ha sido relacionado con las siguientes patologías inflamatorias: Diabetes mellitus, enfermedades inflamatorias intestinales (colitis y enfermedad de Crohn), Parkinson, daño por isquemia y reperfusión en cerebro, corazón, hígado, riñones, ojos, intestino, en enfermedades asmáticas, en choque séptico y artritis entre otras (Virág and Szabó 2002; Di Paola et al. 2005; Graziani et al. 2005; Kaplan et al. 2005; Strosznajder et al. 2005; Virág 2005). El uso de inhibidores de PARP-1 frena considerablemente los efectos patológicos de dichas enfermedades, protegiendo a la célula del alto consumo energético que conlleva la sobre-activación de PARP-1 y de la asociada muerte celular necrótica.



**Figura 19.- Características morfológicas de los principales procesos de muerte celular:** A) Célula normal, B) Célula autofágica, C) Célula apoptótica y D) Célula necrótica. Imagen adaptada de (Edinger and Thompson 2004)

---



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, Lonning PE (1996) Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 2:811-814
- Alvarez-Gonzalez R, Watkins TA, Gill PK, Reed JL, Mendoza-Alvarez H (1999) Regulatory mechanisms of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem* 193:19-22
- Ame JC, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P, Muller S, Hoger T, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (1999) PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 274:17860-17868
- Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G (2004) The PARP superfamily. *Bioessays* 26:882-893
- Arico S, Petiot A, Bauvy C, Dubbelhuis PF, Meijer AJ, Codogno P, Ogier-Denis E (2001) The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem* 276:35243-35246
- Ariumi Y, Masutani M, Copeland TD, Mimori T, Sugimura T, Shimotohno K, Ueda K, Hatanaka M, Noda M (1999) Suppression of the poly(ADP-ribose) polymerase activity by DNA-dependent protein kinase in vitro. *Oncogene* 18:4616-4625
- Assuncao Guimaraes C, Linden R (2004) Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 271:1638-1650
- Bakondi E, Bai P, Szabo EE, Hunyadi J, Gergely P, Szabo C, Virág L (2002) Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissues using biotinylated NAD substrate. *J Histochem Cytochem* 50:91-98
- Banasik M, Komura H, Shimoyama M, Ueda K (1992) Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem* 267:1569-1575
- Bauer PI, Chen HJ, Kenesi E, Kenessey I, Buki KG, Kirsten E, Hakam A, Hwang JI, Kun E (2001) Molecular interactions between poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I) and topoisomerase I (Topo I): identification of topology of binding. *FEBS Lett* 506:239-242
- Bauvy C, Gane P, Arico S, Codogno P, Ogier-Denis E (2001) Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal colon cancer cell line HT-29. *Exp Cell Res* 268:139-149
- Boulikas T (1990) Poly(ADP-ribosylated) histones in chromatin replication. *J Biol Chem* 265:14638-14647
- Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 25:1025-1040
- Bras M, Queenan B, Susin SA (2005) Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)* 70:231-239
- Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 11:3155-3162

- Brown JM, Wouters BG (1999) Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res* 59:1391-1399
- Burkart V, Wang ZQ, Radons J, Heller B, Herceg Z, Stingl L, Wagner EF, Kolb H (1999) Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. *Nat Med* 5:314-319
- Burk A (2000) Poly(ADP-ribosyl)ation: a posttranslational protein modification linked with genome protection and mammalian longevity. *Biogerontology* 1:41-46
- Burk A (2001) Poly(ADP-ribosyl)ation, a DNA damage-driven protein modification and regulator of genomic instability. *Cancer Lett* 163:1-5
- Bursch W, Ellinger A, Kienzl H, Torok L, Pandey S, Sikorska M, Walker R, Hermann RS (1996) Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164 384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 17:1595-1607
- Butler R, Mitchell SH, Tindall DJ, Young CY (2000) Nonapoptotic cell death associated with S-phase arrest of prostate cancer cells via the peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2. *Cell Growth Differ* 11:49-61
- Calabrese CR, Almassy R, Barton S, Batey MA, Calvert AH, Canan-Koch S, Durkacz BW, Hostomsky Z, Kumpf RA, Kyle S, Li J, Maegley K, Newell DR, Notarianni E, Stratford IJ, Skalitzky D, Thomas HD, Wang LZ, Webber SE, Williams KJ, Curtin NJ (2004) Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst* 96:56-67
- Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S (1996) XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res* 24:4387-4394
- Canan Koch SS, Thoresen LH, Tikhe JG, Maegley KA, Almassy RJ, Li J, Yu XH, Zook SE, Kumpf RA, Zhang C, Boritzki TJ, Mansour RN, Zhang KE, Ekker A, Calabrese CR, Curtin NJ, Kyle S, Thomas HD, Wang LZ, Calvert AH, Golding BT, Griffin RJ, Newell DR, Webber SE, Hostomsky Z (2002) Novel tricyclic poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors with potent anticancer chemopotentiating activity: design, synthesis, and X-ray cocrystal structure. *J Med Chem* 45:4961-4974
- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281:1677-1679
- Canu N, Tufi R, Serafino AL, Amadoro G, Ciotti MT, Calissano P (2005) Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 92:1228-1242

- Cardenas-Aguayo Mdel C, Santa-Olalla J, Baizabal JM, Salgado LM, Covarrubias L (2003) Growth factor deprivation induces an alternative non-apoptotic death mechanism that is inhibited by Bcl2 in cells derived from neural precursor cells. *J Hematother Stem Cell Res* 12:735-748
- Castedo M, Kroemer G (2004) [Mitotic catastrophe: a special case of apoptosis]. *J Soc Biol* 198:97-103
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004a) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23:2825-2837
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Valent A, Raslova H, Yakushijin K, Horne D, Feunteun J, Lenoir G, Medema R, Vainchenker W, Kroemer G (2004b) Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene* 23:4362-4370
- Cervellera MN, Sala A (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J Biol Chem* 275:10692-10696
- Clarke PG (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181:195-213
- Conde C, Mark M, Oliver FJ, Huber A, de Murcia G, Menissier-de Murcia J (2001) Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. *Embo J* 20:3535-3543
- Cook BD, Dynek JN, Chang W, Shostak G, Smith S (2002) Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol* 22:332-342
- Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2:647-656
- Cory S, Huang DC, Adams JM (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22:8590-8607
- Cross SM, Sanchez CA, Morgan CA, Schimke MK, Ramel S, Idzerda RL, Raskind WH, Reid BJ (1995) A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 267:1353-1356
- Cuervo AM (2004) Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* 14:70-77
- Chalmers A, Johnston P, Woodcock M, Joiner M, Marples B (2004) PARP-1, PARP-2, and the cellular response to low doses of ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58:410-419
- Chambon P, Weill JD, Mandel P (1963) Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 11:39-43
- Chang P, Coughlin M, Mitchison TJ (2005) Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function. *Nat Cell Biol* 7:1133-1139

- Chang WJ, Alvarez-Gonzalez R (2001) The sequence-specific DNA binding of NF-kappa B is reversibly regulated by the automodification reaction of poly (ADP-ribose) polymerase 1. *J Biol Chem* 276:47664-47670
- Chatterjee S, Berger SJ, Berger NA (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian of the genome that facilitates DNA repair by protecting against DNA recombination. *Mol Cell Biochem* 193:23-30
- Chau YP, Lin SY, Chen JH, Tai MH (2003) Endostatin induces autophagic cell death in EAhy926 human endothelial cells. *Histol Histopathol* 18:715-726
- Chiarugi A (2002) Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1 suppress transcriptional activation in lymphocytes and ameliorate autoimmune encephalomyelitis in rats. *Br J Pharmacol* 137:761-770
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Lane BR, Dixit VM (1997) Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 275:1122-1126
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303:1010-1014
- Chittenden T, Harrington EA, O'Connor R, Flemington C, Lutz RJ, Evan GI, Guild BC (1995) Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374:733-736
- d'Adda di Fagagna F, Hande MP, Tong WM, Lansdorp PM, Wang ZQ, Jackson SP (1999) Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nat Genet* 23:76-80
- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG (1999) Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342 ( Pt 2):249-268
- D'Amours D, Sallmann FR, Dixit VM, Poirier GG (2001) Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* 114:3771-3778
- Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, Takeuchi H, Kondo Y, Kondo S (2004) Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res* 64:4286-4293
- Dantzer F, Nasheuer HP, Vonesch JL, de Murcia G, Menissier-de Murcia J (1998) Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res* 26:1891-1898
- Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G (2000) Mitochondrial-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J* 14:729-739

- Davidovic L, Vodenicharov M, Affar EB, Poirier GG (2001) Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res* 268:7-13
- de Murcia G, Schreiber V, Molinete M, Saulier B, Poch O, Masson M, Niedergang C, Menissier de Murcia J (1994) Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem* 138:15-24
- de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G (1997) Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7303-7307
- Di Paola R, Mazzon E, Xu W, Genovese T, Ferraris D, Muia C, Crisafulli C, Zhang J, Cuzzocrea S (2005) Treatment with PARP-1 inhibitors, GPI 15427 or GPI 16539, ameliorates intestinal damage in rat models of colitis and shock. *Eur J Pharmacol* 527:163-171
- Edinger AL, Thompson CB (2003) Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell* 4:422-424
- Edinger AL, Thompson CB (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16:663-669
- el-Deiry WS (1998) p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr Top Microbiol Immunol* 227:121-137
- Eliasson MJ, Sampei K, Mandir AS, Hurn PD, Traystman RJ, Bao J, Pieper A, Wang ZQ, Dawson TM, Snyder SH, Dawson VL (1997) Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat Med* 3:1089-1095
- Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ (2001) The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *Faseb J* 15:2286-2287
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20:929-935
- Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411:342-348
- Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S, Kamata T (2004) Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene* 23:3898-3904
- Garcia JM, Silva J, Pena C, Garcia V, Rodriguez R, Cruz MA, Cantos B, Provencio M, Espana P, Bonilla F (2004) Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 41:117-124
- Germain M, Affar EB, D'Amours D, Dixit VM, Salvesen GS, Poirier GG (1999) Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem* 274:28379-28384

- Gordon-Shaag A, Yosef Y, Abd El-Latif M, Oppenheim A (2003) The abundant nuclear enzyme PARP participates in the life cycle of simian virus 40 and is stimulated by minor capsid protein VP3. *J Virol* 77:4273-4282
- Gozuacik D, Kimchi A (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23:2891-2906
- Graziani G, Battaini F, Zhang J (2005) PARP-1 inhibition to treat cancer, ischemia, inflammation. *Pharmacol Res* 52:1-4
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312
- Griesenbeck J, Ziegler M, Tomilin N, Schweiger M, Oei SL (1999) Stimulation of the catalytic activity of poly(ADP-ribosyl) transferase by transcription factor Yin Yang 1. *FEBS Lett* 443:20-24
- Gunn JM, Clark MG, Knowles SE, Hopgood MF, Ballard FJ (1977) Reduced rates of proteolysis in transformed cells. *Nature* 266:58-60
- Ha HC, Hester LD, Snyder SH (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3270-3275
- Hassa PO, Covic M, Hasan S, Imhof R, Hottiger MO (2001) The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J Biol Chem* 276:45588-45597
- Hassa PO, Hottiger MO (1999) A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation. *Biol Chem* 380:953-959
- Hengartner MO (1996) Programmed cell death in invertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 6:34-38
- Hengartner MO, Horvitz HR (1994a) The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345:243-246
- Hengartner MO, Horvitz HR (1994b) Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* 4:581-586
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 22:3551-3555
- Honda R, Tanaka H, Yasuda H (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420:25-27
- Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ (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* 94:12401-12406
- Igney FH, Krammer PH (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2:277-288

- Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A (2002) DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol* 157:455-468
- Ishitsuka K, Hidemitsu T, Hamasaki M, Raje N, Kumar S, Podar K, Le Gouill S, Shiraishi N, Yasui H, Roccaro AM, Tai YZ, Chauhan D, Fram R, Tamura K, Jain J, Anderson KC (2005) Novel inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor VX-944 induces apoptosis in multiple myeloma cells primarily via caspase-independent AIF/Endo G pathway. *Oncogene* 24:5888-5896
- James C, Gschmeissner S, Fraser A, Evan GI (1997) CED-4 induces chromatin condensation in *Schizosaccharomyces pombe* and is inhibited by direct physical association with CED-9. *Curr Biol* 7:246-252
- Jia L, Dourmashkin RR, Allen PD, Gray AB, Newland AC, Kelsey SM (1997) Inhibition of autophagy abrogates tumour necrosis factor alpha induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells. *Br J Haematol* 98:673-685
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150:1507-1513
- Kamada Y, Sekito T, Ohsumi Y (2004) Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. *Curr Top Microbiol Immunol* 279:73-84
- Kameoka M, Ota K, Tetsuka T, Tanaka Y, Itaya A, Okamoto T, Yoshihara K (2000) Evidence for regulation of NF-kappaB by poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem J* 346 Pt 3:641-649
- Kanai M, Tong WM, Sugihara E, Wang ZQ, Fukasawa K, Miwa M (2003) Involvement of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 and poly(ADP-Ribosyl)ation in regulation of centrosome function. *Mol Cell Biol* 23:2451-2462
- Kanai Y, Tanuma S, Sugimura T (1981) Immunofluorescent staining of poly(ADP-ribose) in situ in HeLa cell chromosomes in the M phase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:2801-2804
- Kannan K, Kaminski N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Amariglio N, Givol D (2001) DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene* 20:3449-3455
- Kannan P, Yu Y, Wankhade S, Tainsky MA (1999) PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res* 27:866-874
- Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S (2004) Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 11:448-457
- Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I (2003) Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res* 63:2103-2108

- Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y, Kondo S (2005) Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene* 24:980-991
- Kaplan J, O'Connor M, Hake PW, Zingarelli B (2005) Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase ameliorate myocardial reperfusion injury by modulation of activator protein-1 and neutrophil infiltration. *Shock* 23:233-238
- Katoh M, Katoh M (2003) Identification and characterization of human TIPARP gene within the CCNL amplicon at human chromosome 3q25.31. *Int J Oncol* 23:541-547
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53:3976-3985
- Kawaichi M, Ueda K, Hayaishi O (1981) Multiple autopoly(ADP-ribosyl)ation of rat liver poly(ADP-ribose) synthetase. Mode of modification and properties of automodified synthetase. *J Biol Chem* 256:9483-9489
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257
- Khan S, Kumagai T, Vora J, Bose N, Sehgal I, Koeffler PH, Bose S (2004) PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int J Cancer* 112:407-410
- Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D (1999) Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14973-14977
- Kickhoefer VA, Siva AC, Kedersha NL, Inman EM, Ruland C, Streuli M, Rome LH (1999) The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol* 146:917-928
- Kim JW, Kim K, Kang K, Joe CO (2000) Inhibition of homodimerization of poly(ADP-ribose) polymerase by its C-terminal cleavage products produced during apoptosis. *J Biol Chem* 275:8121-8125
- Kirkegaard K, Taylor MP, Jackson WT (2004) Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2:301-314
- Kisen GO, Tessitore L, Costelli P, Gordon PB, Schwarze PE, Baccino FM, Seglen PO (1993) Reduced autophagic activity in primary rat hepatocellular carcinoma and ascites hepatoma cells. *Carcinogenesis* 14:2501-2505
- Kissil JL, Feinstein E, Cohen O, Jones PA, Tsai YC, Knowles MA, Eydmann ME, Kimchi A (1997) DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene* 15:403-407
- Klionsky DJ, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290:1717-1721

- Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S (2005) The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 5:726-734
- Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7:1166-1173
- Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC (1993) Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53:4701-4714
- Kraus WL, Lis JT (2003) PARP goes transcription. *Cell* 113:677-683
- Kreimeyer A, Wielckens K, Adamietz P, Hilz H (1984) DNA repair-associated ADP-ribosylation in vivo. Modification of histone H1 differs from that of the principal acceptor proteins. *J Biol Chem* 259:890-896
- Kubbutat MH, Vousden KH (1998) Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol Med Today* 4:250-256
- Kuhnle S, Nicotera P, Wendel A, Leist M (1999) Prevention of endotoxin-induced lethality, but not of liver apoptosis in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 263:433-438
- Lavrik I, Golks A, Krammer PH (2005a) Death receptor signaling. *J Cell Sci* 118:265-267
- Lavrik I, Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Weyd H, Krammer PH, Kirchhoff S (2003) The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death Differ* 10:144-145
- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH (2005b) Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115:2665-2672
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371:346-347
- Le Page C, Sanceau J, Drapier JC, Wietzerbin J (1998) Inhibitors of ADP-ribosylation impair inducible nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF kappa B activation. *Biochem Biophys Res Commun* 243:451-457
- Leduc Y, Lawrence JJ, De Murcia G, Poirier GG (1988) Cell cycle regulation of poly(ADP-ribose) synthetase in FR3T3 cells. *Biochim Biophys Acta* 968:275-282
- Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE, Brenner DA (2002) Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 4:769-781
- Leppard JB, Dong Z, Mackey ZB, Tomkinson AE (2003) Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* 23:5919-5927

- Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331
- Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6:463-477
- Levine B, Yuan J (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 115:2679-2688
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402:672-676
- Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A (1995) Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci* 20:405-411
- Linzer DI, Levine AJ (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17:43-52
- Lipton SA, Bossy-Wetzel E (2002) Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. *Cell* 111:147-150
- Lithgow T, van Driel R, Bertram JF, Strasser A (1994) The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ* 5:411-417
- Liu X, Yue P, Khuri FR, Sun SY (2004a) p53 upregulates death receptor 4 expression through an intronic p53 binding site. *Cancer Res* 64:5078-5083
- Liu Y, Snow BE, Kickhoefer VA, Erdmann N, Zhou W, Wakeham A, Gomez M, Rome LH, Harrington L (2004b) Vault poly(ADP-ribose) polymerase is associated with mammalian telomerase and is dispensable for telomerase function and vault structure in vivo. *Mol Cell Biol* 24:5314-5323
- Lockshin RA, Zakeri Z (2002) Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol* 14:727-733
- Lockshin RA, Zakeri Z (2004a) Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2405-2419
- Lockshin RA, Zakeri Z (2004b) Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23:2766-2773
- Lockwood TD, Minassian IA (1982) Protein turnover and proliferation. Failure of SV-3T3 cells to increase lysosomal proteinases, increase protein degradation and cease net protein accumulation. *Biochem J* 206:251-258
- Los M, Mozoluk M, Ferrari D, Stepczynska A, Stroh C, Renz A, Herceg Z, Wang ZQ, Schulze-Osthoff K (2002) Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular

- switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. Mol Biol Cell 13:978-988
- Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T (1993) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. Nature 362:847-849
- Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. Cell 120:237-248
- Ma Q (2002) Induction and superinduction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-rho-dioxin-inducible poly(ADP-ribose) polymerase: role of the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator transcription activation domains and a labile transcription repressor. Arch Biochem Biophys 404:309-316
- Mandir AS, Przedborski S, Jackson-Lewis V, Wang ZQ, Simbulan-Rosenthal CM, Smulson ME, Hoffman BE, Guastella DB, Dawson VL, Dawson TM (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase activation mediates 1-methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism. Proc Natl Acad Sci U S A 96:5774-5779
- Martin-Oliva D, O'Valle F, Munoz-Gamez JA, Valenzuela MT, Nunez MI, Aguilar M, Ruiz de Almodovar JM, Garcia del Moral R, Oliver FJ (2004) Crosstalk between PARP-1 and NF-kappaB modulates the promotion of skin neoplasia. Oncogene 23:5275-5283
- Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. Mol Cell Biol 18:3563-3571
- Masutani M, Suzuki H, Kamada N, Watanabe M, Ueda O, Nozaki T, Jishage K, Watanabe T, Sugimoto T, Nakagama H, Ochiya T, Sugimura T (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. Proc Natl Acad Sci U S A 96:2301-2304
- Meijer AJ, Codogno P (2004) Regulation and role of autophagy in mammalian cells. Int J Biochem Cell Biol 36:2445-2462
- Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzalez R (2001) Regulation of p53 sequence-specific DNA-binding by covalent poly(ADP-ribosylation). J Biol Chem 276:36425-36430
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. Mol Cell 11:577-590
- Mihara M, Moll UM (2003) Detection of mitochondrial localization of p53. Methods Mol Biol 234:203-209
- Milam KM, Cleaver JE (1984) Inhibitors of poly(adenosine diphosphate-ribose) synthesis: effect on other metabolic processes. Science 223:589-591
- Mills KR, Reginato M, Debnath J, Queenan B, Brugge JS (2004) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 101:3438-3443

- Miyashita T, Reed JC (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293-299
- Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69:1237-1245
- Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277:34287-34294
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98-103
- Nakano K, Vousden KH (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7:683-694
- Nash RA, Caldecott KW, Barnes DE, Lindahl T (1997) XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry* 36:5207-5211
- Nie J, Sakamoto S, Song D, Qu Z, Ota K, Taniguchi T (1998) Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase. *FEBS Lett* 424:27-32
- Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X (2003) Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 17:1475-1486
- Noda T, Ohsumi Y (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* 273:3963-3966
- Noda T, Suzuki K, Ohsumi Y (2002) Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol* 12:231-235
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288:1053-1058
- Oei SL, Griesenbeck J, Schweiger M, Babich V, Kropotov A, Tomilin N (1997) Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 240:108-111
- Ogier-Denis E, Codogno P (2003) Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta* 1603:113-128
- Ogier-Denis E, Pattingre S, El Benna J, Codogno P (2000) Erk1/2-dependent phosphorylation of Galphai-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. *J Biol Chem* 275:39090-39095
- Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G (1999) Resistance to endotoxic shock as a

- consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *Embo J* 18:4446-4454
- Opipari AW, Jr., Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, Liu JR (2004) Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 64:696-703
- Otsuka A, Hanafusa T, Miyagawa J, Kono N, Tarui S (1991) Nicotinamide and 3-aminobenzamide reduce interferon-gamma-induced class II MHC (HLA-DR and -DP) molecule expression on cultured human endothelial cells and fibroblasts. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 13:263-280
- Otsuka H, Moskowitz M (1978) Differences in the rates of protein degradation in untransformed and transformed cell lines. *Exp Cell Res* 112:127-135
- Owen-Schaub LB, Zhang W, Cusack JC, Angelo LS, Santee SM, Fujiwara T, Roth JA, Deisseroth AB, Zhang WW, Kruzel E, et al. (1995) Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* 15:3032-3040
- Paglin S, Hollister T, Delohery T, Hackett N, McMahill M, Sphicas E, Domingo D, Yahalom J (2001) A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res* 61:439-444
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122:927-939
- Pellicano H, Feng L, Zhou Y, Carew JS, Hileman EO, Plunkett W, Keating MJ, Huang P (2003) Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. *J Biol Chem* 278:37832-37839
- Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaart EF, Meijer AJ, Codogno P (2000) Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* 275:992-998
- Pieper AA, Brat DJ, Krug DK, Watkins CC, Gupta A, Blackshaw S, Verma A, Wang ZQ, Snyder SH (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice are protected from streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3059-3064
- Purnell MR, Whish WJ (1980) Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Biochem J* 185:775-777
- Pyo JO, Jang MH, Kwon YK, Lee HJ, Jun JI, Woo HN, Cho DH, Choi B, Lee H, Kim JH, Mizushima N, Oshumi Y, Jung YK (2005) Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem* 280:20722-20729

- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 112:1809-1820
- Quesada P, Malanga M, Di Meglio S, De Lorenzo S, Fabbrocini A, Garbi C, Bianco AR, Pepe S (2003) Recombinant IFN-alpha2b treatment activates poly (ADPR) polymerase-1 (PARP-1) in KB cancer cells. *Eur J Cancer* 39:2103-2109
- Ranger AM, Malynn BA, Korsmeyer SJ (2001) Mouse models of cell death. *Nat Genet* 28:113-118
- Raveh T, Kimchi A (2001) DAP kinase-a proapoptotic gene that functions as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 264:185-192
- Reed JC (1999) Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol* 17:2941-2953
- Roninson IB, Broude EV, Chang BD (2001) If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 4:303-313
- Rozenfeld-Granot G, Krishnamurthy J, Kannan K, Toren A, Amariglio N, Givol D, Rechavi G (2002) A positive feedback mechanism in the transcriptional activation of Apaf-1 by p53 and the coactivator Zac-1. *Oncogene* 21:1469-1476
- Ruf A, Mennissier de Murcia J, de Murcia G, Schulz GE (1996) Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7481-7485
- Saeki K, Yuo A, Okuma E, Yazaki Y, Susin SA, Kroemer G, Takaku F (2000) Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differ* 7:1263-1269
- Sax JK, Fei P, Murphy ME, Bernhard E, Korsmeyer SJ, El-Deiry WS (2002) BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* 4:842-849
- Sbodio JI, Lodish HF, Chi NW (2002) Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). *Biochem J* 361:451-459
- Scheffer GL, Schroeijers AB, Izquierdo MA, Wiemer EA, Scheper RJ (2000) Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Curr Opin Oncol* 12:550-556
- Schreiber V, de Murcia G, de Murcia JM (1994) A eukaryotic expression vector for the study of nuclear localization signals. *Gene* 150:411-412
- Schreiber V, Hunting D, Trucco C, Gowans B, Grunwald D, De Murcia G, De Murcia JM (1995) A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4753-4757

- Schuler M, Bossy-Wetzel E, Goldstein JC, Fitzgerald P, Green DR (2000) p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem* 275:7337-7342
- Schwarze PE, Seglen PO (1985) Reduced autophagic activity, improved protein balance and enhanced in vitro survival of hepatocytes isolated from carcinogen-treated rats. *Exp Cell Res* 157:15-28
- Schweichel JU, Merker HJ (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7:253-266
- Seimiya H (2006) The telomeric PARP, tankyrases, as targets for cancer therapy. *Br J Cancer* 94:341-345
- Serra C, Vizoso F, Alonso L, Rodriguez JC, Gonzalez LO, Fernandez M, Lamelas ML, Sanchez LM, Garcia-Muniz JL, Baltasar A, Medrano J (2002) Expression and prognostic significance of lysozyme in male breast cancer. *Breast Cancer Res* 4:R16
- Shall S, de Murcia G (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 460:1-15
- Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X (2004) Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:18030-18035
- Sheikh MS, Burns TF, Huang Y, Wu GS, Amundson S, Brooks KS, Fornace AJ, Jr., el-Deiry WS (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* 58:1593-1598
- Sheikh MS, Huang Y, Fernandez-Salas EA, El-Deiry WS, Friess H, Amundson S, Yin J, Meltzer SJ, Holbrook NJ, Fornace AJ, Jr. (1999) The antiapoptotic decoy receptor TRID/TRAIL-R3 is a p53-regulated DNA damage-inducible gene that is overexpressed in primary tumors of the gastrointestinal tract. *Oncogene* 18:4153-4159
- Shieh WM, Ame JC, Wilson MV, Wang ZQ, Koh DW, Jacobson MK, Jacobson EL (1998) Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J Biol Chem* 273:30069-30072
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6:1221-1228
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399:483-487
- Simbulan-Rosenthal CM, Ly DH, Rosenthal DS, Konopka G, Luo R, Wang ZQ, Schultz PG, Smulson ME (2000) Misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11274-11279

- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Hilz H, Hickey R, Malkas L, Applegren N, Wu Y, Bers G, Smulson ME (1996) The expression of poly(ADP-ribose) polymerase during differentiation-linked DNA replication reveals that it is a component of the multiprotein DNA replication complex. *Biochemistry* 35:11622-11633
- Sionov RV, Haupt Y (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18:6145-6157
- Smith S, de Lange T (2000) Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* 10:1299-1302
- Smith S, Giriati I, Schmitt A, de Lange T (1998) Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282:1484-1487
- Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE (2000) An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14376-14381
- Sperandio S, Poksay K, de Belle I, Lafuente MJ, Liu B, Nasir J, Bredesen DE (2004) Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix. *Cell Death Differ* 11:1066-1075
- Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69:217-245
- Strojsnajder RP, Jesko H, Zambrzycka A (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase: the nuclear target in signal transduction and its role in brain ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol* 31:149-167
- Suzuki H, Quesada P, Farina B, Leone E (1986) In vitro poly(ADP-ribosyl)ation of seminal ribonuclease. *J Biol Chem* 261:6048-6055
- Szabo C, Virág L, Cuzzocrea S, Scott GS, Hake P, O'Connor MP, Zingarelli B, Salzman A, Kun E (1998) Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly(ADP-ribose) synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3867-3872
- Takeuchi H, Kondo Y, Fujiwara K, Kanzawa T, Aoki H, Mills GB, Kondo S (2005) Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res* 65:3336-3346
- Tanuma S, Yagi T, Johnson GS (1985) Endogenous ADP ribosylation of high mobility group proteins 1 and 2 and histone H1 following DNA damage in intact cells. *Arch Biochem Biophys* 237:38-42
- Tanuma SI, Enomoto T, Yamada MA (1978) Changes in the level of poly ADP-ribosylation during a cell cycle. *Exp Cell Res* 117:421-430
- Trucco C, Oliver FJ, de Murcia G, Menissier-de Murcia J (1998) DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Res* 26:2644-2649
- Tulin A, Spradling A (2003) Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at Drosophila puff loci. *Science* 299:560-562

- Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R, Greenberg AH (2000) BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol* 20:5454-5468
- Virág L (2005) Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Curr Vasc Pharmacol* 3:209-214
- Virág L, Szabo C (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54:375-429
- Waldman T, Zhang Y, Dillehay L, Yu J, Kinzler K, Vogelstein B, Williams J (1997) Cell-cycle arrest versus cell death in cancer therapy. *Nat Med* 3:1034-1036
- Wallace-Brodeur RR, Lowe SW (1999) Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci* 55:64-75
- Wang H, Shimoji M, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL (2003) Apoptosis inducing factor and PARP-mediated injury in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:132-139
- Wang H, Yu SW, Koh DW, Lew J, Coombs C, Bowers W, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2004a) Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J Neurosci* 24:10963-10973
- Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y, Xue D (2002) Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 298:1587-1592
- Wang Y, Li X, Wang L, Ding P, Zhang Y, Han W, Ma D (2004b) An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression. *J Cell Sci* 117:1525-1532
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292:727-730
- Wen S, Stolarov J, Myers MP, Su JD, Wigler MH, Tonks NK, Durden DL (2001) PTEN controls tumor-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4622-4627
- Wesierska-Gadek J, Schmid G (2001) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the stability of the wild-type p53 protein. *Cell Mol Biol Lett* 6:117-140
- Whitacre CM, Hashimoto H, Tsai ML, Chatterjee S, Berger SJ, Berger NA (1995) Involvement of NAD-poly(ADP-ribose) metabolism in p53 regulation and its consequences. *Cancer Res* 55:3697-3701
- Wilson-Annan J, O'Reilly LA, Crawford SA, Hausmann G, Beaumont JG, Parma LP, Chen L, Lackmann M, Lithgow T, Hinds MG, Day CL, Adams JM, Huang DC (2003) Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *J Cell Biol* 162:877-887

- Willis SN, Adams JM (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17:617-625
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306
- Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM (2001) Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis. *Curr Biol* 11:361-365
- Yanagisawa H, Miyashita T, Nakano Y, Yamamoto D (2003) HSpin1, a transmembrane protein interacting with Bcl-2/Bcl-xL, induces a caspase-independent autophagic cell death. *Cell Death Differ* 10:798-807
- Yang YP, Liang ZQ, Gu ZL, Qin ZH (2005) Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin* 26:1421-1434
- Yao KC, Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, Kondo S, Germano IM (2003) Molecular response of human glioblastoma multiforme cells to ionizing radiation: cell cycle arrest, modulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, and autophagy. *J Neurosurg* 98:378-384
- Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H (2002) DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* 9:680-684
- Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van Dyke T (1997) Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature* 385:637-640
- Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ (2004) Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 304:1500-1502
- Yu SW, Wang H, Dawson TM, Dawson VL (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 14:303-317
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297:259-263
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15077-15082
- Zha H, Aime-Sempe C, Sato T, Reed JC (1996) Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *J Biol Chem* 271:7440-7444
- Zhang X, Chen J, Graham SH, Du L, Kochanek PM, Draviam R, Guo F, Nathaniel PD, Szabo C, Watkins SC, Clark RS (2002) Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor

- (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite. *J Neurochem* 82:181-191
- Zhong H, Simons JW (1999) Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 259:523-526
- Zingarelli B, Salzman AL, Szabo C (1998) Genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 83:85-94



## **PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO**



## **ANTECEDENTES**

La proteína PARP-1 [poli (ADP-ribosa) polimerasa-1], es el principal miembro de una familia de enzimas que poseen la capacidad de modificación post-transduccional de proteínas por poli (ADP-ribosilación) utilizando el compuesto NAD<sup>+</sup> como sustrato. La unión de PARP-1 a las roturas en el ADN, activa la capacidad catalítica del enzima, que pone en marcha la modificación por unión covalente de polímeros de ADP-ribosa de un amplio conjunto de proteínas nucleares implicadas principalmente en el mantenimiento de la arquitectura de la cromatina y en la reparación de daños en el ADN. Se han identificado 18 miembros pertenecientes a la familia PARP, pero sólo, PARP-1 y PARP-2 resultan activadas tras la identificación de daños en el ADN.

La proteína PARP-1 ha sido relacionada con los procesos de muerte celular a diferentes niveles. Así, en condiciones de daño genotóxico moderado, los procesos de reparación activados por PARP-1 constituyen un efecto de resistencia frente a la terapia antitumoral. Se ha demostrado que la inhibición de PARP está asociada con el incremento de sensibilidad frente a agentes alquilantes, inhibidores de la topoisomerasa I y a la radiación ionizante, pero no se dispone de información concluyente acerca de su posible implicación en la potenciación del efecto citotóxico de otros agentes antitumorales, como por ejemplo, de los inhibidores de la topoisomerasa II entre los que cabe destacar la doxorrubicina. Sabemos también que en presencia de un elevado número de lesiones en el ADN, la sobre-activación de PARP-1 induce la activación de procesos de muerte celular en ciertas patologías de origen inflamatorio (ictus cerebral, isquemia de miocardio, diabetes, disfunción cardiaca asociada a diabetes, choque séptico, artritis, colitis, etc.).

## **HIPÓTESIS**

Debido a la interesante implicación de PARP-1 en los procesos de muerte celular relacionados con las patologías antes indicadas nos parece de gran interés:

1. Conocer en profundidad la relación entre la activación de PARP-1 y la muerte celular, así como los mecanismos moleculares que acontecen en la sensibilización frente a agentes antitumorales utilizados en la práctica clínica.

2. Identificar el mecanismo celular de muerte asociado a la sobre-activación de PARP-1, que ocurre como complicación asociada a diversas patologías inflamatorias.

Las ideas anteriores han dado origen a la hipótesis de este trabajo que formulamos a continuación:

La proteína PARP-1 participa en la modulación de los procesos de muerte celular en función de la magnitud del daño producido sobre el ADN.

## **OBJETIVOS**

Para verificar la hipótesis anterior hemos realizado el trabajo que aquí se presenta y que resumimos enunciando sus objetivos:

1. Estudiar en modelos celulares de cáncer de mama deficientes en la proteína p53 la activación de PARP-1 tras el tratamiento con el inhibidor de la topoisomerasa II, doxorrubicina.
2. Identificar el papel de PARP-1 en la muerte celular producida por doxorrubicina en este modelo tumoral mediante el empleo de inhibidores químicos de la actividad de poli (ADP-ribosilación).
3. Definir el mecanismo a través del cual la inhibición de PARP-1 sensibiliza a las células tumorales frente a la citotoxicidad inducida por doxorrubicina e identificar los posibles efectores y las características principales del tipo de muerte celular inducida a través del estudio de:
  - La ruta intrínseca o mitocondrial apoptótica.
  - La activación del factor de transcripción NF-κB tras el tratamiento con inhibidores de PARP y su implicación en la muerte celular producida tras el tratamiento con doxorrubicina.
  - Las deficiencias en la de reparación de daños en el ADN como posible mecanismo de la sensibilización frente a doxorrubicina ejercida por el inhibidor de PARP.

4. Estudiar en modelos celulares de fibroblastos murinos inmortalizados, normales y deficientes en la proteína PARP-1, la activación de PARP-1 tras el tratamiento con el inhibidor de la topoisomerasa II, doxorrubicina.
5. Analizar la implicación de PARP-1 en la modulación de los procesos de muerte celular en función del daño inducido por diferentes concentraciones del agente antitumoral.
6. Identificar el papel de PARP-1 en la muerte celular producida en situaciones de daño moderadamente elevado en el ADN en el modelo celular de fibroblastos murinos inmortalizados normales y deficientes en PARP-1 y mediante el uso de inhibidores químicos.
7. Analizar el mecanismo de muerte celular dependiente de la activación de PARP-1 a través del estudio de:
  - La muerte celular por apoptosis.
  - El análisis de los niveles energéticos tras el tratamiento con doxorrubicina en el modelo celular y su relación con la muerte celular por necrosis.
  - El análisis de la muerte celular por autofagia como posible mecanismo de la sensibilización frente a doxorrubicina en células que expresan PARP-1.

El trabajo que se resume en esta memoria de en esta memoria de Tesis Doctoral pretende contribuir al conocimiento de la implicación de la proteína PARP-1 en los procesos de muerte celular en función de la magnitud del daño provocado en el ADN así como en sus mecanismos de inducción.



## **CAPÍTULO I**

**LA INHIBICIÓN DE PARP-1 SENSIBILIZA A LAS  
CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA DEFICIENTES EN p53  
A APOPTOSIS INDUCIDA POR DOXORRUBICINA**



## 1.1.- RESUMEN

La proteína nuclear PARP-1 está implicada en los procesos de reconocimiento y reparación de las lesiones que afectan al ADN. La ausencia de control del crecimiento celular por defectos de los mecanismos apoptóticos proporciona ventajas de supervivencia a las células tumorales. La proteína supresora de tumores p53 juega un papel central en la regulación del crecimiento y muerte celular. Deficiencias en p53 proporcionan a las células que las poseen resistencia al tratamiento antitumoral. En este trabajo hemos investigado los efectos de la inhibición de PARP sobre la citotoxicidad de doxorrubicina a través del estudio del mecanismo de sensibilización de las células tratadas con doxorrubicina y con el inhibidor químico de PARP (4-amino 1,8-naftalimida, ANI).

Nuestros datos demuestran que doxorrubicina induce una rápida activación de PARP y una moderada muerte celular que es potenciada considerablemente mediante el uso de inhibidores químicos de PARP. La magnitud de la potenciación es de 2.3 veces en ensayos de muerte realizados a 24 horas y de 21 veces mediante ensayos de formación de colonias (20 días tras el tratamiento). Se ha demostrado que la potenciación de la muerte celular inducida por doxorrubicina tras el tratamiento con el inhibidor de PARP es dependiente de la activación de las caspasas. También se ha demostrado que la incorporación de Bax a la mitocondria, que la liberación mitocondrial de citocromo-c, que el aumento de la despolarización de la membrana mitocondrial y que la activación de caspasa-3 son mecanismos moleculares que se ven incrementados mediante el uso de inhibidores de PARP tras el tratamiento con doxorrubicina.

Mediante la inhibición de PARP se puede conseguir la sensibilización de células de cáncer de mama deficientes en p53 y resistentes a quimioterapia, a través de la inhibición de la reparación del ADN, la acumulación del daño en el genoma y, de ello, el aumento de la muerte celular por apoptosis.



## 1.2.- INTRODUCCIÓN

Las células tumorales, además de escapar tanto del control interno como externo que regula su proliferación, presentan defectos en los procesos de muerte celular por apoptosis (Johnstone et al. 2002). Para que las células adquieran la capacidad tumoral es necesario el aumento de la proliferación celular acompañado del descenso de la tasa de muerte. En cáncer de mama, la alteración de la vía apoptótica incluye la regulación negativa de la ruta de receptores de muerte, la sobre-expresión de Bcl-2 y la mutación de p53 (Krajewski et al. 1999; Geisler et al. 2001; Shin et al. 2001). El objetivo de los tratamientos antitumorales, como la quimioterapia, la radiación ionizante y la terapia hormonal, es promover la muerte celular por apoptosis de las células cancerosas (Makin and Dive 2001). Las deficiencias en el gen supresor de tumores p53 confieren resistencia a tratamientos quimioterapéuticos, como es el caso de doxorrubicina (doxo) (Aas et al. 1996), una potente antraciclina ampliamente usada en protocolos clínicos antineoplásicos.

La proteína PARP-1 [poli (ADP-ribosa) polimerasa-1], es el principal miembro de una familia de enzimas que poseen la capacidad de modificación post-transduccional de proteínas por poli (ADP-ribosilación) (Ame et al. 2004). PARP-1 es una proteína nuclear altamente expresada, que es capaz de detectar y unirse rápidamente a roturas de cadena simple y doble en el ADN, generadas por diferentes agentes genotóxicos. La unión de PARP-1 a las roturas en el ADN, activa la capacidad catalítica del enzima, que produce la modificación por unión covalente de polímeros de ADP-ribosa sobre diferentes proteínas nucleares implicadas principalmente en el mantenimiento de la arquitectura de la cromatina y la en reparación de daños en el ADN,. Se ha descrito que PARP-1 se asocia *in vivo* con XRCC1, una proteína de reparación de DNA, que junto con la DNA polimerasa β y la DNA ligasa III están implicadas en el sistema de Reparación por Escisión de Bases (BER) (Dantzer et al. 2000). Deficiencias en PARP-1 implica tener defectos en los procesos de reparación mediados por BER y a inestabilidad genómica, sugiriendo que PARP-1 juega un papel primordial en la respuesta celular a daños en el ADN (de Murcia et al. 1997; Shall and de Murcia 2000).

Se ha suscitado un gran interés en el desarrollo de nuevos compuestos químicos con actividad inhibitoria de PARP debido a las potenciales aplicaciones clínicas de los mismos (Virag and Szabo 2002; Beneke et al. 2004; Curtin 2005; Graziani et al. 2005). ANI (4-amino-1,8-naftalimida) representa uno de los compuestos de última

generación y actúa como un potente inhibidor de la actividad de PARP ( $IC_{50} = 180$  nM). Estudios realizados con ANI sobre modelos celulares tumorales humanos *in vitro* y en modelos de xenógrafos en ratones inmuno-suprimidos con radiación ionizante, muestran una potenciación de los efectos citotóxicos producidos por la radiación (Schlicker et al. 1999; Noel et al. 2006). Además, el uso de diferentes inhibidores de PARP junto con otros agentes genotóxicos como los inhibidores de la topoisomerasa-1 (topotecan) y ciertos agentes alquilantes (MMNG, MNU y temozolomida), produce el mismo efecto sensibilizador (Calabrese et al. 2004; Smith et al. 2005). Sin embargo, la información científica disponible sobre el tratamiento combinado con los inhibidores de la topoisomerasa II y PARP es controvertido y nada concluyente (Tentori and Graziani 2005). Entre otras cosas se ha descrito que el tratamiento con inhibidores de PARP no repercute en ningún efecto de sensibilización de la citotoxicidad inducida por el compuesto etopóxido (inhibidor de la topoisomerasa II) (Bowman et al. 2001). No obstante, líneas celulares deficientes en PARP-1 presentan una elevada sensibilidad a C-1305, un nuevo compuesto inhibidor de la topoisomerasa II (Wesierska-Gadek et al. 2004). La apoptosis es una de las vías más importantes a través de las cuales los agentes quimioterapéuticos retrasan el crecimiento tumoral. Hasta la fecha, los trabajos con inhibidores esta proteína se han limitado al estudio de la sensibilización celular frente a los agentes antitumorales, pero no han profundizado en el mecanismo de muerte celular inducido. Ello obvia a determinar el mecanismo molecular por el cual la inhibición de PARP ejerce su efecto biológico en los procesos de muerte celular.

El objetivo del presente estudio ha sido determinar si ANI potencia el efecto citotóxico de doxorrubicina, una potente antraciclina muy utilizada en protocolos clínicos antitumorales que actúa como inhibidor de la topoisomerasa II, en modelos celulares de cáncer de mama deficientes en p53 y resistentes a la radio- y a la quimioterapia, así como dilucidar el mecanismo molecular de muerte celular inducido por la combinación de ANI y doxorrubicina. Nuestros resultados demuestran que doxo produce una rápida activación de PARP-1 y una moderada muerte celular, la cual resulta considerablemente potenciada por la adición ANI, a través del incremento de la ruta mitocondrial de la apoptosis.

Por otra parte, el uso de inhibidores de PARP protege los tejidos normales no tumorales de los efectos tóxicos derivados del uso de la quimioterapia. El principal problema del uso de las antraciclinas y en concreto de la doxorrubicina es la toxicidad cardiaca que presenta. El uso de inhibidores de PARP protege de los efectos

cardiotóxicos producidos por doxorrubicina, tanto a corto plazo, como los que aparecen tiempo después del cese del tratamiento, sin reducción del efecto sensibilizador de la citotoxicidad de esta antraciclina (Pacher et al. 2002; Szenczi et al. 2005). Otro ejemplo lo constituye el efecto protector de los inhibidores de PARP frente a los efectos secundarios de toxicidad de riñón originada por el uso de anti-neoplásico cisplatino, sin afectar a su eficacia antitumoral (Racz et al. 2002).

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que la inhibición de PARP puede representar una forma novedosa de sensibilizar células de cáncer de mama deficientes en p53 al tratamiento con doxorrubicina y de evitar los posibles efectos adversos derivados del uso de las antraciclinas.

## 1.3.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.3.1.- Cultivos celulares

Las líneas celulares EVSA-T y MDA-MB-231 [células derivadas de cáncer de mama deficientes en p53 (Ruiz-Ruiz and Lopez-Rivas 1999; Ostrakhovitch and Cherian 2004)] fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 40 µg/l del antibiótico Gentamicina en un incubador a 37 °C en una atmósfera saturada de humedad con el 5% en CO<sub>2</sub>, tripsinizandolas y replicandolas cuando procedía. Todos los tratamientos en este trabajo se llevaron a cabo sobre cultivos en fase de crecimiento exponencial cuyas células fueron sembradas con 24 horas de antelación al tratamiento.

### 1.3.2.- Reactivos y tratamientos celulares

Las células fueron tratadas con la concentración de doxo indicada en cada gráfico (Ferrer Farma, Barcelona, España), durante una hora en medio DMEM suplementado con 10% FBS a 37 °C en una atmósfera humidificada y con 5% de CO<sub>2</sub>. El inhibidor de PARP, 4-amino-1,8-naftalimida (ANI, Alexis, Lausen, Suiza) fue disuelto en medio de cultivo suplementado con 10 % FBS inmediatamente antes de su uso a una concentración de 10 µM. Las soluciones de ANI (10 µM) contienen < 2% DMSO con el objetivo de mejorar su solubilidad. El tratamiento se inició exponiendo a las células previamente con ANI y tras una hora se procedió con la incubación con doxo. ANI estuvo presente en el medio de cultivo durante todo el tiempo que transcurrió el experimento. El inhibidor de general de las caspasas z-VAD-FMK [z-Val-Ala-Asp-(oMe)-FMK, Calbiochem, San Diego, CA], fue usado a la concentración de 50 µM y añadido dos horas antes del tratamiento con doxo y estuvo presente a lo largo de todo el experimento en el medio de cultivo.

### 1.3.3.- Análisis de la viabilidad celular y apoptosis

La viabilidad celular fue evaluada por el método colorimétrico de la sulforrodamina B siguiendo el protocolo previamente descrito por (Valenzuela et al. 1995). 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  $\text{Ca}^{+2}$ . Las células se sembraron 24 horas antes de los tratamientos con una densidad de 75.000 células/pocillo sobre cajas de cultivo de 6 pocillos (Nunc). Después de los tratamientos pertinentes, las células se recogieron usando Tripsina-EDTA, se lavaron con el tampón PBS a 4 °C y se resuspendieron en 100 µl del tampón de incubación de Anexina-V (10 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>). A continuación se adicionaron 5 µl Anexina-V-FLUOS (Roche Molecular Biochemicals), a temperatura ambiente. Transcurridos 15 minutos, se añadieron otros 100 µl del tampón de incubación de Anexina-V. La externalización de fosfatidilserina se determinó por citometría de flujo en el aparato tri-laser FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson), mediante el análisis de la población en FL1 en la que la emite Anexina-V-Fluos, usando el software CellQuest (Becton Dickinson Mountain View, CA, U.S.A.).

Otro método utilizado para el estudio de la apoptosis consistió en el análisis de la población Sub-G<sub>1</sub> (células hipodiploides), por citometría de flujo mediante la tinción del ADN con el colorante Ioduro de Propidio (IP). Tras los tratamientos pertinentes, las células se recogieron usando Tripsina-EDTA, se lavaron con el tampón PBS a 4 °C y se resuspendieron en 100 µl de dicho tampón. Las células se fijaron y permeabilizaron con 900 µl de una solución a 4 °C de etanol al 70% durante 5 minutos, transcurridos los cuales se les añadió 200 µl de solución de extracción de ADN (0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1 M ácido cítrico, pH 7.8) y se incubaron durante 10 min a 37°C. Después de centrifugar y lavar 2 veces con tampón PBS las células se resuspendieron en 250 µl de la solución IP/RNasa (PBS, 100 µg/ml RNasa, 40 µg/ml IP) durante 30 minutos a 37 °C en oscuridad. Las células apoptóticas se detectaron y cuantificaron en la región del ciclo celular con menor contenido en ADN que las células correspondientes al pico G1. La citometría de flujo fue realizada en un citómetro tri-laser FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) y el análisis se realizó con el programa Cell Quest (Becton Dickinson, Mountain View, CA, U.S.A.).

### 1.3.4.- Ensayos de formación de colonias

Para la realización de los estudios de supervivencia celular tras tratamiento con el agente quimioterapéutico, las células, en fase de crecimiento exponencial fueron trisnizadas y un número adecuado de ellas se sembró sobre frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. 24 horas después fueron expuestas a diferentes concentraciones crecientes de doxo durante una hora. Tras esto, las células fueron incubadas con ANI (10 µM) en medio de cultivo DMEN suplementado con 10% en FBS, durante todo el tiempo que duró el experimento. Transcurridos 15 días del tratamiento, se eliminó el medio de cultivo y las colonias se tiñeron con el método colorímetro de Cristal Violeta [2 % de violeta de Genciana (Sigma) en etanol absoluto]. Se consideró como colonia superviviente formada a aquellas agrupaciones de más de 50 células. La fracción de supervivencia fue determinada a partir del número de células sembradas de partida y el número de colonias formado tras el tratamiento y corregida por la eficiencia de formación de colonias de los controles (placas correspondientes a las células no sometidas a tratamiento).

$$\text{Fracción de supervivencia (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ colonias formadas} \times 100}{n^{\circ} \text{ células sembradas} \times EC}$$

$$\text{Eficiencia de clonaje del control (EC)} = \frac{n^{\circ} \text{ colonias formadas (control)}}{n^{\circ} \text{ células sembradas (control)}}$$

### 1.3.5.- Técnicas de inmunofluorescencia

Para la determinación de la activación de PARP se realizaron técnicas de inmunofluorescencia para la determinación de la activación de PARP basándose en la detección de la formación de polímeros de poli (ADP-ribosa) (PAR), en células que se habían hecho crecer sobre laminillas cubre objetos. Las células fueron fijadas al soporte y permeabilizadas a 4 °C durante 10 minutos con la solución metanol-acetona (1:1). Como anticuerpo primario se utilizó el monoclonal 10H (monoclonal generado en ratón, Alexis, Lausen, Suiza) y como anticuerpo secundario se utilizó un Anti-ratón, conjugado con el fluorocromo FITC (anti-ratón generado en cabra, Sigma, St Louis Mo). Los núcleos se tiñeron con Ioduro de propidio (IP) después de retirar el exceso de

anticuerpo secundario. Las células inmunoteñidas fueron visualizadas con el microscopio Leica Spectral Confocal Láser, obteniéndose imágenes representativas de cada condición.

### 1.3.6.- Inmunodetección de proteínas por Western Blot

Las células fueron despegadas del frasco de cultivo mediante raspado mecánico, lavadas en solución PBS a 4 °C y resuspendidas en 50 µl de solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 12.5 mM β-mercptoetanol) durante 30 minutos a 0 °C. Los restos membranosos y de ADN se eliminaron por centrifugación y en el sobre-nadante se cuantificaron las proteínas totales mediante el método Bradford. Para ello, se realizó una curva patrón de concentración crecientes de BSA (Sigma), desde 1 mg/ml hasta 10 mg/ml. 1 µl de extracto celular se añadió a 200 µl de solución Bradford 1X (Bio-Rad), los ensayos se realizaron por triplicado. La densidad óptica resultante se midió a 596 nm en un detector de ELISA (Molecular Devices). Para cada muestra se obtuvo un valor de densidad óptica que fue transformado en concentración tomando como referencia la densidad óptica proporcionada por muestras de concentración conocida (recta patrón). Estos valores sirvieron de referencia para ajustar la concentración de proteínas de los distintos extractos celulares. Una vez igualada la concentración (50 µg para cada muestra), se añadió tampón de carga de proteínas (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 6 M urea, 6% β-mercptoetanol, 3% SDS, 0.003% azul de bromofenol). Posteriormente se realizó una electroforesis mediante gel de SDS-poliacrilamida al 12% para separar las proteínas que se transfirieron después a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore) mediante la técnica de transferencia semiseca con el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad) a 100 mA durante 30 minutos. Para disminuir la fijación inespecífica de anticuerpos, la membrana fue bloqueada con una solución de leche en polvo al 5% en tampón PBS con 0.1% Tween-20 durante 30 minutos y posteriormente incubada durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos correspondientes: anti-poli(ADP-ribosa) (PAR) (BIOMOL), anti-PARP-1 (EGF-69, cedido por el Doctor Gilbert de Murcia, Estrasburgo, Francia), anti-Bax y anti-citocromo *c* (Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.), anti-α-tubulina (Sigma, St Louis Mo). Tras esta incubación, se retiró el anticuerpo primario y la membrana se lavó tres veces durante 5 minutos con tampón PBS/Tween 0.1%. Finalmente la

membrana se incubó durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con peroxidasa del rábano picante (HRP). Posteriormente, se procedió a un nuevo ciclo de tres lavados con PBS/Tween 0.1% y las bandas fueron visualizadas con el reactivo ECL-Plus (Amersham Biosciences), el cual produce junto con la peroxidasa del anticuerpo secundario una reacción de quimioluminiscencia que se registró utilizando el sistema de análisis de imagen ChemiDoc XRS System (BIO-RAD).

Para la detección de la liberación de citocromo-c de la mitocondria y la migración de Bax del citosol a la mitocondria, tras un estímulo apoptótico se introdujo una variante en el proceso de lisis celular. Tras el pertinente tratamiento, se procedió a la separación de la fracción membranosa (en la cual están incluidas las mitocondrias junto con otros orgánulos), de la fracción citosólica. Para ello, aproximadamente 500-000 células se lavaron con solución de PBS a 4 °C y se resuspendieron en 30 µl de solución de lisis a 4 °C (80 mM KCl, 250 mM sacarosa, 500 µg/ml digitonina, 0.1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 µg/ml de cada uno de los siguientes inhibidores de proteasas: leupeptina, aprotinina, pepstatina en PBS), durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, los lisados celulares fueron centrifugados a 10.000 x g durante 5 minutos y se recogieron los sobrenadantes que constituyeron la fracción citosólica. El precipitado obtenido (fracción membranosa), fue lavado con 1ml de solución fría de PBS y tras la centrifugación y eliminación del tampón de PBS, se le añadió la solución de carga de proteínas y se procedió a su disagregación mediante ultrasonidos (*sonnicación*). En la fracción citosólica se midieron proteínas totales de cada una de las muestras con el método Bradford y se les añadió solución de carga de proteínas. Finalmente, se cargaron 50 µg de proteínas de la fracción citosólica y un volumen proporcional con respecto a la fracción citosólica de la fracción mitocondrial. Con estos extractos se procedió a su análisis mediante la técnica de Western blot anteriormente descrita.

### **1.3.7.- Detección del potencial de membrana mitocondrial**

Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos 24 horas antes del tratamiento (200.000 células por pocillo). Después de este periodo, las células fueron tratadas con doxorrubicina (1 µg/ml) y con doxoxorrubicina (1 µg/ml) más ANI (10 µM). 24 y 48 horas después del tratamiento las células fueron recogidas usando una

solución de Tripsina-EDTA, lavadas con tampón PBS y resuspendidas en PBS con el colorante DIOC<sub>6</sub> (40 nM) durante 30 minutos a 37 °C. Las muestras se analizaron mediante la utilización del citómetro de flujo FACScan cytometer (Becton-Dickinson) y la fluorescencia fue detectada en FL1. Para el análisis de los datos, fue aplicada a los histogramas una marca que indica la población celular con bajo potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ) y el porcentaje de células en esta región fue determinado. El número de células con bajo potencial de membrana (que se corresponde con células tratadas con doxo y con doxo más ANI), fue representado como un porcentaje de células con respecto a células sin tratamiento (células control).

### 1.3.8.- Obtención de los extractos nucleares

El protocolo de obtención de extractos nucleares se basa en el descrito previamente por (Velasco et al. 1997). De manera resumida se procedió como sigue: las células se recogieron por raspado y se lavaron con tampón PBS a 4 °C. A continuación, se resuspendieron en 200 µl de tampón A [10 mM HEPES pH = 7.9 (Sigma); 1 mM EDTA (Merck), 1 mM EGTA (Sigma), 10 mM KCl (Merck), 1 mM DTT (Sigma), 1 mM PMSF (Sigma) y cóctel de inhibidores de proteasas (Roche), 1 pastilla/10 ml tampón] sobre hielo. Posteriormente, se utilizó un homogenizador (*dounzer*, Áfora) para romper las membranas plasmáticas de los disgregados, aplicándose 15 pulsos de homogenización en hielo. Tras la disgregación mecánica, se recuperó el homogenizado y se le añadió el detergente Igepal (Sigma), a una concentración final del 0.5% y se agitó vigorosamente la mezcla durante 15 segundos y tras lo cual, se incubó sobre hielo durante 10 minutos. A continuación, las muestras se centrifugaron a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido constituye la fracción citosólica que se guardó a -80 °C, mientras que el precipitado se resuspendió en 50 µl de tampón A contenido 20% de glicerol y 0.4 M de KCl. La fracción resuspendida se mezcló en un agitador orbital-vertical durante 30 minutos en cámara fría. Por último, la mezcla se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido de esta forma se corresponde con la fracción nuclear de proteínas.

La concentración de proteínas en los extractos nucleares se midió mediante la reacción colorimétrica de Bradford. Para ello, se realizó una curva patrón de concentración crecientes de BSA (Sigma), desde 1 mg/ml hasta 10 mg/ml. 1 µl de

extracto nuclear se añadió a 200 µl de solución Bradford 1X (Bio-Rad) por triplicado. La densidad óptica resultante se midió a 596 nm en un detector de ELISA (Molecular Devices). Para cada condición, la densidad óptica obtenida fue interpolada respecto a las densidades ópticas proporcionadas por los puntos de concentración conocida (curva patrón). De este modo, se obtuvo la concentración de los distintos extractos nucleares.

### 1.3.9.- Medidas de la activación de NF-κB mediante geles de retardo o Band-Shift

Se realizaron ensayos de geles de retardo o EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) para comprobar si la posible inactivación de NF-κB influía en los procesos de apoptosis tras inhibición de PARP. Se marcaron los oligonucleótidos con la secuencia de unión para NF-κB en el promotor del gen que codifica para iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) (5'-TGCTAGGGGGATTTCCCTCTTGT-3'-sentido y 5'-ACAAGAAGAGGGAAAATCCCCTAGCA-3'-antisentido) con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP utilizando la enzima polinucleótido quinasa T4 (Xie et al. 1994). La reacción de marcaje radiactivo se preparó a 4 °C para cada uno de los oligos, de tal modo que cada mezcla de reacción contuviese 1 µl de oligo, 1 µl de tampón de fosforilación 10X (Roche), 4.5 µl de agua destilada, 2.5 µl de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP y 1 µl de la enzima polinucleótido quinasa (10 U/µl, Roche). A continuación, las sondas se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Al final de este tiempo, se añadió a una de las sondas 90 µl de agua destilada y se mezcló con el contenido de la otra. La mezcla de reacción se calentó a 65°C durante 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 2 horas para lograr la hibridación de los oligos marcados. El resultado de esta reacción constituye la sonda marcada que fue purificada mediante filtración sobre una columna de Sephadex G25 (Amersham) por centrifugación a 2.500 r.p.m. durante 3 minutos. Para la medida del índice de radioactividad de la muestra, un microlitro de la sonda marcada fue introducido en viales de centelleo que contenían 2 ml de la solución de centelleo (Ecoscint™ H) y la medición se realizó en un contador de centelleo líquido LKB 1209 RackBeta. Se incubaron 250 ng de proteínas de los extractos nucleares con 2 µl de sonda <sup>32</sup>P-radiactiva (6 x 10<sup>4</sup> desintegraciones por minuto, dpm) en un volumen final de 20 µl de reacción durante 15 minutos a 4 °C de temperatura (Oliver et al. 1999). Cada tubo de reacción contenía los siguientes componentes: 5 µl de tampón de ensayo 4x (20% glicerol, 4 mM EDTA, 0.4 M KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM Tris-HCl pH=7.8 y 4

mM DTT), 1 µg de BSA, 1 µg de poli (dI-dC) (Roche), 250 ng de proteínas de los extractos nucleares, 60.000 d.p.m. de sonda marcada, completando con agua destilada hasta un volumen final de 20 µl. Los complejos DNA-proteína (DNA/NF-κB) se resolvieron en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 5% en 0.5x de tampón EDTA Tris-borato [1,65 ml bis/acrilamida 29:1 al 30%, (Bio-rad), 1 ml de glicerol (Sigma), 50 µl de persulfato amónico al 10% (Bio-rad), 48 µl TEMED (Bio-rad), 7.252 ml de tampón EDTA Tris-borato 0.5x], durante 2 horas a un voltaje constante de 100 voltios en hielo. A continuación los geles resultantes se secaron y se visualizaron por impresión en placa fotográfica tras una exposición de 24 horas a -80 °C. Se realizó un experimento de competición usando un exceso de concentración de diez veces de la sonda no marcada (sonda fría) con respecto a la sonda <sup>32</sup>P-radiactiva para comprobar que las señales obtenidas eran específicas.

### 1.3.10.- Determinación de roturas en el ADN mediante ensayo cometa

Para la detección de acumulación de daños en el ADN asociados a problemas en los sistemas de reparación se realizó la técnica de detección mediante ensayo cometa en condiciones básicas utilizando el kit *CometAssay™ Reagent Kit for Single Cell Gel Electrophoresis Assay Catalog 4250-050-K* (Trevigen; Gaithersburg, MD) según las instrucciones facilitadas por el fabricante. Bajo tales condiciones se pueden detectar roturas de cadena simple, cadena doble, sitios apurínicos y apirimidínicos (McNamee et al. 2000; Speit and Hartmann 2005). Las células se despegaron por raspado mecánico y se dispusieron a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml. La solución celular obtenida se combinó con agarosa de bajo punto de fusión (suministrada por el fabricante), en la proporción 1 a 10 (v/v) y se dispuso sobre cristales porta objetos (suministrados por el fabricante). A continuación, los cristales se sumergieron en solución de lisis (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, pH = 10, 10 mM Tris base, 1% lauril sarcosinato sódico y 1% Triton X-100) a 4 °C durante 30 minutos. Después del procesos de lisis, las células se sumergieron en solución alcalina (Por cada 50 ml de solución alcalina: NaOH 0.6 g, 250 µl de EDTA 200 mM pH:10, dH<sub>2</sub>O 49.75 ml), durante 45 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los cristales se equilibraron en solución TBE (40 mM Tris/ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8.3) y se procedió a la realización de electroforesis bajo las condiciones 1.0 V/cm durante 20 minutos. Finalmente, las

muestras se tiñeron durante 30 minutos con el colorante fluorescente SYBR®Green (suministrado por el fabricante). Para el análisis se contaron más de 800 núcleos de cada condición y se examinó el número de células que presentaban cometas positivas.

## 1.4.- RESULTADOS

### 1.4.1.- El tratamiento con doxorrubicina induce la activación de PARP-1

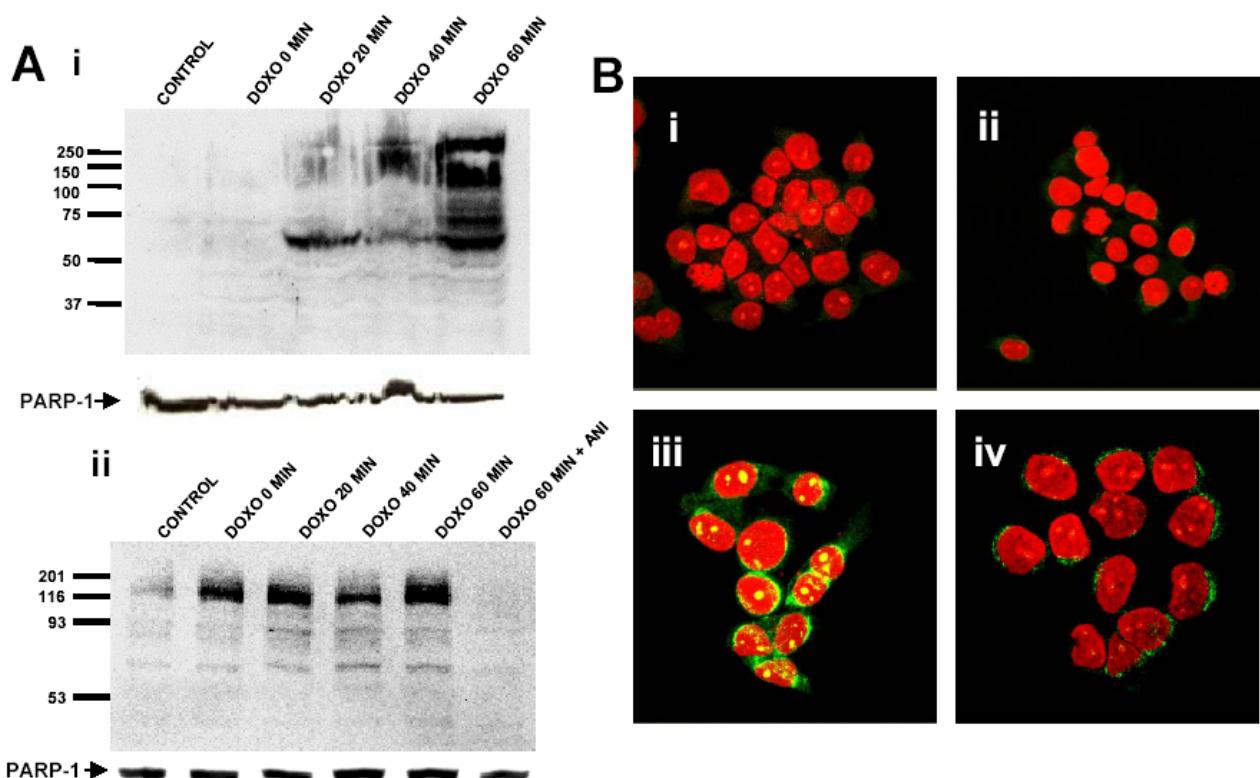
Se ha descrito que diferentes compuestos genotóxicos tienen la capacidad de activar PARP-1. Doxorrubicina es un poderoso agente quimioterapéutico que produce daños en el ADN sobre el cual no existen evidencias en la literatura de un efecto sobre la activación de PARP-1. La activación de PARP-1 puede contrarrestar la citotoxicidad producida por doxorrubicina a través de la estimulación de los procesos de reparación en las células tratadas, constituyendo por lo tanto, un mecanismo de defensa capaz de disminuir la eficiencia del tratamiento. En este sentido, se ha estudiado si doxo es capaz de activar PARP-1 y por lo tanto de activar la maquinaria de reparación del ADN dañado. Para ello se trataron las células tumorales de cáncer de mama deficientes en p53, EVSA-T y MDA-MB-231 con doxo a la concentración de 1 $\mu$ g/ml durante una hora, transcurrida la cual, se analizó la activación de PARP-1 mediante la medición por western blot y por inmunofluorescencia del polímero de poli (ADP-ribosa) a diferentes tiempos. Como podemos observar en la figura 1.1 [figura 1.1 A, western blot (i) EVSA-T y (ii) MDA-MB-231 o figura 1.1 B por inmunofluorescencia, EVSA-T], doxo induce la rápida activación de PARP-1 (20 minutos tras el tratamiento). El pre-tratamiento con el inhibidor de PARP, ANI a la concentración de 10  $\mu$ M contrarresta la activación de PARP-1 inducida por doxo [figura 1.1 A (ii) y 1.1 B (iv)].

### 1.4.2.- El tratamiento combinado de doxorrubicina y ANI potencia la muerte celular por apoptosis en líneas celulares tumorales y no en líneas celulares no tumorales

El co-tratamiento de las células de cáncer de mama deficientes en p53 con doxorrubicina más ANI potencia la muerte celular por apoptosis. Tanto EVSA-T como MDA-MB-231 son resistentes al tratamiento con un gran número de agentes quioterapéuticos, incluyendo a doxorubicina (Valenzuela et al. 1995; Ruiz-Ruiz and Lopez-Rivas 1999). En nuestro trabajo hemos realizado ensayos de dosis-respuesta medidos por supervivencia celular con el método colorimétrico de sulforrodamina B,

con el objetivo de obtener información y elegir la dosis de doxo para la cual estas células resultan afectadas por el tratamiento.

En ensayos de viabilidad a tiempos cortos, las células fueron completamente resistentes a dosis inferiores a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y comenzaron a sensibilizarse parcialmente a partir de dicha dosis (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a las 24 horas, figura 1.2 A). Estos resultados muestran que las células EVSA-T son poco sensibles a los efectos citotóxicos producidos por doxo, tal y como había sido previamente descrito. Como consecuencia de este experimento hemos elegido la dosis de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de doxorrubicina para el estudio del efecto de la combinación de doxorrubicina con el inhibidor de PARP.

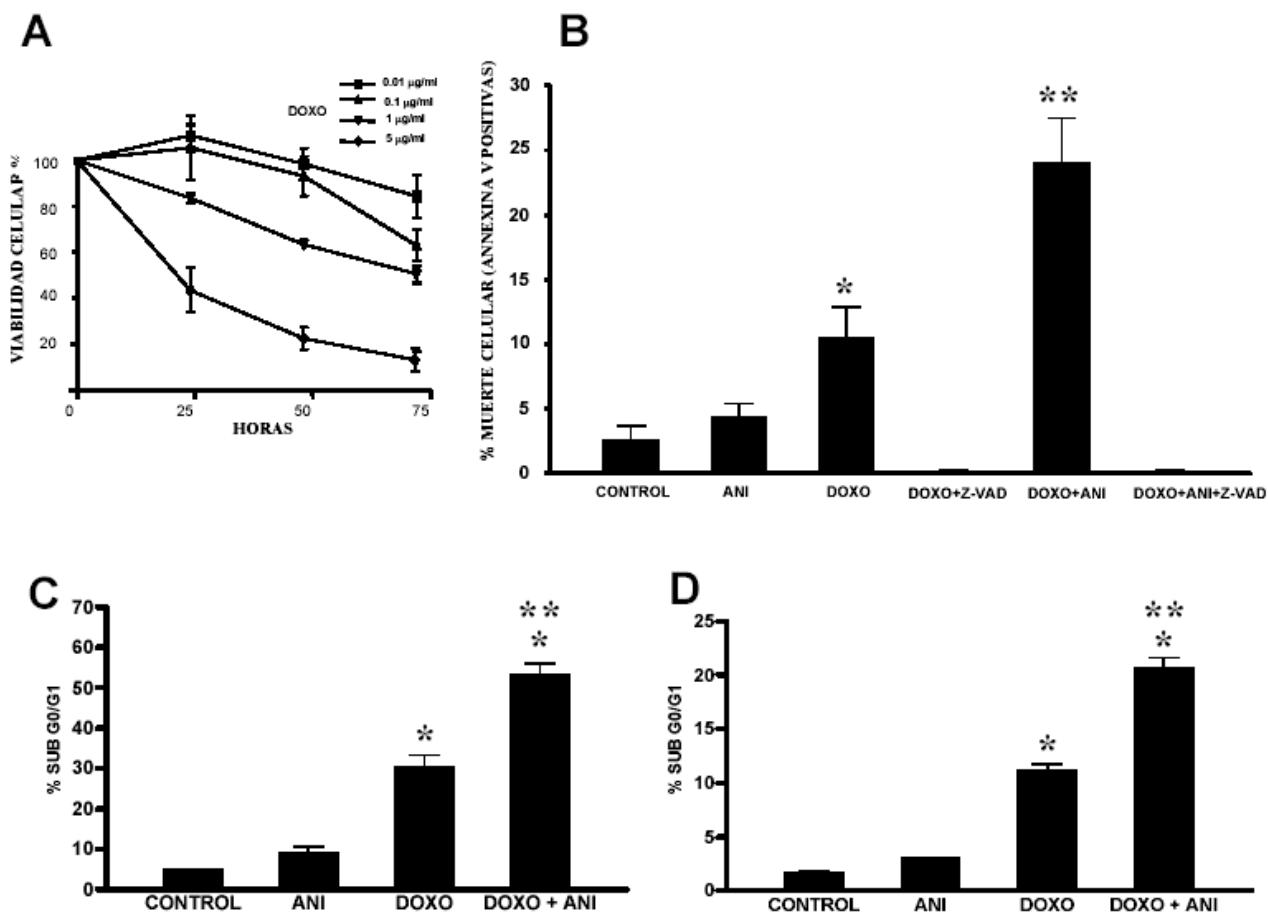


**Figura 1.1.- Activación de PARP inducida por el tratamiento con doxorrubicina.**

(A) Wester blot de la activación de PARP medida a través de la formación del polímero PAR a lo largo del tiempo en las líneas celulares: i) EVSA-T, ii) MDA-MB-231. El tratamiento realizado con doxo 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  fue de 1 hora. PARP-1 fue usado como control de carga. (B) Inmunofluorescencia sobre las células EVSA-T para la detección de la formación de poli (ADP-ribosa) (PAR) (verde). Los núcleos fueron teñidos con Ioduro de Propidio (rojo). Las condiciones presentes en el experimento fueron: i) control, ii) ANI 10  $\mu\text{M}$ , iii) células tratadas con doxo 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1 hora, iv) EVSA-T tratadas con doxo 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  + ANI 10  $\mu\text{M}$ . La superposición de las imágenes muestra que doxo induce la formación de PAR en los núcleos (amarillo), este efecto es reducido mediante el tratamiento con el inhibidor de PARP (ANI). Las células se cultivaron sobre laminillas cubre objetos y fueron fijadas 40 minutos después del tratamiento con doxo.

Posteriormente, se realizaron ensayos por citometría de flujo de anexina-V y sub G1 con el objetivo de evaluar la muerte celular a corto plazo (tiempos inferiores a 48 horas después del tratamiento) y ensayos de formación de colonias (*colony forming assay*, CFA) con el objetivo de medir el efecto citotóxico a tiempos largos (15 días después del tratamiento). En ambos casos, se evaluó el efecto sobre la muerte celular del tratamiento combinado de doxo y ANI en ambas líneas celulares (EVSA-T y MDA-MB-231). Los resultados demuestran que el tratamiento con ANI 10  $\mu\text{M}$  sensibiliza considerablemente a las células al proceso de muerte celular inducida por doxorrubicina a largo y a corto plazo, medido por los tres criterios indicados [figura 1.2 B (anexina V en EVSA-T), 1.2 C (sub G1 en EVSA-T), 1.2 D (sub G1 en MDA-MB-231) y 1.2 E (CFA en EVSA-T)]. La magnitud de la potenciación de la muerte celular fue de 2.3 veces, medido con anexina V (figura 1.2 B) y de 1.7 y 2 veces mediante ensayos de sub G1 (figura 1.2 C y D respectivamente). Es de destacar, la diferencia en la sensibilidad observada tras el tratamiento con ANI en los ensayos a largo plazo. Creemos que este tipo de ensayo describe mejor el efecto real del tratamiento combinado que el que resulta de la lectura de resultados de experimentos de supervivencia o muerte celular realizados a corto plazo. Así, dicha potenciación alcanza valores superiores a 20 veces si comparamos las  $\text{DL}_{50}$  (Dosis Letal para la cual se alcanza un valor de supervivencia del 50%,  $\text{DL}_{50 \text{ doxo}} = 0.231 \mu\text{g/ml}$  y  $\text{DL}_{50 \text{ doxo+ANI}} = 0.010 \mu\text{g/ml}$ ). La relevancia de estos valores radica en su posible interpretación clínica, es decir, se necesitaría una dosis 20 veces inferior de doxo en el tratamiento combinado con ANI para producir los mismos efectos citotóxicos que el tratamiento individualizado, pudiéndose reducir considerablemente los efectos secundarios adversos producidos por el uso de este fármaco antitumoral (figura 1.2 E). Además, el efecto de ANI fue completamente suprimido mediante el uso del inhibidor general de las caspasas Z-VAD-fmk (50  $\mu\text{M}$ , figura 1.2 B). Estos datos sugieren que el tratamiento combinado con ANI está activando y potenciando en algún punto la vía apoptótica.

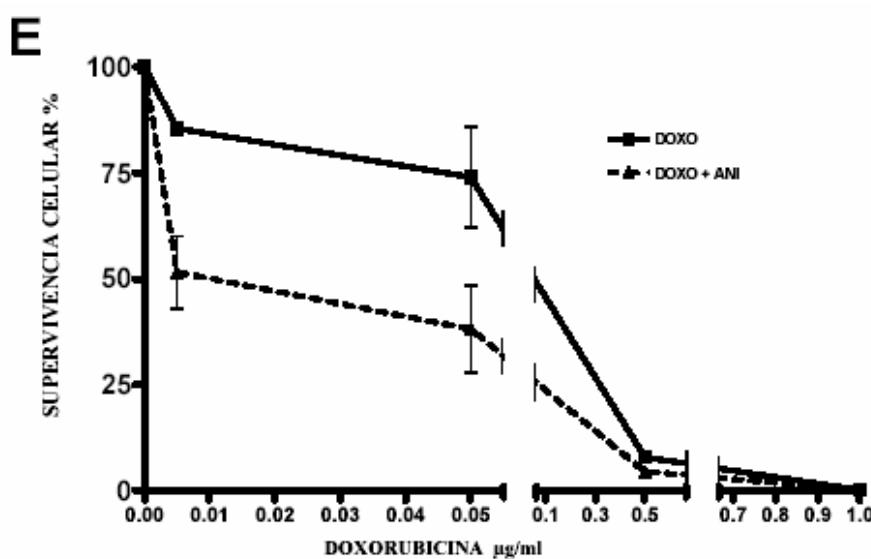
En la mayoría de los casos, los agentes genotóxicos inducen apoptosis a través de p53 mediante la activación de la migración a la mitocondria de la proteína citosólica pro-apoptótica de la familia Bcl-2, Bax (Schuler and Green 2001; Moll et al. 2005), la cual, como se ha indicado en el apartado de introducción coopera junto con otras proteínas Bcl-2 en la formación de poros mitocondriales y en la liberación de citocromo-c y otras proteínas apoptogénicas localizadas en el espacio intermembranal de la mitocondria, promoviendo la formación del complejo de activación de la caspasa



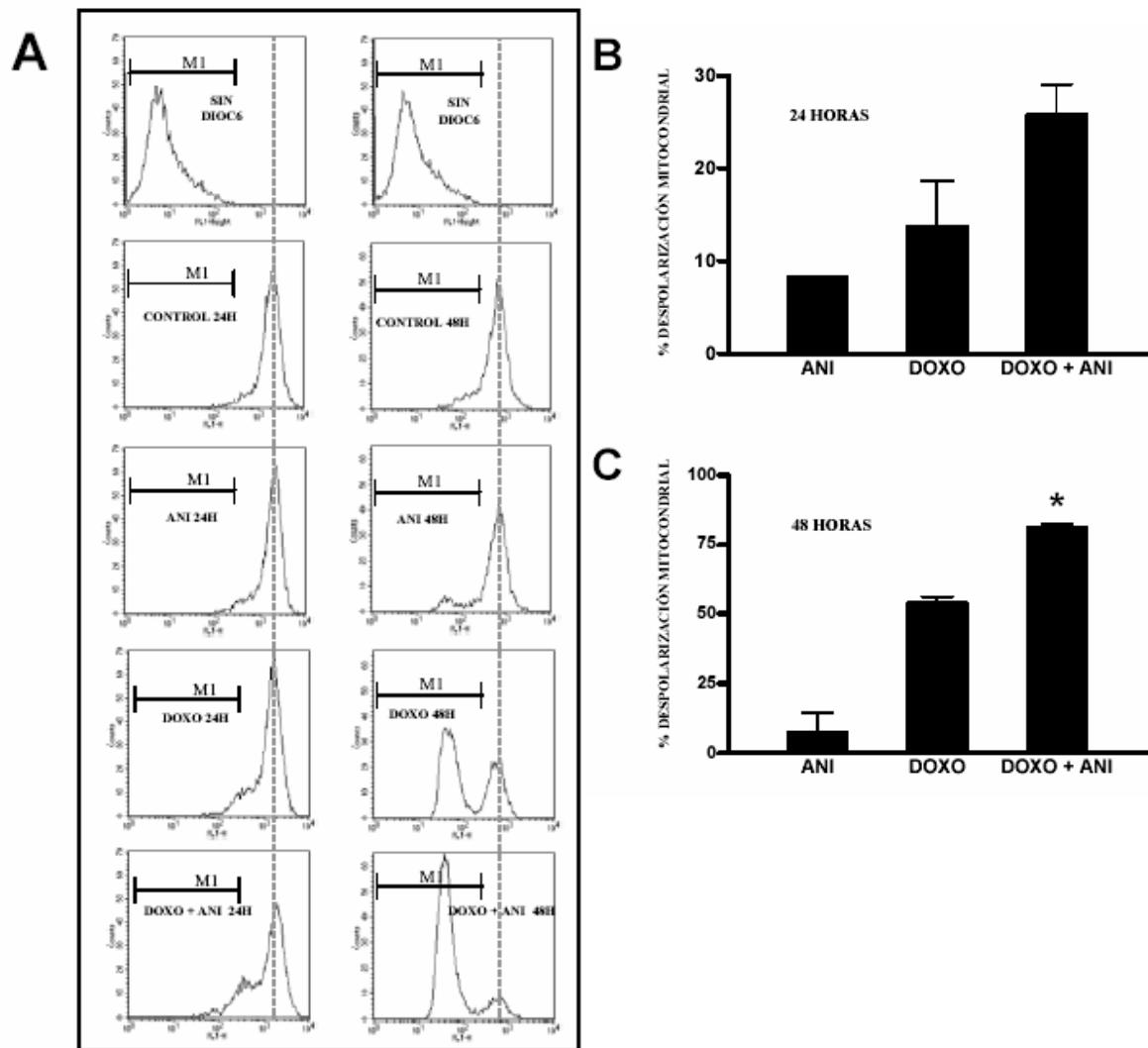
**Figura 1.2.- Efectos de la inhibición de PARP sobre la muerte celular tras el tratamiento con doxorubicina.** **(A)** La viabilidad celular en células EVSA-T fue medida por el ensayo de sulforrodamina B a diferentes tiempos (descrito en el apartado de material y métodos), en presencia de concentraciones crecientes de doxo; los resultados muestran la media de tres experimentos independientes. **(B)** Inducción de apoptosis 24 horas después del tratamiento con 1 µg/ml de doxo sobre la línea celular EVSA-T, medido por anexina-V mediante análisis de citometría de flujo. La inhibición de PARP con ANI (10 µM) ocasiona el incremento sustancial la muerte celular inducida por doxo (2.25 x). El uso del inhibidor general de las caspasas Z-VAD.fmk (50 µM), demuestra que la muerte celular inducida por doxo y por doxo y ANI es dependiente de la activación de las caspasas. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM), de al menos cuatro experimentos independientes. \* p<0.05 con respecto a la situación control, células tratadas con ANI y células con doxo + ANI. \*\* p<0.001 con respecto a las células control y células tratadas con ANI. **(C, D)** Análisis de la muerte celular 48 horas después del tratamiento con 1µg/ml de doxo en células EVSA-T (C) y MDA-MB-231 (D), medido por citometría de flujo mediante la tinción con ioduro de propidio (IP). El efecto citotóxico de doxo se incrementa por la inhibición de PARP en 1.7 veces en EVSA-T y 2 veces en las células MDA-MB-231. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM) de al menos cuatro experimentos independientes. \* p<0.001 con respecto a la condición control y células tratadas con ANI. \* \*p<0.001 con respecto a la condición de tratamiento con doxo.

iniciadora -9 (apoptosoma) y por lo tanto la ejecución del proceso apoptótico. Sin embargo, en este modelo celular deficiente en la proteína p53, la ruta de activación de Bax dependiente de p53 se encuentra bloqueada.

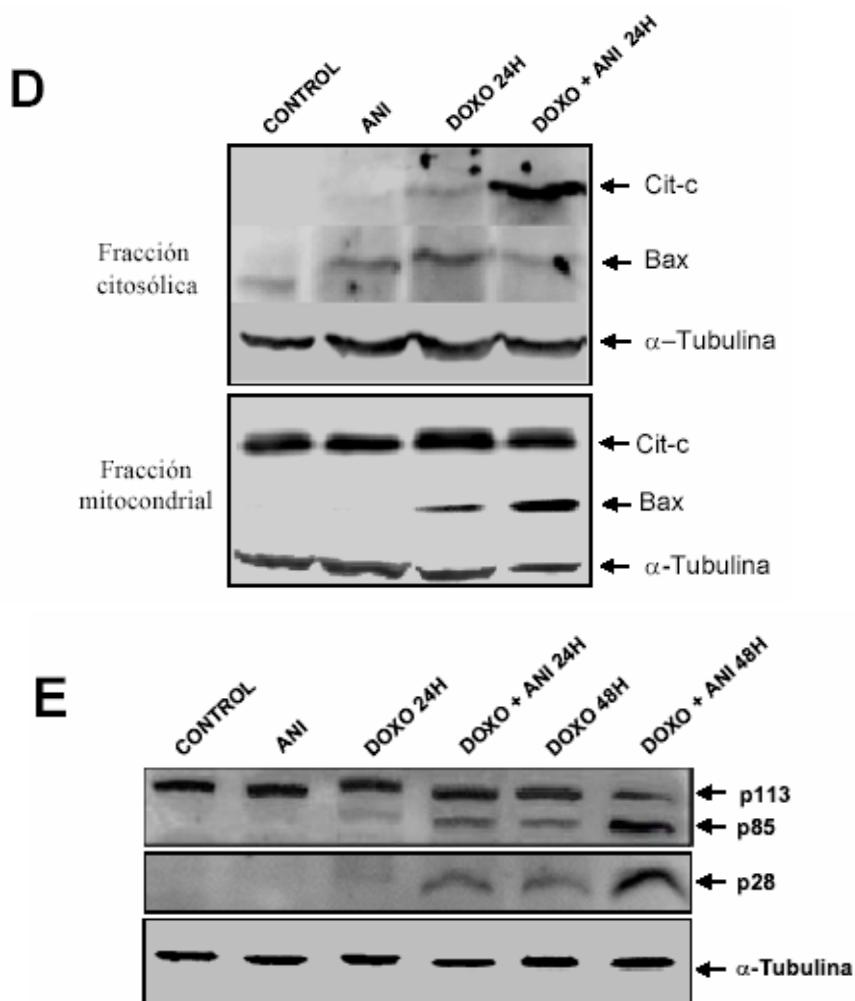
Con el objetivo de discernir si el uso de inhibidores de PARP podía activar la ruta mitocondrial de muerte celular apoptótica de forma independiente de p53, hemos realizado experimentos encaminados a analizar el potencial de membrana mitocondrial, el desplazamiento mitocondrial de Bax, la liberación mitocondrial de citocromo-c y la activación de la caspasa-3 medida de forma indirecta a través de la fragmentación de PARP-1. Este proceso ha sido descrito como una señal característica de la apoptosis y es llevado a cabo por la caspasa-3. Como se observa en la figura 1.3 A, B y C, la caída del potencial de membrana mitocondrial producido por doxo es moderada, sin embargo, esta caída del potencial de membrana mitocondrial se ve incrementada considerablemente con el tratamiento combinado (doxo + ANI). Este cambio en la polaridad de la membrana mitocondrial se acompaña del incremento de la migración mitocondrial de Bax, de la liberación de citocromo-c (figura 1.3 D) y de la activación de caspasa-3, medida a través de la fragmentación de PARP-1 (figura 1.3 E). Estos datos demuestran que la inhibición de PARP es capaz de restaurar la respuesta dependiente de p53 en estas células, acelerando la ruta mitocondrial apoptótica.



**Figura 1.2 (E)** Ensayo de formación de colonias (CFA) en células EVSA-T después de la incubación con diferentes concentraciones de doxo y con o sin inhibidores de PARP (ANI 10  $\mu\text{M}$ ). El tratamiento combinado con ANI potencia significativamente la citotoxicidad de doxo. La fracción de supervivencia con el tratamiento con ANI fue similar que la de la situación control. Los valores de supervivencia representan la media de tres experimentos independientes y están normalizados por la eficiencia de formación de colonias de los controles no tratados. Las barras de error representan error estándar de la media (SEM).



**Figura 1.3.- Efectos de la inhibición de PARP sobre el potencial mitocondrial y sobre la fragmentación de PARP-1 tras tratamiento con doxorubicina.** (A) Potencial de membrana mitocondrial en la línea celular EVSA-T, medido 24 y 48 horas después del tratamiento con 1  $\mu$ g/ml doxo y/o ANI 10  $\mu$ M, detectado por citometría de flujo mediante la tinción con DIOC6. La región marcada (M1) indica la población celular utilizada para el análisis. (B, C) Análisis de la despolarización de la membrana mitocondrial en EVSA-T (B, 24 horas y C, 48 horas). La despolarización mitocondrial inducida por doxo fue incrementada después de la inhibición de PARP (ANI 10  $\mu$ M) en ambos casos. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM) de al menos tres experimentos independientes. \*  $p<0.001$  con respecto a las células tratadas con ANI y las células tratadas sólo con doxo.

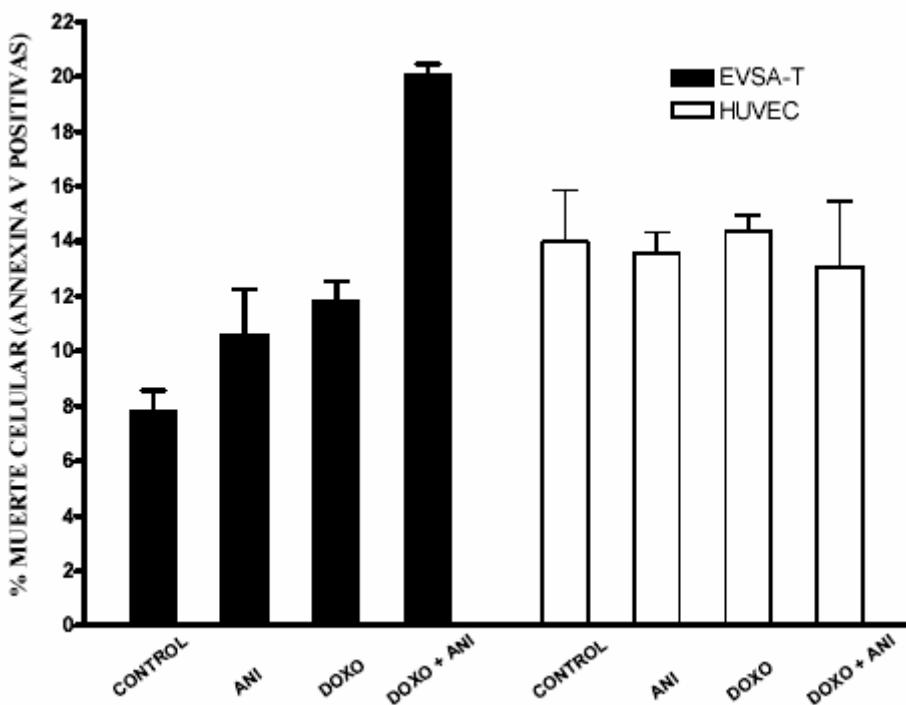


**Figura 1.3.- (D)**, Western blot de la liberación de citocromo-c desde la mitocondria a la fracción citosólica y migración mitocondrial de Bax en EVSA-T. **(E)** Western blot de la fragmentación de PARP-1 mediada por caspasas en las células EVSA-T. Se observan los fragmentos de 85 y 28 KDa procedentes de dicha ruptura 24 y 48 horas después del tratamiento con 1 µg/ml doxo. Esta fragmentación provocada por doxo fue incrementada después de la inhibición de PARP en ambos casos.

Como se desprende de estos resultados, el tratamiento combinado con doxo y ANI puede suponer una forma novedosa más eficaz de tratamiento antitumoral. Es posible pensar que de la combinación de ambas moléculas podría derivarse una reducción de la dosis y posiblemente del tiempo de tratamiento con doxo, promoviéndose además la reducción de los posibles efectos secundarios negativos producidos por el tratamiento con antraciclinas (doxorrubicina).

La pregunta que surge en este momento es si ANI, es capaz de potenciar la muerte celular inducida por doxorrubicina en células no tumorales. Con este objetivo se analizó el efecto del tratamiento con ANI en células humanas de origen endotelial

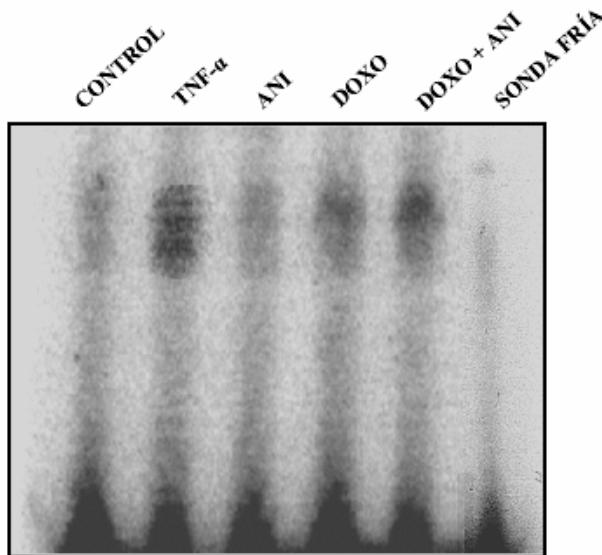
HUVEC. Como se puede observar en la figura 1.4, ANI no produce aumento en la sensibilidad de las células no tumorales frente a doxo, por el contrario, si se observa un efecto potenciador de la citotoxicidad de doxo en las células de cáncer de mama EVSA-T. Este resultado confirma que el tratamiento combinado con inhibidores de PARP puede ser de gran interés en la terapia antitumoral.



**Figura 1.4.- Papel de los inhibidores de PARP en el tratamiento combinado sobre células no tumorales.**  
Inducción de apoptosis 24 horas después del tratamiento con 1 µg/ml de doxo sobre la línea celular tumoral EVSA-T (■) y la no tumoral endotelial HUVEC (□), medido por la exposición de Fosfatidil Serina (Anexina-V) mediante análisis de citometría de flujo. La inhibición de PARP-1 con ANI (10 µM) incrementa sustancialmente la muerte celular inducida por doxo en las células tumorales, sin embargo, no produce ningún efecto potenciador sobre las células no tumorales.

### 1.4.3.- El efecto potenciador que ejerce ANI no es a través de la inactivación de NF-κB

La activación del factor de transcripción NF-κB es un mecanismo descrito que aporta resistencia a las células tumorales frente a la quimioterapia mediante la activación de la transcripción de genes anti-apoptóticos (Lin and Karin 2003). Además NF-κB ha sido relacionado con la progresión del cáncer de mama independiente de estrógenos (Krajewski et al. 1999). Experimentos realizados en varios laboratorios, incluido el nuestro, ha demostrado que la eliminación por delección genética de PARP-1 reduce la activación de NF-κB y por lo tanto la transcripción de los genes regulados por dicho factor de transcripción (Oliver et al. 1999; Martin-Oliva et al. 2004).



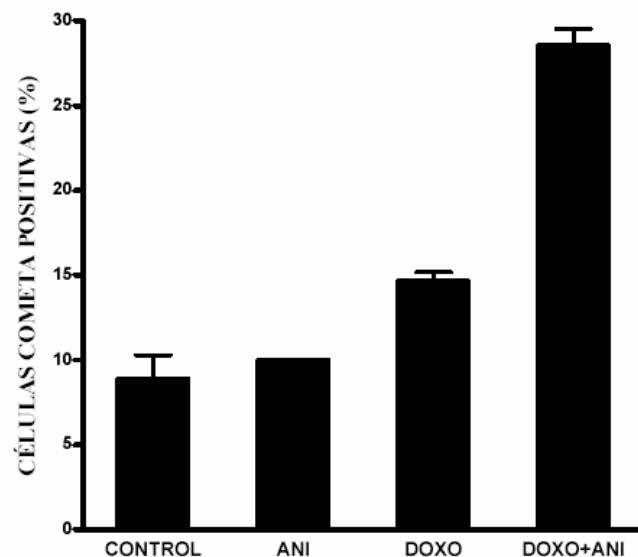
**Figura 1.5.- ANI no inhibe la activación de NF-κB producida por doxorrubicina.** Análisis por gel de retardo (EMSA), de la activación de NF-κB mediante el uso de la secuencia del promotor de iNOS que contiene sitios de unión para NF-κB. El estudio se realizó sobre la línea celular EVSA-T bajo las siguientes condiciones: control, control positivo de la activación de NF-κB (TNF- $\alpha$ , 20 ng/ml 2 horas), células incubadas con ANI (10  $\mu$ M), células tratadas con doxo (1  $\mu$ g/ml) y con el tratamiento combinado de doxorrubicina (1  $\mu$ g/ml) y ANI (10  $\mu$ M), 24 horas después del tratamiento. Se realizó un ensayo de competición con sonda sin marcar (sonda fría) con el objetivo de confirmar que la señal retardada era debida específicamente a NF-κB. La activación de NF-κB resultó ser similar en células tratadas con doxo y células tratadas con ambos fármacos. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

Con el objetivo de analizar la implicación de NF-κB en este proceso de sensibilización mediado por ANI, se estudió el papel del inhibidor de PARP en la activación de NF-κB inducida por el tratamiento con doxo, mediante el análisis por gel de retardo (EMSA). Como muestra la figura 1.5, el tratamiento con ANI no afecta a la

activación de NF-κB inducida por doxo, sugiriendo que la potenciación ejercida por el inhibidor de PARP sobre la citotoxicidad producida por doxo es independiente de NF-κB.

#### **1.4.4.- El efecto potenciador que ejerce ANI puede ser debido a defectos en la reparación de daños en el ADN y acumulación de los mismos**

Mediante la técnica de ensayo cometa se analizó la acumulación de daños en el ADN producidos por doxo y el tratamiento combinado de doxo más ANI en las células tumorales de cáncer de mama EVSA-T (a las 16 horas). La figura 1.6 muestra que la inhibición de PARP produce un aumento considerable en la acumulación de daños sin reparar en el ADN ocasionados por el agente antitumoral doxo. Esta acumulación de daños debida a defectos en los sistemas de reparación puede ser la responsable de la sensibilización observada en los procesos de muerte celular activados por doxo y demuestra que la activación de PARP-1, tras el tratamiento antitumoral tanto por radioterapia como con fármacos que inducen daños en el ADN, actúa de freno de los efectos citotóxicos inducidos por los mismos y por lo tanto, como un factor de radio- y quimio-resistencia.



**Figura 1.6.- La inhibición de PARP-1 produce defectos en la reparación del daño en el ADN.** Mediante el ensayo cometa se analizó la acumulación de daños en el ADN ejercidos por doxorrubicina. En ordenadas se representa el recuento de células que presentan cometa con respecto a las que no la muestran (%). El tratamiento con el inhibidor de PARP origina un acumulo considerable de daños en el ADN originados por doxo, debido a fallos en la reparación derivados de la inhibición de dicha proteína.

## 1.5.- DISCUSIÓN

La poli (ADP-ribosa) polimerasa fue descubierta hace cuarenta años como resultado de las investigaciones sobre el modo de acción de ciertos agentes antitumorales capaces de producir una reducción en la glucólisis debida al consumo del NAD<sup>+</sup> celular tras el tratamiento (Roitt 1956). Este hallazgo derivó en la búsqueda del motivo de este consumo y al descubrimiento de la poli (ADP-ribosilación) y de la proteína responsable de dicha actividad enzimática. Desde este momento, la investigación de PARP-1 ha estado unida al estudio de los agentes anticancerosos. PARP-1 se activa a través de su unión a roturas en el ADN, facilitando la reparación de daños en el ADN mediante la activación de diversos procesos de reparación (fundamentalmente el sistema de reparación por escisión de bases, BER). Posteriormente, se han identificado 18 miembros pertenecientes a la familia PARP, pero sólo los miembros más abundantes, PARP-1 y PARP-2, que están localizados en el núcleo, resultan activados por el daño ocasionado en el ADN (Curtin 2005). En este sentido hay que comentar, que el uso de inhibidores de PARP modifica tanto la actividad de PARP-1 como la de PARP-2, lo cual es debido a la gran homología existente entre los dominios catalíticos de ambas proteínas, blanco común de los inhibidores químicos de PARP.

Los procesos de reparación activados por PARP-1 constituyen un efecto negativo de resistencia frente a la terapia antitumoral que tiene como objetivo producir daños en el ADN. De esta forma, existen evidencias muy convincentes de que la inhibición de PARP está asociada con el incremento de sensibilidad frente a agentes alquilantes, inhibidores de la topoisomerasa I y de la radiación ionizante, pero no se dispone de información concluyente acerca de su posible implicación positiva en la potenciación del efecto citotóxico con otros agentes antitumorales muy usados en clínica, como por ejemplo, los inhibidores de la topoisomerasa II (Bowman et al. 2001).

Entre las drogas antineoplásicas más utilizadas en la actualidad se encuentran las antraciclinas, que se aplican en el tratamiento de una gran variedad de tumores que afectan a los seres humanos. Las antraciclinas constituyen un grupo de antibióticos de origen bacteriano (derivados de *Streptomyces*), que están formadas por un núcleo químico de antraquinona unido a un aminoazúcar. Los dos miembros más representativos de las antraciclinas son la daunorrubicina y la doxorrubicina o

adriamicina. A pesar de tener actividad antibacteriana, en la práctica clínica, no se emplean, con esta finalidad sino por su efecto citotóxico transitorio que las convierte en un fármaco antineoplásico eficaz. El clorohidrato de doxorrubicina se genera por la bacteria *Streptomyces peuceticus o coeruleorubidus*. La doxorrubicina se utiliza en el tratamiento de leucemias linfoblásticas y megaloblásticas agudas, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin y en tumores sólidos, como los sarcomas, cáncer de mama, tiroides, broncopulmonar, gástrico, ovario-endometrio, próstata, vejiga y testículo. De estos datos se deduce que las antraciclinas son los agentes antitumorales de mayor espectro y empleo en la oncología actual. La doxorrubicina basa su efecto en la inducción de daños en el ADN mediante la inhibición de la topoisomerasa II (Gudkov et al. 1993) y constituye uno de los principales tratamientos clínicos en el cáncer de mama independiente de estrógenos (Fisher et al. 2001). Los datos disponibles en bibliografía son confusos acerca de la activación de PARP-1 mediante el uso de inhibidores de la topoisomerasa II; de hecho, el principal representante de este grupo de inhibidores, el etopóxido, muestra que no existe relación entre este inhibidor de la topoisomerasa II y la activación de PARP-1. Sin embargo, compuestos de nueva generación, como el caso de C-1305, si manifiesta una relación entre PARP-1 y inhibidores de la topoisomerasa II (Wesierska-Gadek et al. 2004; Tentori and Graziani 2005). En nuestro estudio se hemos encontrado una rápida activación de la síntesis de PAR que se produce tras el tratamiento con doxorrubicina, mostrando la existencia de un efecto directo de dicha antracicicina sobre la activación de PARP (figura 1.1).

EVSA-T y MDA-MB-231, son líneas celulares procedentes de cáncer de mama. Se caracterizan por tener mutaciones en el gen supresor de tumores p53 y son relativamente insensibles a muchos agentes quimioterapéuticos (Valenzuela et al. 1995). Como se puede observar de los datos de DL<sub>50</sub> obtenidos en los ensayos de formación de colonias y en el resto de datos bioquímicos que han sido recogidos a lo largo del presente capítulo, el tratamiento combinado con inhibidores de PARP sensibiliza a las células EVSA-T y MDA-MB-231 a la muerte celular por apoptosis inducida por doxorrubicina. Como se ha comentado anteriormente, la capacidad de los inhibidores de PARP para potenciar la muerte celular inducida por agentes alquilantes y por la radiación ionizante ha sido ampliamente descrita (Virág and Szabó 2002; Miknyoczki et al. 2003). Como resultado de estas investigaciones se están realizando los primeros ensayos clínicos que implican inhibidores de PARP combinados con temozolomida (potente agente alquilante) en el tratamiento del cáncer. Los datos que aquí se presentan

constituyen la primera información acerca del potencial uso de inhibidores de PARP en el tratamiento combinado con el ampliamente utilizado agente antitumoral doxorrubicina.

El mecanismo por el cual ANI hace más susceptibles a las células tratadas con doxo no está relacionado con la inactivación del factor de transcripción NF-κB ni con la transcripción de los genes proanti-apoptóticos regulados por dicho factor (figura 1.5). Nuestros resultados indican que ANI ocasiona defectos en la reparación de las roturas en el ADN ejercidas por la doxorrubicina y, consecuentemente conduce a la acumulación de las mismas (figura 1.6). Este daño acumulado en el ADN llega a ser irreversible y activa los procesos de muerte celular apoptóticos dependientes de la mitocondria, de forma independiente de p53. Creemos que este mecanismo puede representar una forma novedosa de potenciar el efecto citotóxico inducido por los agentes anticancerígenos en tumores quimioresistentes resultantes de mutaciones en dicho gen supresor de tumores p53. Además, los resultados de los ensayos de formación de colonias demuestran una espectacular potenciación de la muerte celular inducida por doxo, sugiriendo que el efecto de doxo es amplificado considerablemente a largo plazo con el uso de inhibidores de PARP, minimizando la expansión clonal de las células tumorales resistentes.

Del conocimiento obtenido hasta la fecha, se deduce que las potenciales ventajas del uso de inhibidores de PARP en la terapia antitumoral son principalmente dos: 1) el aumento de la eficacia de los agentes que producen daños en el ADN evitando el correcto funcionamiento de los mecanismos de reparación y 2) la protección de los tejidos normales no tumorales de los efectos tóxicos derivados del uso de la quimioterapia. En este sentido, el uso de las antraciclinas está limitado por sus efectos cardiotóxicos. En relación a la doxorrubicina, con una dosis total acumulativa de hasta 450 mg/m<sup>2</sup>, el riesgo de patologías cardíacas es relativamente bajo, sin embargo, a partir de dosis de 550 mg/m<sup>2</sup> se incrementa exponencialmente el riesgo de padecer problemas cardíacos degenerativos. Este daño puede conducir a la insuficiencia cardíaca congestiva en un número no despreciable de casos. La miocardiopatía tras tratamiento con doxorrubicina puede manifestarse de manera inmediata o hasta más de 200 días después de la última dosis. No obstante, en la literatura médica existen datos sobre la presencia de enfermedad cardíaca en supervivientes a los padecimientos neoplásicos después de cinco años o más de finalizada la quimioterapia (Postma et al. 2002). Se ha demostrado que este efecto degenerativo se produce por estrés oxidativo en los

cardiomiositos (Weinstein et al. 2000; Tentori and Graziani 2005). El peróxido de oxígeno y peroxitritio causan roturas en el ADN que desencadenan en una sobreactivación de PARP-1 produciéndose un alto consumo energético y muerte celular, descrita inicialmente como necrótica, sobre dichos tejidos (Virag et al. 2003; Virag 2005). El uso de inhibidores de PARP protege de los efectos cardiotóxicos producidos por doxorrubicina, tanto a corto plazo, como de los efectos que aparecen tiempo después del cese del tratamiento, sin la reducción por ello del efecto sensibilizador de la citotoxicidad de esta antraciclina (Pacher et al. 2002; Szenczi et al. 2005). Otro ejemplo positivo ejercido por el uso de inhibidores de PARP lo constituye el efecto protector frente a la toxicidad de riñón originada por el uso del anti-neoplásico cisplatino, sin que la combinación de ambas moléculas afecte a su eficacia antitumoral (Racz et al. 2002).

Finalmente, se ha descrito que los inhibidores de PARP producen vasodilatación, aumentando el flujo sanguíneo al interior del tumor, generalmente poco vascularizado, facilitando con ello la penetración de los agentes antitumorales al foco del problema tumoral mejorando la eficacia del tratamiento. El mecanismo subyacente es todavía desconocido, pero se cree que los inhibidores actúan eliminando la contracción de la musculatura lisa de los vasos sanguíneos (Hirst et al. 1995; Ruddock et al. 2000). De esta forma, se puede mejorar la capacidad de difusión de doxorrubicina al interior del tumor (Tannock et al. 2002).

De todos estos datos, se puede concluir que el uso de inhibidores de PARP, en combinación con doxorrubicina, puede constituir una forma novedosa de tratamiento antitumoral con gran potencial clínico, por sus efectos sensibilizadores en tumores deficientes en la proteína p53, la cual es la causa directa de la resistencia a la quimioterapia, por el aumento de penetración al interior del tumor del agente antitumoral y finalmente, por la reducción de los efectos secundarios adversos descritos producidos por doxo en tejidos no tumorales.

Los resultados que se describen en este capítulo se recogen en la siguiente publicación:

*"PARP INHIBITION SENSITIZES P53-DEFICIENT BREAST CANCER CELLS TO DOXORUBICIN-INDUCED APOPTOSIS".*

**José Antonio MUÑOZ-GÁMEZ<sup>1</sup>, David MARTÍN-OLIVA<sup>1</sup>, Rocío AGUILAR-QUESADA<sup>5</sup>, Ana CAÑUELO<sup>2</sup>, M. Isabel NUÑEZ<sup>3</sup>, M. Teresa VALENZUELA<sup>1</sup>, J. M. RUIZ DE ALMODÓVAR<sup>3</sup>, Gilbert DE MURCIA<sup>4</sup>, F. Javier OLIVER<sup>5</sup>.**

<sup>1</sup> Hospital Universitario San Cecilio, Granada; <sup>2</sup> Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén; <sup>3</sup> Departamento de Radiología y Medicina Física, Universidad de Granada; <sup>4</sup> UPR 9003 du CNRS, ESBS Strasbourg, France; <sup>5</sup> Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada, Spain.

Publicado en la revista Biochemical Journal (2005), **386**, 119-129.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, Lonning PE (1996) Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 2:811-814
- Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G (2004) The PARP superfamily. *Bioessays* 26:882-893
- Beneke S, Diefenbach J, Burkle A (2004) Poly(ADP-ribosylation) inhibitors: promising drug candidates for a wide variety of pathophysiologic conditions. *Int J Cancer* 111:813-818
- Bowman KJ, Newell DR, Calvert AH, Curtin NJ (2001) Differential effects of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor NU1025 on topoisomerase I and II inhibitor cytotoxicity in L1210 cells in vitro. *Br J Cancer* 84:106-112
- Calabrese CR, Almassy R, Barton S, Batey MA, Calvert AH, Canan-Koch S, Durkacz BW, Hostomsky Z, Kumpf RA, Kyle S, Li J, Maegley K, Newell DR, Notarianni E, Stratford IJ, Skalitzky D, Thomas HD, Wang LZ, Webber SE, Williams KJ, Curtin NJ (2004) Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst* 96:56-67
- Curtin NJ (2005) PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med* 7:1-20
- Dantzer F, de La Rubia G, Menissier-De Murcia J, Hostomsky Z, de Murcia G, Schreiber V (2000) Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* 39:7559-7569
- de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G (1997) Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7303-7307
- Fisher B, Anderson S, Tan-Chiu E, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER, Dimitrov NV, Atkins JN, Abramson N, Merajver S, Romond EH, Kardinal CG, Shibata HR, Margolese RG, Farrar WB (2001) Tamoxifen and chemotherapy for axillary node-negative, estrogen receptor-negative breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-23. *J Clin Oncol* 19:931-942
- Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, Lillehaug JR, Akslen LA, Borresen-Dale AL (2001) Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res* 61:2505-2512
- Graziani G, Battaini F, Zhang J (2005) PARP-1 inhibition to treat cancer, ischemia, inflammation. *Pharmacol Res* 52:1-4
- Gudkov AV, Zelnick CR, Kazarov AR, Thimmapaya R, Suttle DP, Beck WT, Roninson IB (1993) Isolation of genetic suppressor elements, inducing resistance to topoisomerase II-interactive cytotoxic drugs, from human topoisomerase II cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3231-3235

- Hirst DG, Kennovin GD, Tozer GM, Prise VE, Flitney EW (1995) The modification of blood flow in tumours and their supplying arteries by nicotinamide. *Acta Oncol* 34:397-400
- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108:153-164
- Krajewski S, Krajewska M, Turner BC, Pratt C, Howard B, Zapata JM, Frenkel V, Robertson S, Ionov Y, Yamamoto H, Perucho M, Takayama S, Reed JC (1999) Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 6:29-40
- Lin A, Karin M (2003) NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol* 13:107-114
- Makin G, Dive C (2001) Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends Cell Biol* 11:S22-26
- Martin-Oliva D, O'Valle F, Munoz-Gamez JA, Valenzuela MT, Nunez MI, Aguilar M, Almodovar JR, Moral RG, Oliver FJ (2004) Crosstalk between PARP-1 and NF-kappaB modulates the promotion of skin neoplasia. *Oncogene*
- McNamee JP, McLean JR, Ferrarotto CL, Bellier PV (2000) Comet assay: rapid processing of multiple samples. *Mutat Res* 466:63-69
- Miknyoczki SJ, Jones-Bolin S, Pritchard S, Hunter K, Zhao H, Wan W, Ator M, Bihovsky R, Hudkins R, Chatterjee S, Klein-Szanto A, Dionne C, Ruggeri B (2003) Chemopotentiation of temozolomide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2:371-382
- Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W (2005) Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 17:631-636
- Noel G, Godon C, Fernet M, Giocanti N, Megnin-Chanet F, Favaudon V (2006) Radiosensitization by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-amino-1,8-naphthalimide is specific of the S phase of the cell cycle and involves arrest of DNA synthesis. *Mol Cancer Ther* 5:564-574
- Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G (1999) Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *Embo J* 18:4446-4454
- Ostrakhovitch EA, Cherian MG (2004) Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc. *Arch Biochem Biophys* 423:351-361
- Pacher P, Liaudet L, Bai P, Virag L, Mabley JG, Hasko G, Szabo C (2002) Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure. *J Pharmacol Exp Ther* 300:862-867
- Postma A, Elzenga NJ, Haaksma J, Schasfoort-Van Leeuwen MJ, Kamps WA, Bink-Boelkens MT (2002) Cardiac status in bone tumor survivors up to nearly 19 years after treatment with doxorubicin: a longitudinal study. *Med Pediatr Oncol* 39:86-92

- Racz I, Tory K, Gallyas F, Jr., Berente Z, Osz E, Jaszlits L, Bernath S, Sumegi B, Rabloczky G, Literati-Nagy P (2002) BGP-15 - a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor - protects against nephrotoxicity of cisplatin without compromising its antitumor activity. *Biochem Pharmacol* 63:1099-1111
- Roitt IM (1956) The inhibition of carbohydrate metabolism in ascites-tumour cells by ethyleneimines. *Biochem J* 63:300-307
- Ruddock MW, Burns DM, Murphy LE, O'Rourke MG, Hirst DG (2000) The effect of nicotinamide on spontaneous and induced activity in smooth and skeletal muscle. *Radiother Oncol* 56:253-257
- Ruiz-Ruiz MC, Lopez-Rivas A (1999) p53-mediated up-regulation of CD95 is not involved in genotoxic drug-induced apoptosis of human breast tumor cells. *Cell Death Differ* 6:271-280
- Schlicker A, Peschke P, Burkle A, Hahn EW, Kim JH (1999) 4-Amino-1,8-naphthalimide: a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase and radiation sensitizer. *Int J Radiat Biol* 75:91-100
- Schuler M, Green DR (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 29:684-688
- Shall S, de Murcia G (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 460:1-15
- Shin MS, Kim HS, Lee SH, Park WS, Kim SY, Park JY, Lee JH, Lee SK, Lee SN, Jung SS, Han JY, Kim H, Lee JY, Yoo NJ (2001) Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res* 61:4942-4946
- Smith LM, Willmore E, Austin CA, Curtin NJ (2005) The novel poly(ADP-Ribose) polymerase inhibitor, AG14361, sensitizes cells to topoisomerase I poisons by increasing the persistence of DNA strand breaks. *Clin Cancer Res* 11:8449-8457
- Speit G, Hartmann A (2005) The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol* 291:85-95
- Szenczi O, Kemecsei P, Holthuijsen MF, van Riel NA, van der Vusse GJ, Pacher P, Szabo C, Kollai M, Ligeti L, Ivanics T (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase regulates myocardial calcium handling in doxorubicin-induced heart failure. *Biochem Pharmacol* 69:725-732
- Tannock IF, Lee CM, Tunggal JK, Cowan DS, Egorin MJ (2002) Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy. *Clin Cancer Res* 8:878-884
- Tentori L, Graziani G (2005) Chemopotentiation by PARP inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Res* 52:25-33

- Valenzuela MT, Nunez MI, Villalobos M, Siles E, Olea N, Pedraza V, McMillan TJ, Ruiz de Almodovar JM (1995) Relationship between doxorubicin cell sensitivity, drug-induced DNA double-strand breaks, glutathione content and P-glycoprotein in mammalian tumor cells. *Anticancer Drugs* 6:749-757
- Velasco M, Diaz-Guerra MJ, Martin-Sanz P, Alvarez A, Bosca L (1997) Rapid Up-regulation of IkappaBbeta and abrogation of NF-kappaB activity in peritoneal macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 272:23025-23030
- Virag L (2005) Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Curr Vasc Pharmacol* 3:209-214
- Virag L, Szabo C (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54:375-429
- Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C (2003) Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 140-141:113-124
- Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA (2000) Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 294:396-401
- Wesierska-Gadek J, Schloffer D, Gueorguieva M, Uhl M, Skladanowski A (2004) Increased susceptibility of poly(ADP-ribose) polymerase-1 knockout cells to antitumor triazoloacridone C-1305 is associated with permanent G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 64:4487-4497
- Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C (1994) Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269:4705-4708





## **CAPÍTULO II**

**LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR  
DOXORRUBICINA PRESENTA CARACTERÍSTICAS DE  
LA MUERTE CELULAR AUTOFÁGICA Y ES  
DEPENDIENTE DE PARP-1**



## 2.1.- RESUMEN

El agente antitumoral doxorrubicina (doxo) es una antraciclina con propiedades antineoplásicas muy usada en protocolos clínicos sobre una gran variedad de los tumores que afectan a los seres humanos. En este trabajo, hemos analizado los procesos de muerte celular inducidos por concentraciones moderadamente altas de doxorrubicina sobre un modelo celular de fibroblastos murinos inmortalizados que expresan PARP-1 así como fibroblastos murinos deficientes en dicha proteína. En este modelo, dosis moderadamente elevadas de doxorrubicina provocan la activación de procesos de muerte celular independiente de caspasas y dependiente en parte, de la presencia de PARP-1. Las células deficientes en PARP-1 están protegidas del alto consumo de NAD<sup>+</sup> y ATP generado por el tratamiento con doxo. La muerte celular inducida por doxorrubicina presenta las siguientes características: 1) ocurre en ausencia de migración mitocondrial de Bax, 2) se produce con una ligera caída del potencial de membrana mitocondrial, 3) se desencadena sin liberación de citocromo-c y sin la liberación mitocondrial y desplazamiento de AIF al núcleo, 4) se mantiene la integridad de la cromatina. Mediante análisis de microscopía electrónica tras tratamiento con doxo y de microscopía de fluorescencia tras la transfección con el marcador de vesículas autofágicas LC3-GFP, hemos podido observar un gran incremento en la formación de autofagosomas en células con PARP-1 tratadas con doxo pero no en las células deficientes en dicha proteína o en las células que expresan PARP-1 sometidas al tratamiento combinado con doxo y el inhibidor de la actividad de PARP (ANI). Mediante PCR en tiempo real hemos demostrado el aumento de expresión de genes implicados en autofagia (*bnip-3*, *catepsina b* y *l* así como *beclin-1*) en células *parp-1*<sup>+/+</sup> tratadas con doxo y no en las *parp-1*<sup>-/-</sup>, sugiriendo la implicación de PARP-1 en la activación de los procesos autofágicos. Estos datos indican que dosis moderadamente altas de doxorrubicina producen muerte celular con características de los procesos de muerte celular tipo II o autofagia que parece mediada por la activación de PARP-1 tras el tratamiento con el agente antitumoral.



## 2.2.- INTRODUCCIÓN

En el tratamiento del cáncer el empleo de agentes químicos busca el desencadenamiento de los procesos de muerte celular, generalmente, mediante la activación de los *procesos de muerte celular programada*. Se conoce como procesos de muerte celular programada a los mecanismos estrictamente regulados que dirigen a la célula a un proceso de autolisis en respuesta a un conjunto de señales de muerte, que transcurren mediante etapas claramente diferentes de las descritas para la muerte celular por necrosis, descritos como procesos pasivos de muerte en los cuales el contenido intracelular es vertido a la matriz extracelular originando la activación de la respuesta inflamatoria. La muerte celular programada se ha clasificado en diversas categorías (Figura 10), siendo las más representativas la apoptosis o muerte celular programada Tipo I y la autofagia también conocida como muerte celular Tipo II (Lockshin and Zakeri 2002; Assuncao Guimaraes and Linden 2004; Lockshin and Zakeri 2004a; Lockshin and Zakeri 2004b; Broker et al. 2005). La muerte celular apoptótica resulta de la función de una familia de cisteína proteasas, las caspasas (Thornberry and Lazebnik 1998; Fan et al. 2005). Se han descrito dos rutas principales de activación de las caspasas, la ruta extrínseca o de receptores de muerte y la vía intrínseca o mitocondrial (Ashkenazi and Dixit 1999; Bouillet et al. 2001; Shao et al. 2004). La muerte celular autofágica constituye otro mecanismo fisiológico de muerte celular programada que está caracterizada por la masiva degradación de contenidos intracelulares, incluidos orgánulos esenciales como las mitocondrias, a través de un complejo mecanismo intracelular de generación de vesículas que incluyen en su interior todos estos contenidos celulares y la posterior degradación de los mismos por enzimas hidrolíticas lisosomales (Klionsky and Emr 2000; Bursch 2001; Gozuacik and Kimchi 2004; Kondo et al. 2005). Otra característica importante asociada a la autofagia es la de ser un proceso de muerte celular independiente de caspasas (Assuncao Guimaraes and Linden 2004; Lockshin and Zakeri 2004a; Yang et al. 2005). La autofagia juega un papel importante en situaciones fisiológicas o fisiopatológicas. Se ha descrito que tras infección por agentes patógenos, la activación de la autofagia proporciona un método de eliminación de los mismos. Además, es de destacar la relación existente entre la autofagia y cáncer. Se ha observado la desregulación de ciertas proteínas y de las vías de señalización implicadas en la activación de la autofagia durante la transformación

neoplásica de las células (Gozuacik and Kimchi 2004). Sabemos también que ciertos tumores responden al tratamiento antitumoral mediante la inducción de muerte celular por autofagia. Este proceso de muerte celular también ha sido relacionado con procesos neurodegenerativos, como Parkinson, la enfermedad de Huntington y el Alzheimer (Qin et al. 2003; Marino and Lopez-Otin 2004; Bursch and Ellinger 2005). Debido a que el mecanismo de la autofagia no se conoce en su totalidad, se cree que algunos procesos en los cuales podría desempeñar un importante papel han sido erróneamente descritos como derivados de procesos apoptóticos o necróticos. Además, la frecuente simultaneidad de apoptosis y autofagia constituye a la dificultad de separar uno y otro proceso para su estudio (Xue et al. 1999).

La enzima nuclear PARP-1 se activa tras su unión a lesiones en el ADN y transforma el compuesto NAD<sup>+</sup> ( $\beta$ -nicotinamida adenindinucleotido) en largos y ramificados polímeros de poli (ADP ribosa) (PAR), que se asocian a determinadas proteínas nucleares (D'Amours et al. 1999). PARP-1 participa activamente en los procesos de reparación del ADN y en el mantenimiento de la integridad genómica (de Murcia et al. 1994; Schreiber et al. 1995; Chatterjee et al. 1999; Shall and de Murcia 2000). Sin embargo, su hiper-activación genera la reducción del contenido celular en NAD<sup>+</sup> y ATP, dirigiendo de forma irreversible al fallo energético y a la muerte celular (Ha and Snyder 1999; Los et al. 2002). El significado fisiopatológico de la hiper-activación de PARP-1 ha sido muy bien descrito. De su estudio han resultado aplicaciones terapéuticas de los inhibidores de PARP en modelos experimentales de desordenes caracterizados por daño en el ADN generado por estrés oxidativo, como los procesos de isquemia-reperfusión, diabetes, conmoción cerebral, choque séptico, inflamación y cáncer (Virág and Szabó 2002; Di Paola et al. 2005; Graziani et al. 2005; Kaplan et al. 2005; Strosznajder et al. 2005; Virág 2005). Recientemente, se ha demostrado en varios estudios el papel de PARP-1 y de la poli (ADP-ribosilación) en procesos de muerte celular programada independiente de caspasas, pero dependiente de la proteína mitocondrial AIF (*Apoptosis Inducing Factor*). Esta proteína se libera de la mitocondria y migra al núcleo donde induce condensación nuclear y fragmentación del ADN en grandes fracciones (>50 kDa) (Yu et al. 2002; Alano et al. 2004; Chen et al. 2004; Dawson and Dawson 2004; Hong et al. 2004; Kang et al. 2004; Xiao et al. 2005; Zhang et al. 2005). A pesar de su relevancia en procesos patológicos, la regulación de los mecanismos energéticos durante la hiper-activación de PARP-1 y el estudio de los procesos de muerte que desencadena, permanece todavía por dilucidar. Con el objetivo

de estudiar este asunto, hemos analizado el modelo experimental constituido por fibroblastos murinos inmortalizados *parp-1<sup>+/+</sup>* y *parp-1<sup>-/-</sup>* expuestos a doxorrubicina, agente antitumoral de gran relevancia clínica y como se ha descrito en el capítulo I, potente activador de PARP-1.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten enunciar que el efecto producido por el uso de dosis moderadamente elevadas de doxorrubicina induce muerte celular a través de un mecanismo independiente de caspasas, pero que necesita para su ejecución de la activación de PARP-1. Las células letalmente lesionadas presentan las características morfológicas y bioquímicas compatibles con las de la autofagia. En conjunto, nuestros resultados sugieren que PARP-1 puede desarrollar un papel crucial en la decisión de la activación de los procesos de muerte celular por apoptosis o por autofagia como respuesta al tratamiento con agentes quimioterapéuticos genotóxicos.



## 2.3.- MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.3.1.- Cultivos celulares

En este trabajo hemos utilizado las líneas celulares derivadas de fibroblastos embrionarios murinos inmortalizados (MEF) de ratones que expresan PARP-1 así como de ratones de fondo genético C57BL/6 deficientes en dicha proteína, generados por recombinación homóloga del exón 4, en el laboratorio de Gilbert de Murcia (de Murcia et al. 1997). Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) y 40 µg/l del antibiótico Gentamicina en un incubador a 37 °C en una atmósfera humidificada y con el 5% en CO<sub>2</sub>. Para la realización de experimentos las células fueron sembradas 24 horas antes del tratamiento con doxo.

### 2.3.2.- Genotipaje de las líneas celulares

Las líneas celulares derivadas de los ratones *parp-1*<sup>-/-</sup> y *parp-1*<sup>+/+</sup> utilizadas fueron genotipadas siguiendo un protocolo previamente descrito ([http://parplink.u-strasbg.fr/\\_protocols/tools/parp1\\_typing.html](http://parplink.u-strasbg.fr/_protocols/tools/parp1_typing.html)). Para ello las células se despegaron del frasco de cultivo y la suspensión resultante se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y el precipitado se lavó con PBS. Posteriormente se realizó la extracción del ADN mediante la congelación y descongelación de las muestras y la adición de un volumen de 2.5 ml de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (Sigma). La suspensión resultante se agitó vigorosamente durante diez minutos, tras lo cual se centrifugó de nuevo (3500 r.p.m. durante 10 minutos) para extraer la fase superior. Se añadió a continuación 200 µl de acetato sódico 3 M (Sigma) y ml de etanol absoluto frío, luego se agitó suavemente la mezcla para la precipitación del ADN y se centrifugó (3000 r.p.m. durante 10 minutos). Posteriormente, el precipitado se lavó con etanol al 70% y, eliminado el líquido de lavado, este precipitado se resuspendió en 200 µl de TE. Una vez extraído el ADN se llevó a cabo su purificación utilizando el *QIAamp® DNA Purification Mini Kit* (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones metodológicas aportadas por el fabricante. La concentración de ADN se calculó mediante análisis por espectrofotometría, teniendo en cuenta que una unidad de absorbancia medida a 260 nm equivale a 50 µg/ml de muestra. También se obtuvo la relación entre absorbancia a 260

nm y absorbancia a 280 nm (ABS<sub>260</sub>/ABS<sub>280</sub>) para determinar el grado de pureza de las muestras.

Mediante la *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (PCR) se pudo comprobar que las líneas celulares utilizadas para el experimento eran las correctas. Los cebadores utilizados en el genotipage así como las condiciones experimentales para la PCR fueron tomadas de siguiente dirección: [http://parplink.u-strasbg.fr/protocols/tools/parp1\\_typing.html](http://parplink.u-strasbg.fr/protocols/tools/parp1_typing.html). Las PCR se realizaron en un termociclador iCycler iQ detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), teniendo en cuenta que para cada muestra a ensayar se adicionan 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Roche), 5 µl de tampón de PCR 10x (Roche), 1 µl de una mezcla de dNTP 10 mM [dATP, dTTP, dCTP y dGTP (Roche)], 0.5 µl de enzima Taq polimerasa *AmpliTaq Gold<sup>TM</sup>* (5 U/µl) (Roche), los volúmenes adecuados de cada uno de los cebadores tanto sentido como anti-sentido para que su concentración final resultase de 0.5 µM, 2.5 µl del ADN obtenido para cada línea celular y la cantidad apropiada de agua para completar los 50 µl de reacción. La PCR se llevó a cabo usando un programa térmico compuesto por una primera fase inicial de desnaturación a 94 °C durante 2 minutos, seguido de una fase intermedia de 35 ciclos formada por una primera etapa de desnaturación (94 °C durante 40 segundos), más una segunda etapa de hibridación a 61 °C durante 45 segundos y una etapa final de extensión a 73 °C durante 60 segundos, para acabar con una fase de extensión final durante 10 minutos a 73 °C. Los cebadores utilizados fueron sintetizados por el Servicio de Genómica del IPBLN (CSIC, Granada) de acuerdo a la secuencia descrita en la página web anteriormente citada. En cada PCR se utilizaron las siguientes combinaciones de cebadores: a) combinación del oligo (+) y oligo (+/-) para la amplificación del alelo salvaje y, b) oligos (-) más oligo (+/-), para la amplificación del alelo mutado. Los productos obtenidos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Sigma) al 1% en TBE 1x contenido 0.5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma) y se visualizaron con luz ultravioleta. La detección del alelo mutado, presenta una señal a 700 pares de bases y la detección del alelo salvaje a 200 pares de bases.

### 2.3.3.- Tratamientos celulares

Para el desarrollo de los experimentos de muerte celular, las células fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos, con una densidad celular de 1 x 10<sup>5</sup>

células por pocillo. Los tratamientos se realizaron 24 horas después de su siembra. El tratamiento con doxo (a las concentraciones indicadas en cada caso) (Ferrer Farma, Barcelona, España), se realizó durante una hora de exposición en medio DMEM suplementado con 10% FBS a 37 °C en una atmósfera humidificada y con un 5% de CO<sub>2</sub>, transcurrida la cual se retiró el medio y las células fueron cultivadas con medio fresco hasta el momento del análisis. El inhibidor de PARP, 4-amino-1,8-naftalimida (ANI, Alexis, Lausen, Suiza), fue disuelto en medio de cultivo inmediatamente antes de su uso a la concentración de 10 µM. Estas soluciones contenían < 2% DMSO para mejorar la solubilidad de ANI en el medio de cultivo. El tratamiento con ANI se realizó al menos 1 hora antes de la adición de doxorrubicina y se mantuvo presente durante todo el tiempo que duro el ensayo. El inhibidor general de las caspasas z-VAD-FMK [z-Val-Ala-Asp-(oMe)-FMK, Calbiochem, San Diego, CA], fue añadido a la concentración de 50 µM, 2 horas antes del tratamiento con doxo y al igual que ANI estuvo presente durante todo el experimento. N-acetil-L-cisteina (NAC, Sigma), compuesto que actúa como antioxidante, fue utilizado a la concentración de 5 mM, dos horas antes del tratamiento con doxo y estuvo presente durante todo el tiempo que duró en experimento.

#### 2.3.4.- Medidas de la muerte celular

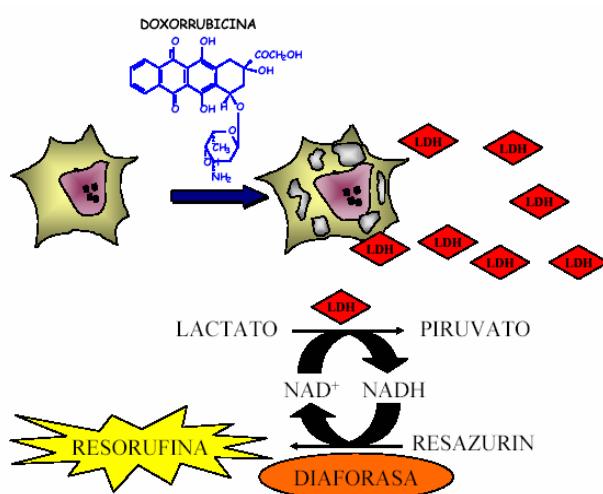
El análisis de la muerte celular se realizó mediante ensayos con anexina-V por citometría de flujo. Después del tratamiento correspondiente, las células fueron despegadas usando tripsina-EDTA y lavadas con solución PBS a 4 °C. Posteriormente, las células se trataron con 2 µl anexina-V FLUOS (Roche Molecular Biochemicals) disuelta en 100 µl de solución de enlace de anexina-V (10 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) a 4 °C. Tras 30 minutos de incubación, se adicionaron sobre cada tubo 100 µl de solución de enlace de anexina-V. Las muestras fueron estudiadas con un citómetro de flujo tri-laser FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) y analizadas con el software CellQuest (Becton Dickinson).

### 2.3.5.- Análisis de la muerte celular por necrosis

Para determinar si los procesos de muerte celular inducidos por doxorrubiciна se correspondían con muerte celular por necrosis, se realizaron las técnicas de citometría de flujo en células sin permeabilizar con la tinción de Ioduro de Propidio y el ensayo colorimétrico de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH).

La técnica de tinción del ADN con Ioduro de Propidio (IP), se basa en que dicho compuesto no puede introducirse en el interior de las células que tienen intacta su membrana plasmática. Como contrapartida, las células IP positivas presentan discontinuidades en su membrana, fenómeno característico de la muerte celular por necrosis. Las células fueron despegadas ( $1 \times 10^5$  células) y lavadas 3 veces con solución de PBS a 4 °C y resuspendidas en 250 µl de solución Hepes (10 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) que contenía disuelto 5 µg/ml de IP. El análisis fue desarrollado en un citómetro de flujo tri-laser FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson), empleando el software CellQuest analysis (Becton Dickinson) para su análisis.

El ensayo colorimétrico de liberación de LDH se basa en el mismo principio del IP. Las células con daños en su membrana plasmática, liberan al medio de cultivo sus componentes citosólicos, entre ellos la enzima Lactato Deshidrogenasa en la que se basa este ensayo. Se utilizó un kit para este fin y se siguieron las condiciones facilitadas por el fabricante (Promega Corporation, Madison, USA). El fundamento del ensayo se basa en la obtención de NADH como resultado de la conversión del reactivo lactato (facilitado por el kit) en piruvato es realizada por la enzima LDH (liberada al medio extracelular por las células con la membrana dañada) y el posterior uso del NADH generado para la conversión de resazurin en resorufina por la enzima diaforasa (compuestos suministrados en el kit), produciéndose un cambio de coloración, tal y como se indica en el esquema.



Las células se sembraron con una densidad de  $3 \times 10^4$  células sobre una placa de 96 pocillos y después de los correspondientes tratamientos, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de solución de reacción. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, la absorbancia fue medida a 590 nm en un espectrofotómetro lector multipocillos.

### 2.3.6.- Ensayos de formación de colonias

Para el ensayo de formación de colonias con fibroblastos murinos, es preciso el paso previo de siembra de una capa basal de células (*feeder layers*) capaces de aportar las condiciones necesarias para que los fibroblastos puedan desarrollarse y formar colonias. Después de este paso previo, se procedió a la siembra del número adecuado de fibroblastos *parp-1*<sup>+/+</sup> y *parp-1*<sup>-/-</sup> sobre frascos de cultivo de 25  $\text{cm}^2$ . Un día más tarde, las células se trataron con concentraciones crecientes de doxorrubicina durante una hora. Pasados 15 del tratamiento, las células fueron fijadas y su número fue cuantificado mediante el método colorimétrico de Cristal Violeta [2 % de violeta de Genciana (sigma) en etanol absoluto]. Se consideró colonia a la agrupación de más de 50 células. La fracción de supervivencia fue determinada a partir del número de células sembradas de partida y el número de colonias formado tras el tratamiento y corregido por la eficiencia de formación de colonias (EC) de los controles no tratados.

$$\text{Fracción de supervivencia (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ colonias formadas} \times 100}{n^{\circ} \text{ células sembradas} \times EC}$$

$$\text{Eficiencia de clonaje del control (EC)} = \frac{n^{\circ} \text{ colonias formadas (control)}}{n^{\circ} \text{ células sembradas (control)}}$$

### 2.3.7.- Técnicas de Inmunofluorescencia

Se efectuaron inmunofluorescencias frente al polímero de poli (ADP-ribosa) (PAR) y la proteína AIF (*Apoptosis Inducing Factor*), en células que crecían sobre laminillas cubre objetos, fijadas y permeabilizadas a 4 °C durante 10 minutos con la solución metanol-acetona (1:1). El anticuerpo primario de PAR fue el monoclonal 10H (generado en ratón, Alexis, Lausen, Suiza) y el anticuerpo policlonal para AIF

(generado en conejo, H300, Santa Cruz). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: el anticuerpo secundario frente a las inmunoglobulinas IgG de ratón conjugado con el fluorocromo FITC (anti-ratón generado en cabra, Sigma, St Louis Mo) y frente a las inmunoglobulinas IgG de conejo conjugado con FITC (anti-conejo generado en cabra, Sigma, St Louis Mo). Después de retirar el exceso de anticuerpo secundario, los núcleos fueron teñidos con DAPI. Esta inmunotinción se visualizó con el microscopio Leica Spectral confocal láser.

### **2.3.8.- Inmunodetección de proteínas por Western Blot**

Se realizaron ensayos de inmunodetección de proteínas mediante la técnica de Western blot, según el procedimiento descrito en el apartado de material y métodos del capítulo I. Una vez obtenidos los extractos proteicos se procedió a la determinación de proteínas mediante el método colorimétrico Bradford lo que permitió cargar en el gel de electroforesis la misma cantidad total de proteínas para cada muestra. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-poli (ADP-ribosa) (PAR) (monoclonal SA-216, BIOMOL), anti-PARP-1 (monoclonal, EGF-69, generado y suministrado por el Doctor Gilbert de Murcia, Estrasburgo, Francia), anti-Bax y anti-citocromo-c (Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.), anti-AIF (policlonal, H-300, Santa Cruz), anti p70s6k fosforilado (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) y anti- $\alpha$ -tubulina (monoclonal, Sigma, St Louis Mo). Tras la retirada del anticuerpo primario y después de lavar tres veces durante 5 minutos con PBS/Tween 0.1%, se incubó durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado peroxidasa del rábano picante (HRP). Las señales se revelaron con el reactivo ECL-Plus (Amersham Biosciences), y se adquirieron mediante el sistema de visualización de imagen ChemiDoc XRS System (Bio-Rad).

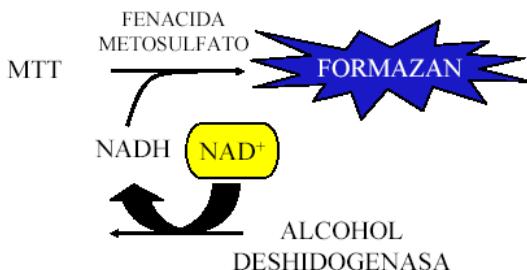
Para las medidas de citocromo c y Bax mediante western blot se obtuvieron los extractos citosólicos y la fracción membranosa (donde se incluyen las mitocondrias), según el protocolo descrito en el apartado de material y métodos (Pág. 92 del Capítulo I).

### 2.3.9.- Detección del potencial de membrana mitocondrial

Para la determinación del potencial de membrana mitocondrial en los fibroblastos murinos *parp-1<sup>+/+</sup>*, 24 horas antes del tratamiento con doxorrubicina (5 µg/ml) se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pocillo. Trascurridas 48 horas del tratamiento, se analizaron las muestras mediante citometría de flujo, siguiendo el protocolo con el colorante DIOC<sub>6</sub> (40 nM), descrito anteriormente (Pág. 92, Capítulo I). Con el objetivo de validar el procedimiento, se utilizó el tratamiento con estaurosporina 1 µM durante 12 horas, sobre los fibroblastos *parp-1<sup>+/+</sup>* como control positivo de despolarización mitocondrial. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo (FACScan cytometer, Becton-Dickinson) y la fluorescencia se detectó en FL1. El análisis se realizó utilizando la línea marcada sobre los histogramas que indica la población celular con bajo potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ). El número de células con bajo potencial de membrana, fue representado como un porcentaje de células con respecto a células sin tratamiento (células control).

### 2.3.10.- Medida de los niveles celulares de NAD<sup>+</sup>

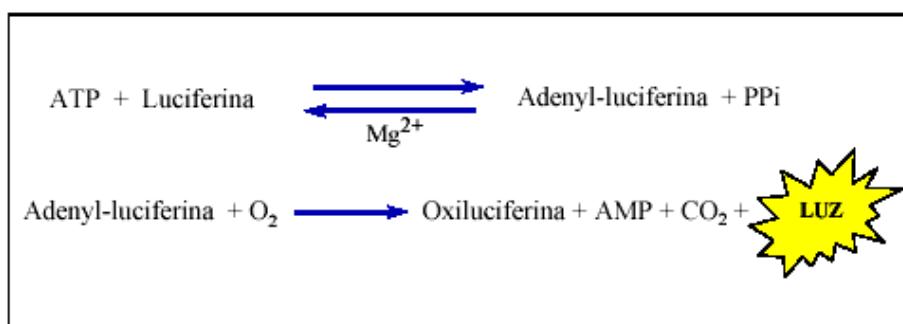
Se procedió a la siembra de  $1 \times 10^5$  células sobre placas de cultivo de 6 pocillos 24 horas antes del tratamiento para el análisis de los niveles de NAD<sup>+</sup>. Tras la incubación con doxorrubicina la células fueron tripsinizadas, resuspendidas y lisadas en 100 µl de ácido perclórico 0.5 M. Los extractos celulares obtenidos se neutralizaron con 100 µl de KOH a la concentración de 0.5 M. Las muestras se centrifugaron durante 2 minutos a 10.000 r.p.m y se procedió a la eliminación del sedimento obtenido (principalmente constituido por sales de KClO<sub>4</sub>). Para la determinación del contenido en NAD<sup>+</sup> se realizó el método colorimétrico previamente descrito (Cuzzocrea et al. 2002), en el cual el NAD<sup>+</sup> intracelular es transformado en NADH por la reacción enzimática realizada por la enzima alcohol



deshidrogenasa (suministrada por el fabricante). Este NADH generado se utiliza para la transformación por reducción química mediante la acción de la enzima metosulfato fenacida del compuesto de color amarillento MTT a formazán, de color azulado. La proporción de reducción de MTT es proporcional a la concentración de la coenzima NAD<sup>+</sup> intracelular. Se añadieron a 50 µl del sobre-nadante obtenido, 200 µl de la mezcla de reacción constituida por: [10 µl de una solución de MTT a una concentración de 2.5 mg/ml, 20 µl de metosulfato de fenacida 4 mg/ml, 10 µl de la solución de alcohol deshidrogenasa 0.6 mg/ml (300 unit/mg) y finalmente 190 µl del tampón glicil-glicina 0.065 M a pH 7.4, que contenía 0.1 M de nicotinamida y 0.5 M etanol] y se incubaron durante 5 minutos a 37 °C. Para la obtención de la recta de calibración se llevó a cabo el mismo procedimiento con concentraciones de NAD<sup>+</sup> conocidas. La absorbancia se midió inmediatamente después de dicha incubación en un espectrofotómetro lector de placas multipellos a la longitud de onda de 560 nm. La concentración de proteínas fue obtenida mediante el método colorimétrico Bradford (Bio-Rad). El contenido de NAD<sup>+</sup> fue normalizado con el valor de proteínas totales y se expresó en tanto por ciento con respecto al control.

### 2.3.11.- Determinación del contenido celular de ATP

En contenido intracelular de ATP se midió mediante el ensayo de luciferasa *Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Bioluminescent Assay Kit*, (Sigma, Saint Louis, USA), de acuerdo con las indicaciones suministradas por el fabricante. Este protocolo se basa en la siguiente reacción de oxidación de la luciferina en presencia de ATP a través de la cual se obtiene la emisión de luz:



La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra. Los extractos celulares se prepararon a partir de 1 millón de células. Tras el

tratamiento pertinente, las células se resuspendieron en 50 µl de H<sub>2</sub>O y se lisaron a través de tres ciclos de congelación en nieve carbónica y descongelación a 37 °C. Sobre los extractos celulares obtenidos se midió la concentración de proteínas mediante el método Bradford (Bio-Rad). La concentración de ATP se calcula por interpolación del valor obtenido sobre una curva patrón, que se realiza simultáneamente añadiendo concentraciones conocidas y crecientes de ATP. La luminiscencia producida por la reacción enzimática en presencia del ATP celular se analizó inmediatamente en un luminómetro con el protocolo de 2 segundos de retraso y 30 segundos de integración. El contenido en ATP se expresa en tanto por ciento con respecto al control y está normalizado con el contenido proteico de las muestras.

### 2.3.12.- Determinación de roturas en el ADN mediante ensayo cometa

Se utilizó para la detección de la fragmentación oligonucleosomal en el ADN asociada a la muerte celular por apoptosis, la técnica de detección mediante ensayo cometa en condiciones neutras utilizando el kit *CometAssay™ Reagent Kit for Single Cell Gel Electrophoresis Assay Catalog # 4250-050-K* (Trevigen; Gaithersburg, MD) según las instrucciones facilitadas por el fabricante. Bajo tales condiciones neutras se detectan las roturas dobles de cadena asociadas a la apoptosis (Yasuhara et al. 2003). Las células se despegaron y se prepararon a una concentración de 1 x 10<sup>5</sup> células/ml en tubos de ensayo. La solución celular se combinó con agarosa de bajo punto de fusión (suministrada por el fabricante), en la proporción 1 a 10 (v/v) y sembradas sobre cristales porta objetos (suministrados por el fabricante). Posteriormente, los cristales se sumergieron en solución de lisis (suministrada por el fabricante y con la siguiente composición: 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, pH 10, 10 mM Tris base, 1% lauril sarcosinato sódico, y 1% Triton X-100) a 4 °C durante 30 minutos. A diferencia del protocolo utilizado en el capítulo I, las células no fueron expuestas a la solución alcalina. Tras la etapa de lisis se procedió directamente a la migración del ADN por electroforesis bajo las condiciones 1.0 V/cm durante 20 minutos en solución TBE (40 mM Tris/ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8.3). Las muestras se tiñeron durante 30 minutos con el colorante fluorescente SYBR® Green (suministrado por el fabricante). Se realizó el análisis mediante el recuento de más de 500 células de cada condición y se anotaron las que presentaban cometa.

### 2.3.13.- Microscopía Electrónica

Tras el pertinente tratamiento, se procedió al lavado de las células (3 veces) con solución PBS y a su prefijación sobre la placa de cultivo con la solución de glutaraldehido 1.0%, en tampón cacodilato 0.05 M a pH 7.4, durante dos horas. A continuación, se lavaron tres veces en tampón cacodilato 0.1 M a pH 7.4 a 4 °C y se fijaron con la solución acuosa de Tetraóxido de Osmio (1.72% tetraóxido de osmio y 1.0% de ferrocianato potásico en agua) durante 60 minutos a la temperatura de 4 °C. Trascurrido este tiempo, las células se lavaron tres veces con agua bidestilada y se tiñeron con la solución de Acetato de Urano al 2% en agua, durante 120 minutos en oscuridad. Las preparaciones se lavaron 3 veces con agua bidestilada. A continuación se procedió a la deshidratación de las muestras mediante la inmersión secuencial en soluciones de etanol (50, 70, 90 y 3 veces al 100%, 10 minutos a 0-4°C). Finalmente, las preparaciones fueron incluidas secuencialmente en las resinas Epon:etanol (1:2) 60 minutos a temperatura ambiente, Epon:etanol (1:1) 60 minutos a temperatura ambiente, Epon:etanol (2:1) 60 minutos a temperatura ambiente, en resina Epon toda la noche entre 0-4 °C y finalmente en resina Epon 24 horas a 60 °C. Posteriormente, se realizaron cortes ultrafinos de 700 amstrong y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo (2-5 min). Los cortes se realizaron con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo (Ultracut S de Reichert). Las muestras se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión con un microscopio electrónico Zeis (Servicio de Microscopía Electrónica, Centro de Instrumentación Científica, Universidad de Granada).

### 2.3.14.- Transfección de la construcción LC3-GFP y estudio mediante microscopía de fluorescencia de su localización intracelular

La proteína proautofágica LC3 (homólogo en mamíferos de la proteína ATG-8 en levaduras), está implicada en la elongación de las vesículas autofágicas mediante el reclutamiento de fosfoesfingolípidos y su transporte a la superficie del autofagosoma en formación (Tanida et al. 2004). Recientemente se ha mostrado que LC3 constituye el primer marcador específico de los autofagosomas en células de mamíferos y su determinación ha sido usada para estudiar la autofagia en procesos neurodegenerativos,

en tumorogénesis, infecciones virales y bacterianas, etc. (Kanzawa et al. 2004; Boya et al. 2005; Gonzalez-Polo et al. 2005). La determinación de la localización celular de LC3, junto con la microscopía electrónica, son los únicos marcadores descritos hasta la fecha de la formación de las vesículas autofágicas y por tanto de la autofagia. Para su estudio, se utilizó el vector de expresión de la proteína LC3 conjugado con la proteína verde fluorescente GFP amablemente cedido por el Doctor Yoshimori (National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan). Esta construcción fue transfectada transitoriamente en los fibroblastos murinos *parp-1<sup>+/+</sup>* y *parp-1<sup>-/-</sup>* utilizando el reactivo JetPei™ (PolyPlus Transfection, Genicel) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células se sembraron 24 horas antes de la transfección sobre placas de cultivo de 6 pocillos con una densidad de  $1 \times 10^5$  células por pocillo en 2 ml de medio DMEM con 10% de FBS. Se utilizaron 2 µg del plásmido LC3-GFP que se disolvieron en 100 µl de cloruro sódico 150 mM (por cada pocillo). Por separado, 6 µl del reactivo de transfección se añadieron a 100 µl de cloruro sódico 150 mM (por cada pocillo). Se procedió a agitar ambas soluciones y se añadió la disolución de transfección sobre la disolución que contenía el plásmido y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Trascurrido este tiempo, la solución de transfección se añadió sobre los 2 ml de medio DMEM suplementado con 10 % en FBS y se dejó en el pocillo al menos 24 horas. Al día siguiente, se procedió con el tratamiento con doxo y con doxo más el inhibidor de PARP. Para determinar la localización de LC3 después de 48 horas del tratamiento con doxorrubicina, las células transfectadas de forma transitoria con la construcción LC3-GFP se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Zeis).

### 2.3.15.- Reacción de transcripción inversa

El ARN total fue aislado de las células tratadas, o sin tratar, con doxorrubicina (48 horas después del tratamiento), con el método de extracción con Trizol (Gibco). Se añadió 1 ml de trizol por muestra y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 200 µl de cloroformo por cada ml de trizol y se removió vigorosamente sobre un agitador (*vortex*) durante 15 segundos. Las muestras se centrifugaron a 13.000 r.p.m durante 15 minutos a 4 °C y se recogió la fase superior que se corresponde con la fase acuosa, en la cual tenemos disuelto el ARN. A continuación, se precipitó el ARN total con 500 µl de isopropanol por cada vial y se incubó 10

minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 13.000 r.p.m durante 10 minutos a 4 °C y se eliminó el sobre-nadante. El precipitado de ARN se lavó con 1 ml de etanol al 75% (preparado con agua tratada con DEPC y etanol absoluto) y se dejó secar al aire. El precipitado fue resuspendido en 20 µl de H<sub>2</sub>O-DEPC, 10 minutos a 55-60 °C. El ARN obtenido se purificó utilizando el *RNeasy kit* (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) y se determinó la concentración del ARN mediante análisis espectrofotométrico teniéndose en cuenta que 1 unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 40 µg/ml de ARN. Tras la determinación de la concentración del ARN, se realizó sobre 1 µg de ARN la reacción de transcripción inversa en ADN complementario por RT-PCR utilizando el kit *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA), de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Este kit contiene los oligos: d(T)16, hexámeros aleatorios como cebadores y la enzima MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus, reverse transcriptase*) como transcriptasa inversa. La transcripción inversa se llevó a cabo usando el programa térmico definido por el fabricante consistente en: incubación a 25°C durante 5 minutos (pre-incubación), 42 °C durante 30 minutos (transcripción reversa), 85 °C durante 5 minutos (inactivación del enzima) y refrigeración a 4 °C.

### 2.3.16.- Reacción de PCR en tiempo real

La expresión de los genes implicados en autofagia *bnip-3*, *catepsina B*, *catepsina L* y *beclin-1* se midió por PCR en tiempo real en células control y tratadas con doxo (5 µg/ml), 48 horas después del tratamiento. La reacción de PCR en tiempo real se llevó a cabo en el termociclador iCycler iQ detection system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) usando los reactivos iQ SYBR® Green Supermix 2x (Bio-Rad), de acuerdo con las instrucciones facilitadas por el fabricante. Este kit contiene el agente intercalante SYBR® Green específico de ADN de doble cadena que se une al ADN inmediatamente después de ser sintetizado y emite luz fluorescente tras estimulación (absorción a 497 nm y emisión a 520 nm). La emisión se recoge por el sistema detector del equipo en cada uno de los ciclos de la PCR. La fluorescencia detectada es proporcional a la cantidad de ADN formado lo que nos permite conocer y registrar en todo momento la cantidad de ADN formado en cada ciclo de amplificación (Wittwer et al. 1997). El ciclo de la PCR en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina

ciclo umbral ( $C_t$ , *de threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN presente en la muestra, es decir, más cantidad de ADN inicial, menor valor de  $C_t$  para esta muestra. Por tanto comparando los  $C_t$  de las distintas muestras a ensayar se puede calcular el incremento de expresión génica de una determinada muestra respecto a una condición control. La secuencia de los cebadores específicos para los genes a estudiar se resume en la tabla 3.1. La composición de cada reacción de PCR fue la siguiente: 12.5  $\mu\text{l}$  de reactivo Supermix 2x, 0.5  $\mu\text{M}$  de cada uno de los cebadores tanto sentido como anti-sentido, 1  $\mu\text{l}$  de ADN complementario y cantidad suficiente de agua hasta completar un volumen de reacción de 25  $\mu\text{l}$ . Además se pusieron puntos de control negativos o blancos en los cuales se sustituyó el ADN complementario por agua. Todas las muestras fueron normalizadas respecto a un gen de referencia usado como control interno. Dicho gen de referencia fue el 18S ARNr (Burbach et al. 2003). El perfil térmico utilizado para cada reacción de PCR fue el preestablecido en el software iCycler iQ detection system (Bio-Rad), con la salvedad de que la temperatura utilizada para la etapa de hibridación de la PCR que se corresponde con las temperaturas óptimas de hibridación de cada uno de los cebadores utilizados. La cuantificación relativa de la expresión génica se determinó usando el método comparativo previamente descrito de las  $C_t$  (Wang et al. 2002; Zhu et al. 2004; Qian et al. 2005): nº veces de inducción =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , donde  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$  muestra problema -  $\Delta C_t$  muestra control para un determinado gen de interés. Aquí,  $\Delta C_t$  muestra problema es el valor de la  $C_t$  de la muestra problema para un determinado gen normalizado según la expresión del gen 18S ARNr y  $\Delta C_t$  muestra control es el valor de la  $C_t$  de la muestra control sin tratar para ese mismo gen normalizado según la expresión del gen 18S ARNr. Para la validación del cálculo del  $\Delta\Delta C_t$  es necesario la realización de curvas patrón, tanto del gen de referencia como del gen a estudiar y que dichas curvas cumplan los requisitos de eficiencia de PCR y coeficiente de correlación siguientes: coeficiente de correlación > 0.98 y una pendiente cuyo valor oscile entre (3.2 - 3.4) ± (0.1), además de una eficiencia de PCR próxima al 100 %. En todos los casos la curva estándar del gen de interés y del gen de referencia interno que contenía al menos 4 concentraciones diferentes del ADN complementario representadas por triplicado, (18S ARNr), cumplió con las condiciones anteriormente indicadas.

Además, con el objetivo de comprobar que el producto amplificado presenta el tamaño previamente descrito en bibliografía y dilucidar si el producto de la PCR es un

único compuesto y además el que vamos buscando, el producto resultante de la reacción de PCR se analizó por electroforesis de gel de agarosa, obteniéndose para todos los casos resultados positivos.

Tabla 3.1 Secuencia de los cebadores usados para estudios de expresión génica por PCR en tiempo real PCR usando SYBR® green.

Oligo	Secuencia	(5' → 3')	Tamaño frag.	Ref./UniSTS number <sup>A</sup>
18S rARN-S	CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA		181 pb	Burbach <i>et al.</i> , 2003
18S rARN-A	GCT GGA ATT ACC GCG GCT			
Bnip 3-S	TTT AAA GCC TGC CTC CTT GA		94 pb	124767
Bnip 3-A	TGT CAC TTT TAT TTT AAC ACA CCT G			
CtsB-S	CAA CGT GGA GGT GTC TGC TGA A		110 pb	Waters <i>et al.</i> , 2001
CtsB-A	TGT CCA GAA GTT CCA TGC TCC AG			
CtsL-S	CTG TTC CCA TTT TTA CAT GG		200 pb	141443
CtsL-A	TTC CAG ACT CAG AAT TAA GC			
Beclina 1-S	TGG AGG GCA GTC CAT ACC CTG G		256 pb	272470
Beclina 1-A	GAG CTG GCT CCT GTG AGT ATG			

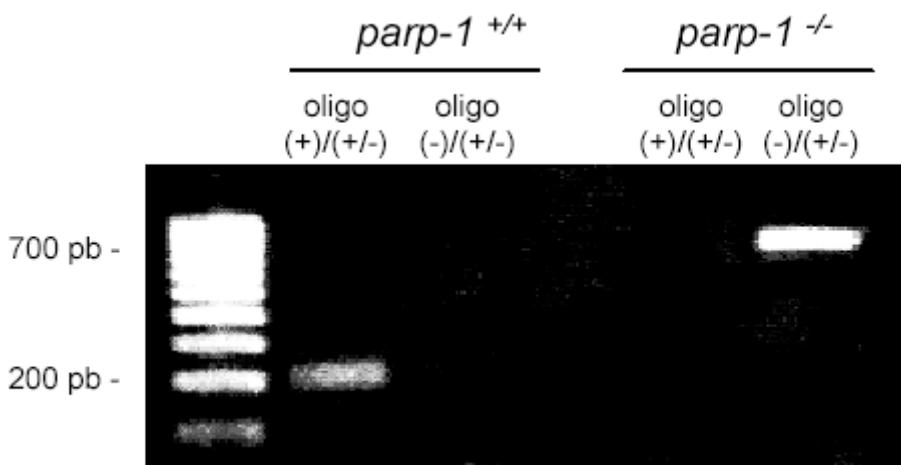
<sup>A</sup>UniSTS es una base de datos de secuencias disponibles para PCR que se muestra en el apartado de genes de la página web del pubmed, la cual recoge la información sobre dichos cebadores publicadas en trabajos científicos.

**Tabla 3.1.- Secuencia de los cebadores utilizados para el estudio de expresión génica por PCR en tiempo real.** La secuencia fue obtenida de publicaciones científicas o de las descritas en la página web del pubmed en el apartado de UniSTS publicado en la información disponible sobre genes. (S) sentido, (A) anti-sentido.

## 2.4.- RESULTADOS

### 2.4.1.- Genotipaje de las líneas celulares de fibroblastos derivadas de ratones *parp-1<sup>+/+</sup>* y *parp-1<sup>-/-</sup>* mediante PCR

En nuestro trabajo hemos realizado la comprobación del genotipo de las líneas celulares de fibroblastos derivadas de ratones que expresan PARP-1 y de aquellos deficientes para esta proteína, como paso previo al experimento de inducción de muerte celular por doxorrubicina. El proceso de genotipage se realizó a partir de ADN, obtenido según se ha descrito en el apartado de material y métodos, mediante análisis por PCR, utilizando los cebadores específicos para cada alelo (salvaje y mutado). Los resultados que se deben de conseguir para una situación correcta en cuanto a la presencia o no del gen para *parp-1* son los siguientes: la combinación de cebadores oligo (+) y oligo (+/-) amplifica en los fibroblastos *parp-1<sup>+/+</sup>*, una única banda de 200 pb de tamaño correspondiente al alelo salvaje, mientras en las células *parp-1<sup>-/-</sup>* no debe de apreciarse ninguna banda con el uso de dichos cebadores. En cambio en los *parp-1<sup>-/-</sup>*, la combinación de cebadores oligo (-) más oligo (+/-) amplifica únicamente un fragmento de 700 pb correspondiente al alelo mutado, mientras que las células *parp-1<sup>+/+</sup>* no deben de presentar ninguna banda con estos cebadores. Estos resultados descritos, se pueden observar en la figura 2.1, en la que la combinación de cebadores oligo (+) y oligo (+/-) produce el fragmento de 200 pb resultado de la amplificación de ADN procedente de la línea celular derivada de ratones *parp-1<sup>+/+</sup>*, en cambio, el ADN procedente de la línea celular derivada de ratones *parp-1<sup>-/-</sup>* no muestra amplificación alguna. De igual modo, la combinación de cebadores oligo (-) y oligo (+/-) produce el fragmento de 700 pb resultado de la amplificación de ADN procedente de la línea celular *parp-1<sup>-/-</sup>*, sin embargo, el ADN procedente de las células *parp-1<sup>+/+</sup>* no presenta señal, demostrándose así la correspondencia entre el genotipo teórico y el experimentalmente comprobado.

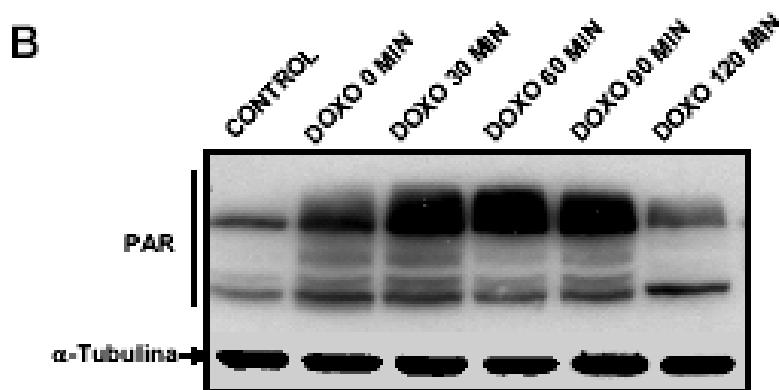
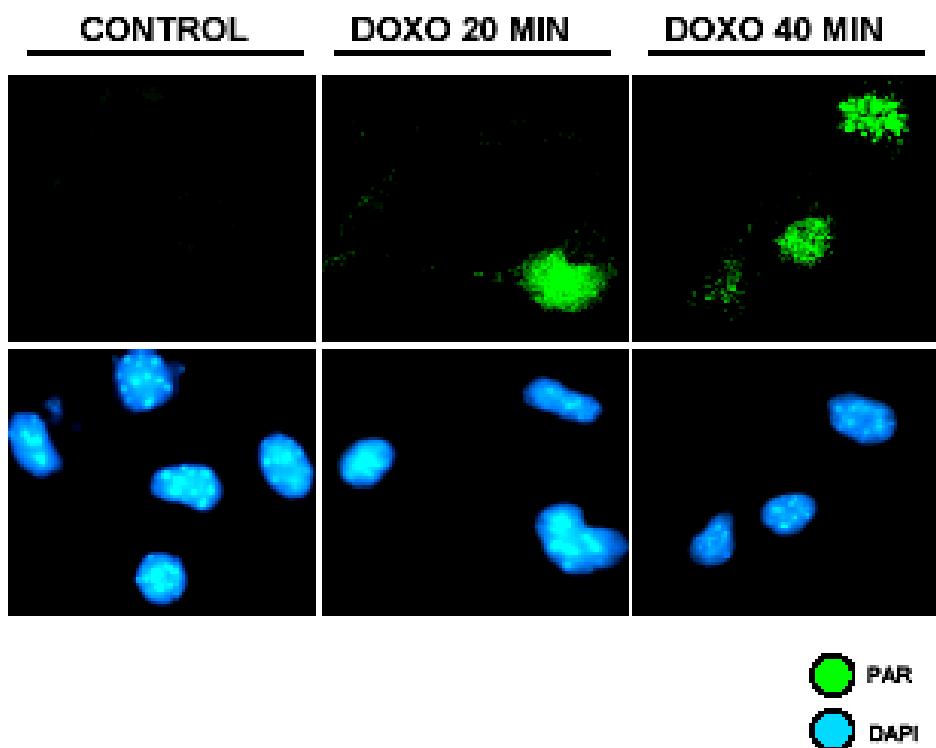


**Figura 2.1.- Genotipage de las líneas celulares derivadas de ratones *parp-1* <sup>+/+</sup> y *parp-1* <sup>-/-</sup> por PCR.** Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa para la visualización del fragmento de 200 pb (alelo salvaje) obtenido a partir de la utilización de la combinación de cebadores oligo (+) y oligo (+/-) y 700 pb (alelo mutado), obtenido a partir de la utilización de la combinación de cebadores oligo (-) y oligo (+/-). La secuencia de los oligos se obtuvo del protocolo descrito en la siguiente página web: [http://parplink.u-strasbg.fr/protocols/tools/parp1\\_typing.html](http://parplink.u-strasbg.fr/protocols/tools/parp1_typing.html)

#### 2.4.2.- El tratamiento con doxorrubicina induce la activación de PARP-1

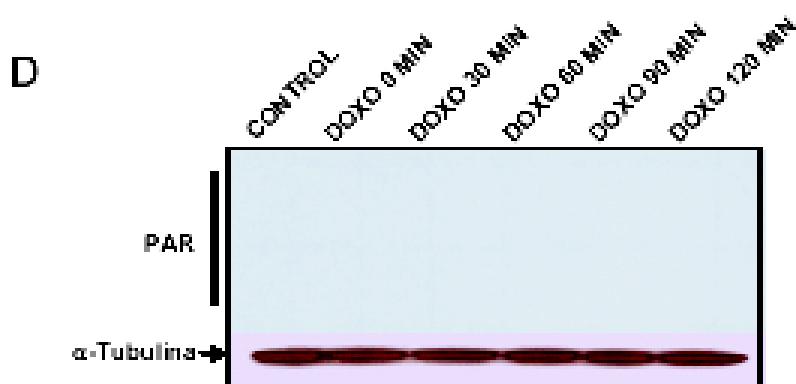
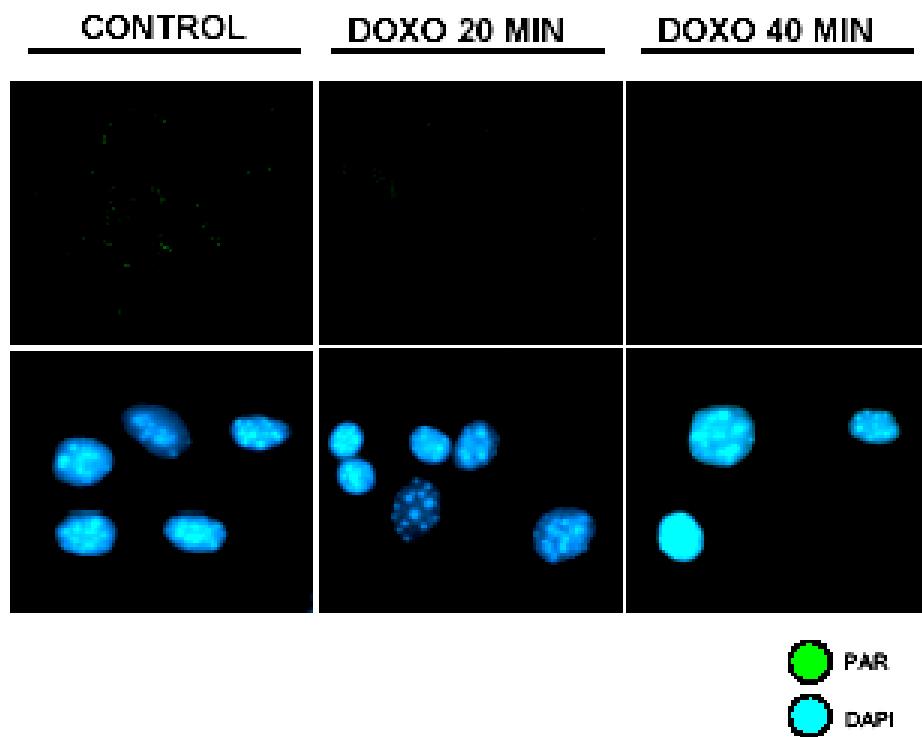
Muchos agentes quimioterapéuticos que producen daños en el ADN son capaces de activar PARP-1. Doxorrubicina es un potente agente antitumoral perteneciente a la familia de las antraciclinas. Doxorrubicina fue utilizada por primera vez en la década de los 70 y desde entonces se ha convertido en una de las drogas antitumorales más usadas para el tratamiento tanto de tumores hematológicos como en tumores sólidos (Weiss 1992; Gluck 2002). Doxo es un inhibidor de la topoisomerasa II y actúa como un potente agente que daña el ADN (Capítulo I, Pág. 97), siendo capaz de activar PARP-1 en líneas celulares derivadas de tumores de mama (Muñoz-Gámez et al. 2005). Nuestra hipótesis consiste en que el grado de activación de PARP-1 en función del daño inflingido en el ADN, puede desempeñar un importante papel en la decisión entre supervivencia y la activación de procesos de muerte celular. En nuestro protocolo de trabajo hemos pretendido determinar si doxo es capaz de inducir la activación de PARP en los fibroblastos 3T3 MEF *parp-1*<sup>+/+</sup>. La figura 2.2 demuestra que doxo (5 µg/ml) induce la rápida activación de PARP en 3T3 MEF *parp-1*<sup>+/+</sup> (20 minutos después del

tratamiento), medido a través de la formación de polímero tanto por inmunofluorescencia (figura 2.2 A) como por western blot (figura 2.2 B). Sin embargo, doxorrubicina no produce la activación de PARP, en las células 3T3 MEF *parp-1*<sup>-/-</sup> (figura 2.2 C y D), lo que indica que otros miembros de la familia PARP no están implicados en los procesos de reparación de los daños originados por doxo en el ADN, en concreto la PARP-2 que junto con PARP-1 son los dos únicos miembros descritos que se activan tras daño en el ADN. Además se puede decir que la señal observada en la figura 2.2 proviene directamente de la activación de PARP-1. Por otra parte hemos realizado un recuento celular por microscopía de fluorescencia de las células *parp-1*<sup>+/+</sup> activadas tras el tratamiento con doxorrubicina (5 µg/ml), con el objetivo de cuantificar en número de células activadas tras dicho tratamiento. Para ello, sometimos a recuento más de 500 células por cada condición y se contaron las que presentaban formación de polímero. Como se representa en la figura 2.2 E, doxorrubicina produce la activación de PARP-1 en más del 50% de células 3T3 MEF *parp-1*<sup>+/+</sup> y presenta a los 40 minutos tras el tratamiento un pico de activación máxima, indicando que doxo (5 µg/ml) es un poderoso activador de PARP-1.

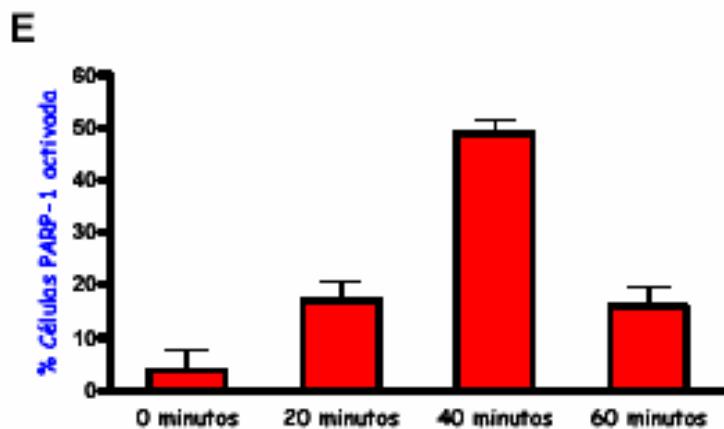
**A 3T3 MEF *parp-1*<sup>+/+</sup>**

**Figura 2.2.- Activación de PARP-1 inducida por el tratamiento con doxorrubicina. (A)** inmunofluorescencia frente al polímero PAR [poli (ADP-ribosa)] en fibroblastos 3T3 MEF *parp-1*<sup>+/+</sup> (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las células fueron tratadas con doxo 5 µg/ml, 1 hora y fijadas 20 y 40 minutos después de dicho tratamiento. **(B)** Western blot para la formación de PAR sobre 3T3 MEF *parp-1*<sup>+/+</sup> a diferentes tiempos después del tratamiento con doxo. Se utilizó la proteína  $\alpha$ -tubulina como control de carga.

**C 3T3 MEF *parp-1*<sup>-/-</sup>**



**Figura 2.2.- Activación de PARP-1 inducida por el tratamiento con doxorrubicina.** (C) inmunofluorescencia frente al polímero PAR [poli (ADP-ribosa)] en fibroblastos 3T3 MEF *parp-1*<sup>-/-</sup> (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las células fueron tratadas con doxo 5 µg/ml, 1 hora y fijadas 20 y 40 minutos después de dicho tratamiento. (D) Western blot para la formación de PAR sobre 3T3 MEF *parp-1*<sup>-/-</sup> a diferentes tiempos después del tratamiento con doxo. Se utilizó la proteína  $\alpha$ -tubulina como control de carga.



**Figura 2.2.- Activación de PARP-1 inducida por el tratamiento con doxorrubicia. (E)**, Representación del porcentaje de células *parp-1<sup>+/+</sup>* activadas tras el tratamiento con doxo. Se representan los valores obtenidos tras el recuento de más de 500 células por microscopía de fluorescencia tras la realización de ensayos de inmunofluorescencia a diferentes tiempos. Las barras de error representan las medias de las desviaciones estándar (SEM) de al menos cuatro experimentos independientes. \* p<0.001 con respecto a las restantes condiciones.

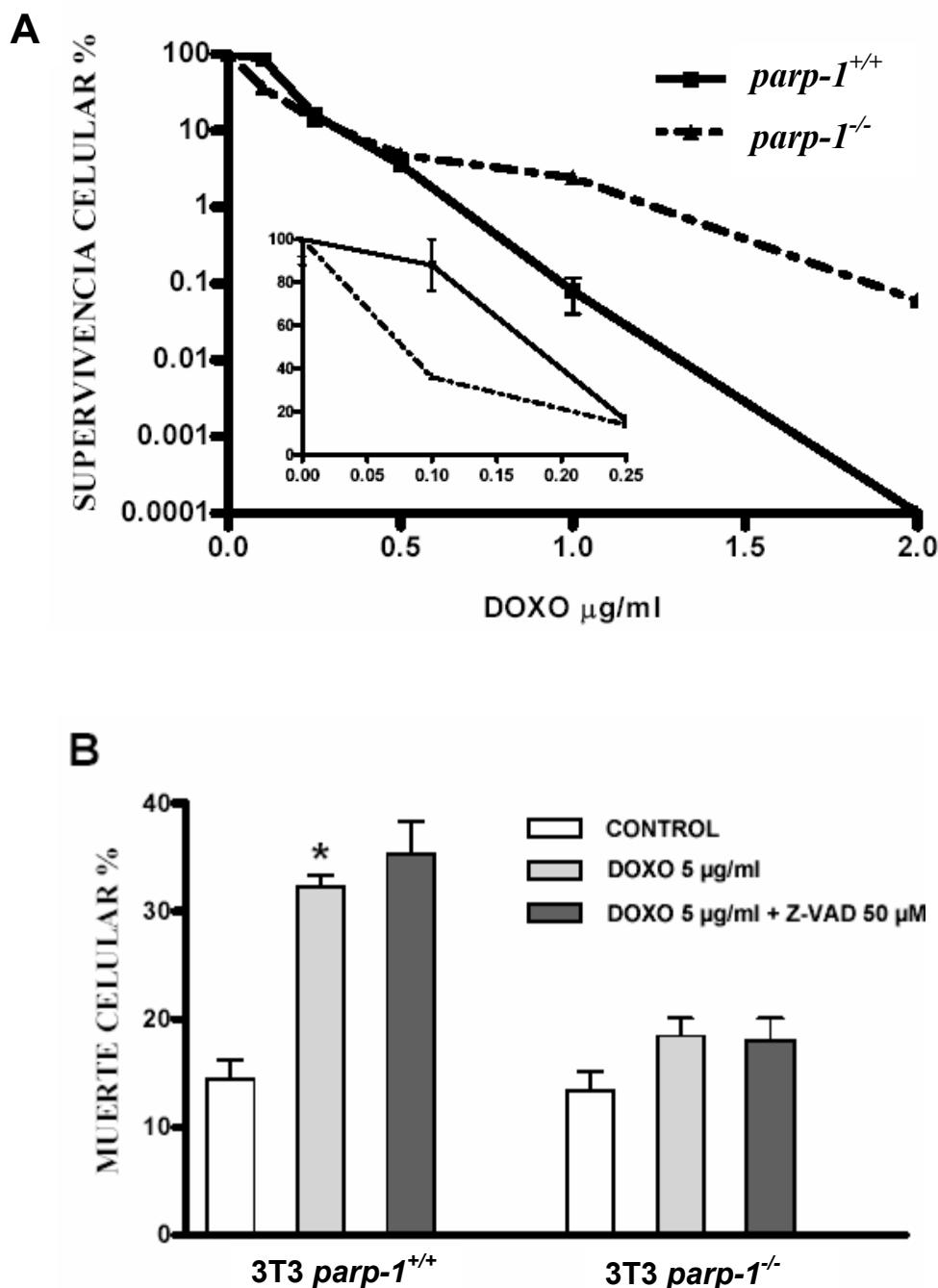
#### 2.4.3.- La potenciación o prevención de la viabilidad celular mediada por PARP-1 depende de la dosis de doxorrubicia utilizada

Para determinar la sensibilidad de las células *parp-1<sup>+/+</sup>* y *parp-1<sup>-/-</sup>* frente a doxorrubicia, hemos realizado ensayos de formación de colonias (CFA). Con ellos hemos podido observar que doxorrubicia induce dos respuestas diferenciadas en función a la concentración del agente antitumoral utilizado (figura 2.3 A). En estos experimentos a largo plazo (dos semanas tras el tratamiento), las concentraciones bajas de doxo (dosis inferiores a 0.5 µg/ml), producen un comportamiento en el cual las células deficientes en PARP-1 (*parp-1<sup>-/-</sup>*) están más sensibilizadas a la muerte celular inducida por doxo que las células que expresan PARP-1 (figura 2.3 A, inserto). Estos datos se corresponden con lo descrito en el capítulo I, en el cual, la inhibición de PARP en células de cáncer de mama potencia la apoptosis inducida por doxorrubicia (Muñoz-Gámez et al. 2005). De este modo, la ausencia o la inhibición de PARP-1, ocasiona defectos en los sistemas de reparación de daños en el ADN tras el tratamiento con doxo. La acumulación del daño, alcanza niveles que son incompatibles con la vida. No obstante, con dosis superiores de doxo (>0.5 µg/ml), la ausencia de PARP-1 provoca la

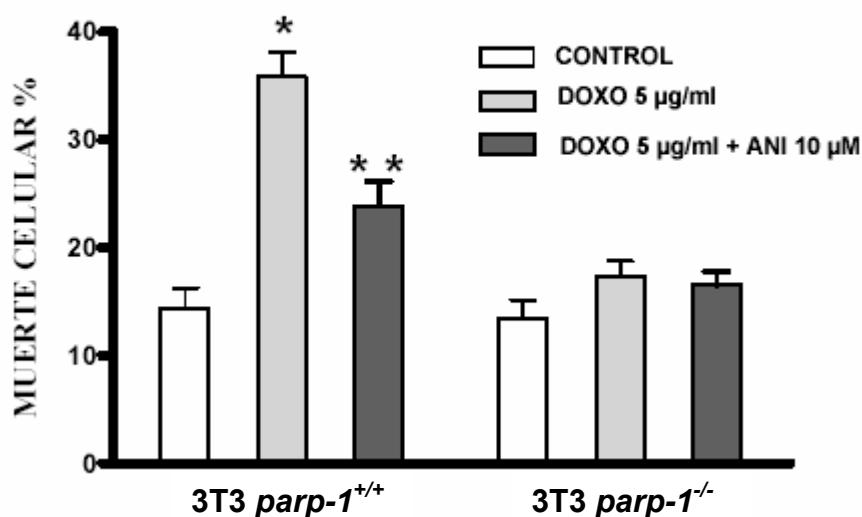
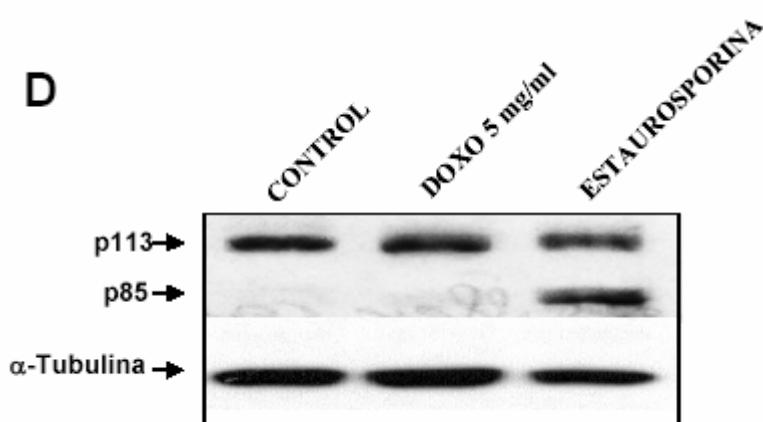
protección de los fibroblastos tratados frente pérdida de viabilidad celular causada por la doxorrubicina (figura 2.3 A).

Para determinar si el tipo de muerte celular producida por dosis moderadamente elevadas de doxo es dependiente de la activación de las caspasas, se realizaron ensayos de muerte celular mediante citometría de flujo con anexina-V, tras el tratamiento con doxo ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) y con el inhibidor general de las caspasas Z-VAD (Z-Val-Ala-DL-Asp-CH<sub>2</sub>F) (figura 2.3 B). Según se desprende del análisis de la gráfica, el efecto citotóxico originado por doxorrubicina no se inhibe con el uso de Z-VAD, indicando que dicho proceso de muerte celular ocurre de forma independiente de la activación de las caspasas. Sin embargo, el pretratamiento con el inhibidor de la actividad de PARP, ANI (4-amino-1,8-naftalimida,  $10 \mu\text{M}$ ), promueve un efecto de prevención en los fibroblastos *parp-1* <sup>+/+</sup> frente a la muerte celular inducida por dicha dosis de doxorrubicina, confirmando que este proceso es en parte dependiente de la activación de PARP-1 (figura 2.3 C).

Para demostrar que la muerte celular inducida por doxorrubicina ocurre de forma independiente de la activación de las caspasas, se han realizado experimentos de fragmentación de PARP-1 (por la caspasa-3) a la dosis del agente antitumoral anteriormente indicada ( $5 \mu\text{g/ml}$ ). La fragmentación de PARP-1 es un evento temprano de la muerte celular y se considera como un proceso que marca la ejecución de la apoptosis al igual que la activación de la caspasa-3 (Kaufmann et al. 1993; Lazebnik et al. 1994). Según se muestra en la figura 2.3 D, el tratamiento con doxo no produce fragmentación de PARP-1, y por ello creemos que en este caso la muerte celular ocurre sin activación de la caspasa-3, sugiriendo que doxorrubicina a la concentración de  $5 \mu\text{g/ml}$  induce la activación de procesos de muerte celular de forma independiente de caspasas pero si dependiente de la activación de PARP-1.



**Figura 2.3.- Papel de PARP-1 sobre la muerte celular inducida por doxorrubicina.** (A) Ensayo de formación de colonias (CFA) realizado con diferentes concentraciones de doxorrubicina sobre las líneas celulares 3T3 MEF *parp-1<sup>+/+</sup>* y *parp-1<sup>-/-</sup>*, 15 días tras el tratamiento. Estos resultados muestran el comportamiento de PARP-1 de acuerdo con la intensidad del daño inflingido en el ADN. La fracción de supervivencia se determinó a partir del análisis de tres experimentos independientes y se corrigió mediante el cálculo de la eficiencia de formación de colonias de las células sin tratar (condiciones control). Las barras de error representan error estándar de la media (SEM). (B) Análisis de la muerte celular inducida por doxo con o sin Z-VAD.fmk (50  $\mu\text{M}$ ), medida por citometría de flujo con anexina-V, 24 horas tras el tratamiento. La muerte celular es independiente de la activación de las caspasas.

**C****D**

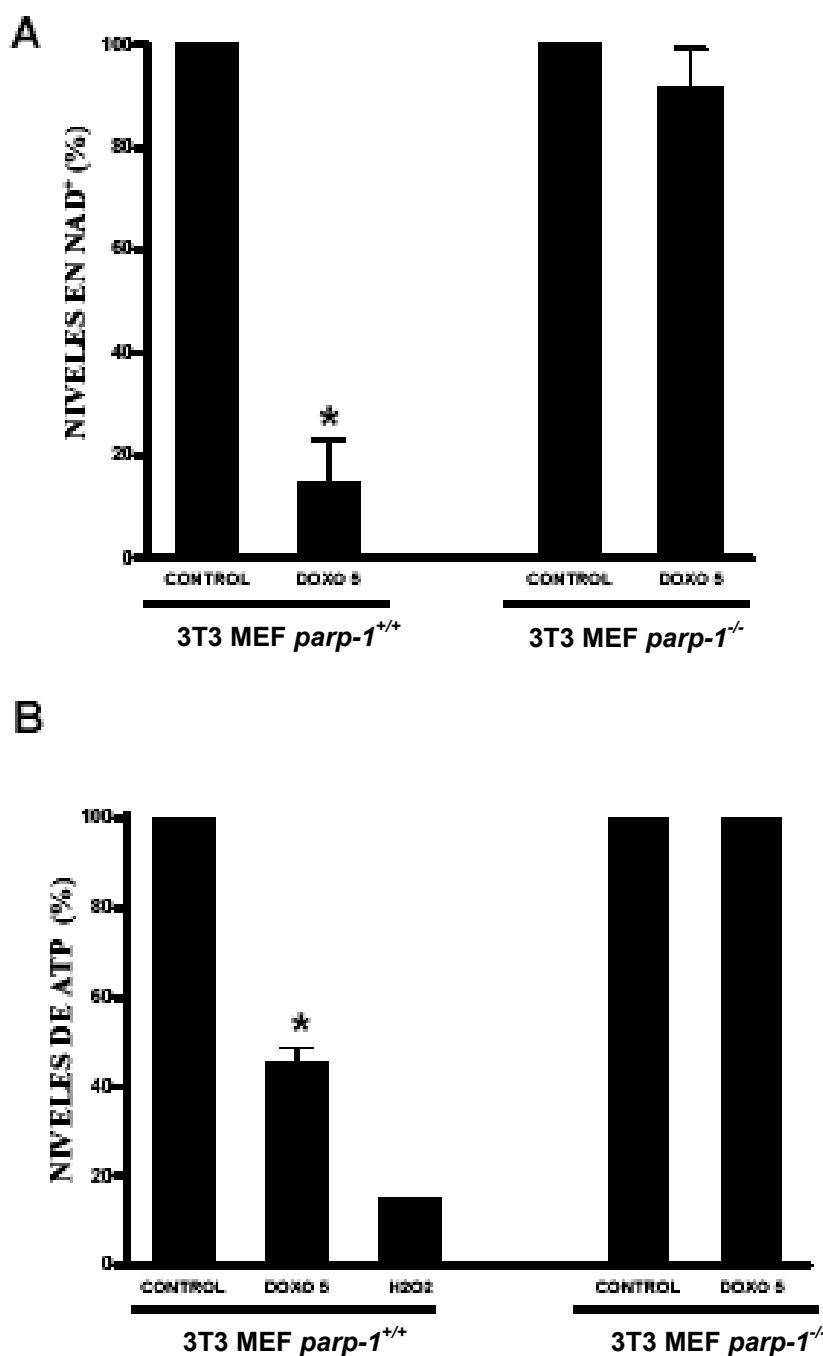
**Figura 2.3.- Papel de PARP-1 sobre la muerte celular inducida por doxorrubicina. (C)** El uso de ANI 10 µM (inhibidor de PARP), confirmó que la muerte celular es dependiente en parte de la activación de PARP-1 (medido por citometría de flujo con anexina-V, 24 horas tras el tratamiento). Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM) de al menos cuatro experimentos independientes. \* p<0.001 respecto a células control *parp-1*<sup>+/+</sup> y células *parp-1*<sup>-/-</sup> control y tratadas con doxo (figura B y C), \*\* p<0.01 respecto a células tratadas con doxo (figura C). **(D)** Fragmentación de PARP-1 mediada por caspasa 3 en células *parp-1*<sup>+/+</sup> evaluado por western blot. Se utilizó estaurosporina 1 µM (12 horas) como control positivo de la fragmentación de PARP-1 (se muestra el fragmento de 85 KDa). Doxo (5 µg/ml) no produjo la activación de caspasa 3 después de 48 horas del tratamiento, confirmando que esta muerte transcurre sin activación de las caspasas.

#### 2.4.4.- Doxorrubicina (5 µg/ml) produce un alto consumo de NAD<sup>+</sup> y ATP

Como se ha demostrado a lo largo de los experimentos realizados en este trabajo, doxorrubicina es un potente activador de PARP-1. Tras su activación PARP-1 cataliza la síntesis de largos y ramificados polímeros de poli (ADP-ribosa) sobre las histonas y otras proteínas asociadas a la cromatina en la proximidad del daño en el

ADN. Este proceso señala a la maquinaria de reparación del ADN el lugar dañado y facilita el correcto desarrollo de la reparación (D'Amours et al. 1999). Como la  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotido ( $\text{NAD}^+$ ) es el sustrato para la reacción de poli (ADP-ribosilación), la activación de PARP-1, conlleva el consumo de dicho sustrato. Se ha descrito que la sobre-activación de PARP-1 produce la reducción masiva del contenido celular de  $\text{NAD}^+$  y esto desencadena en la bajada de los niveles de ATP y conlleva por tanto a la muerte celular por necrosis (Szabo and Dawson 1998; Pieper et al. 1999). Para dilucidar si doxorrubicina a concentraciones moderadamente elevadas provoca un colapso energético que desencadena posteriormente la activación de los procesos necróticos, se procedió a la medición de los niveles celulares de  $\text{NAD}^+$  y ATP según los protocolos descritos en el apartado de material y métodos (Pág. 135-136). Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con doxorrubicina 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  origina una reducción importante en el contenido de  $\text{NAD}^+$  en los fibroblastos *parp-1<sup>+/+</sup>*, alcanzando valores cercanos al 83% de consumo y dejando los niveles celulares de  $\text{NAD}^+$  en valores inferiores al 17% (figura 2.4 A).

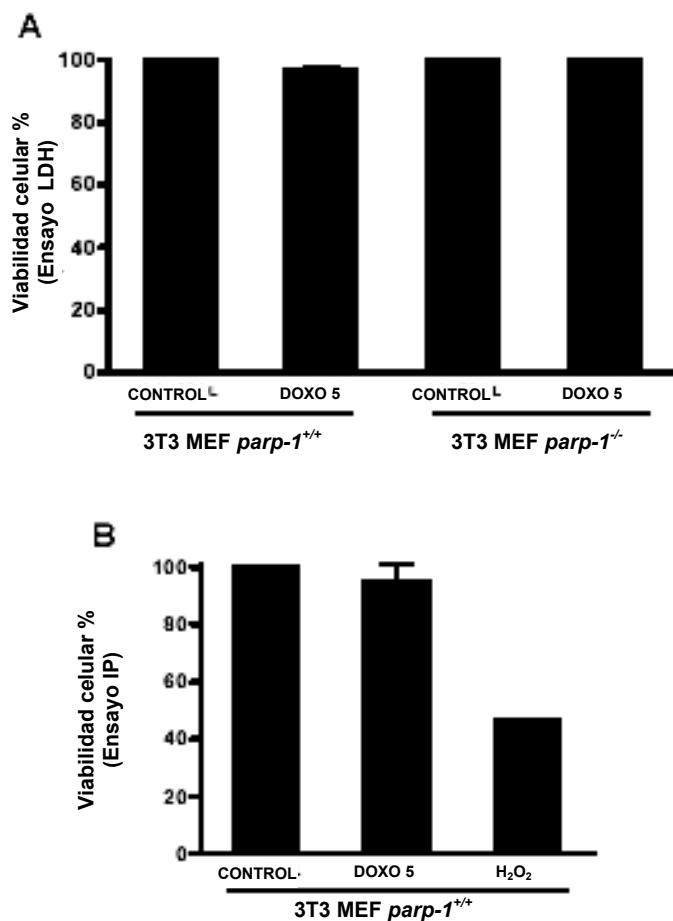
El tratamiento con doxo causó el mismo efecto sobre el contenido celular en ATP en los fibroblastos *parp-1<sup>+/+</sup>* (figura 2.4 B). Sin embargo, el contenido en  $\text{NAD}^+$  y ATP no se vio afectado en los fibroblastos *parp-1<sup>-/-</sup>* tratados con la misma concentración de doxorrubicina (figuras 2.4 A y 2.4 B).



**Figura 2.4.- Efecto de la activación de PARP-1 sobre los niveles celulares de NAD<sup>+</sup> y ATP tras tratamiento con doxo.** Las líneas celulares *parp-1*<sup>+/+</sup> y *parp-1*<sup>-/-</sup> se trataron con doxorrubícina (5 µg/ml) durante 1 hora y se analizaron 48 horas tras dicho tratamiento. Los niveles de NAD<sup>+</sup> representados (figura 2.4 A) y los de ATP (figura 2.4 B), se normalizaron mediante la concentración de proteínas de cada muestra y se expresaron en porcentaje con respecto al control (100%). El tratamiento con doxo originó un decrecimiento importante en los niveles de NAD<sup>+</sup> y de ATP en los fibroblastos *parp-1*<sup>+/+</sup> a diferencia de lo ocurrido sobre los fibroblastos *parp-1*<sup>-/-</sup>. Se utilizó agua oxigenada (30 minutos, 10 mM), como control positivo del consumo en ATP. Las barras de error representan el error estándar de la media de cuatro experimentos independientes (SEM). \*p < 0.001 con respecto a las células control *parp-1*<sup>+/+</sup>, células *parp-1*<sup>-/-</sup> control y doxo, en ambas gráficas.

#### 2.4.5.- Doxorrubicina no induce muerte celular por necrosis

Mediante el análisis de los datos obtenidos en los apartados anteriores (doxorrubicina induce una muerte celular independiente de caspasas, dependiente de la activación de PARP-1 y origina un elevado consumo en NAD<sup>+</sup> y ATP), se puede pensar en la posibilidad de que dichos eventos de muerte sean debidos a procesos de necrosis.



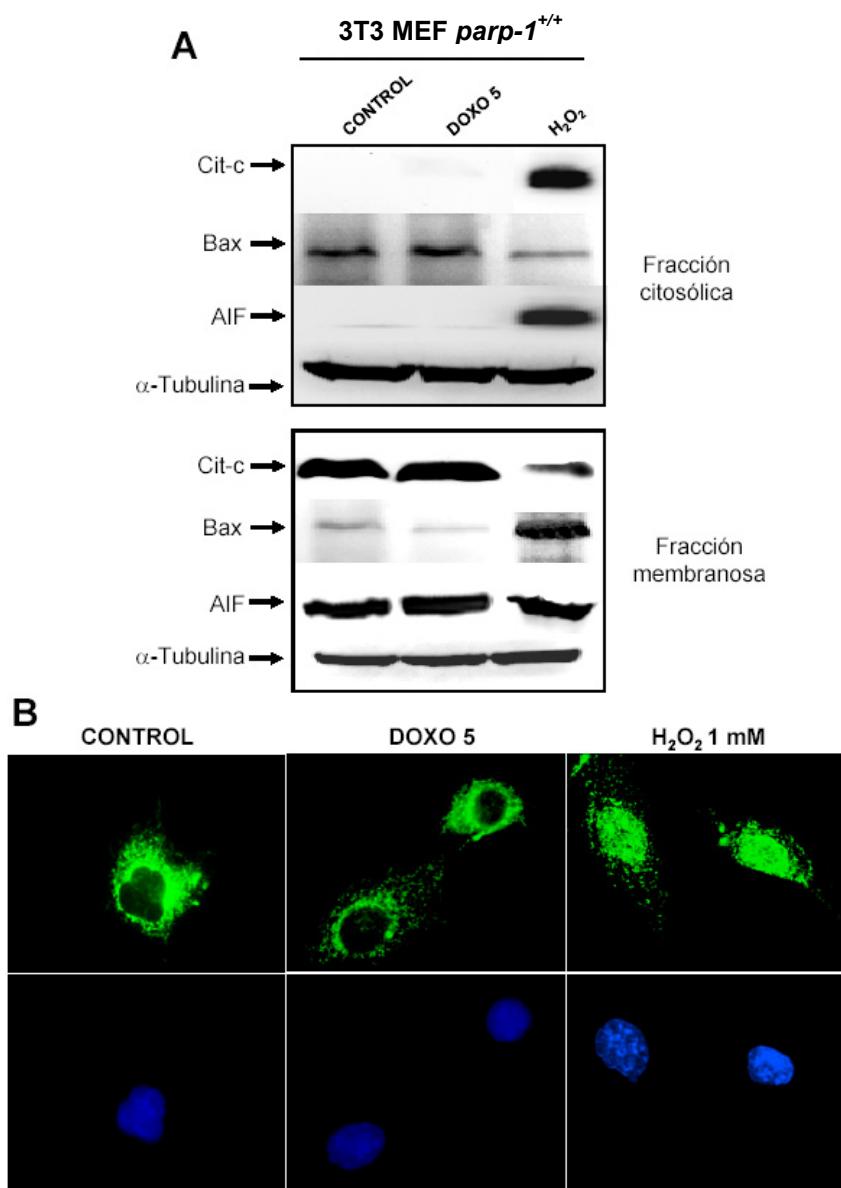
**Figura 2.5.- Doxorrubicina (5 µg/ml) no produce muerte celular por necrosis.** La necrosis fue evaluada a través de la medición de LDH en el medio extracelular (A) y por citometría de flujo mediante la tinción con ioduro de propidio (IP) (B), en los fibroblastos *parp-1*<sup>+/+</sup> y *parp-1*<sup>-/-</sup>, tratados con doxo a la concentración de 5 µg/ml durante 1 hora y medido a las 48 horas después del tratamiento. Estos resultados muestran que la muerte celular no es por necrosis. Se utilizó como control positivo de muerte celular por necrosis H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min, 10 mM) en el ensayo de tinción con IP. Las barras de error representan el error estándar de la media de al menos tres experimentos independientes (SEM).

Con el objetivo de analizar si la muerte celular inducida por doxo y dependiente de PARP-1 era debida a necrosis hemos realizado las técnicas de detección de lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio extracelular. LDH se libera desde el citosol a través de las membranas plasmáticas dañadas y es un evento característico de la necrosis (figura 2.5 A). Para confirmar estos resultados se ha realizado la tinción con Ioduro de

Propidio (IP) en células sin permeabilizar, la cual se sometió a análisis mediante citometría de flujo. Las células con la membrana plasmática en perfecto estado no permiten la entrada del compuesto IP, sin embargo, las células positivas para este agente presentan daños en la membrana plasmática, considerándose la entrada de IP una señal de necrosis (figura 2.5 B). El protocolo seguido ha sido descrito con detalle en el apartado de material y métodos (Pág. 132). La correspondencia de ambos resultados demuestra que doxorrubicina (5 µg/ml) tras 48 horas, en estas líneas celulares no produce muerte celular por necrosis.

#### **2.4.6.- Estudio de los eventos mitocondriales tras el tratamiento con doxorrubicina**

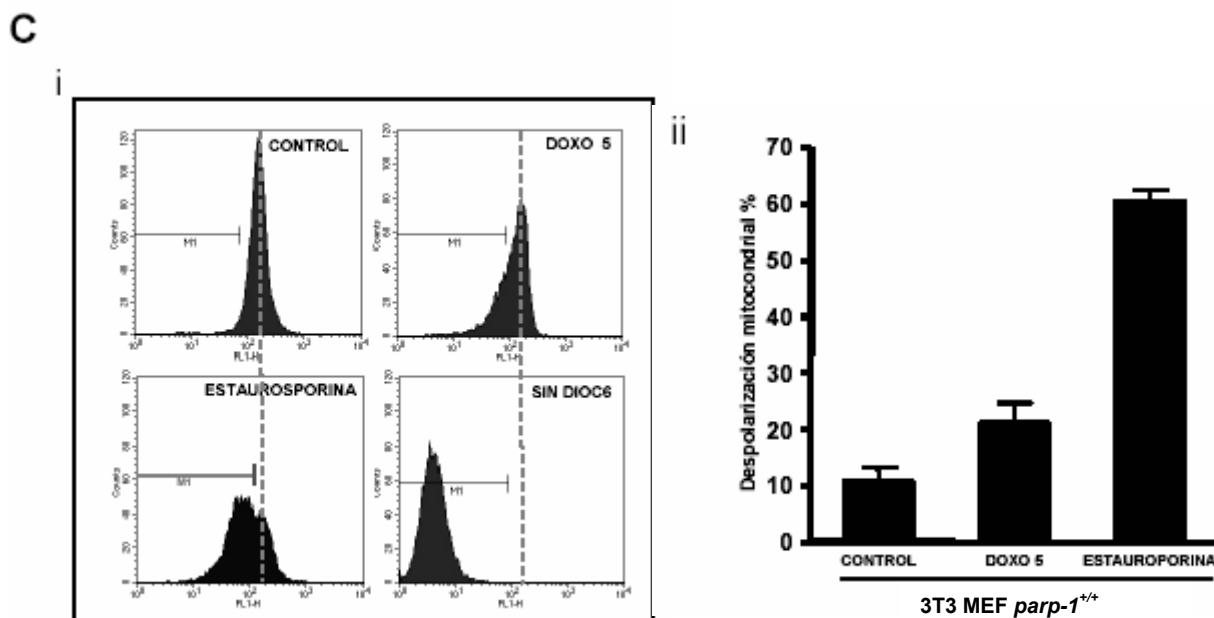
Existen datos bibliográficos que indican que PARP-1 participa directamente en los procesos muerte celular a través de la liberación de proteínas mitocondriales, como por ejemplo, la proteína AIF. Se ha descrito que la activación de PARP-1 es un proceso necesario para la activación de la liberación de AIF mitocondrial y su migración al núcleo, donde produce fragmentación en tamaños grandes (no oligonucleosomales) del ADN y en consecuencia la muerte celular (Yu et al. 2002; Wang et al. 2003; Alano et al. 2004). Se ha propuesto que el consumo energético derivado de la activación de PARP-1 e incluso el propio polímero, como señales que desencadenan la liberación de AIF. Con el objetivo de analizar la implicación de los procesos mitocondriales en la muerte celular inducida por doxo, se ha estudiado la liberación de citocromo-c y AIF de la mitocondria, la migración de Bax a dicho orgánulo, así como los fenómenos de despolarización mitocondrial. Mediante experimentos de western blot realizados sobre extractos citosólicos y sobre la fracción membranosa de las células tratadas con doxorrubicina (5 µg/ml 1hora, realización de extractos a las 48 horas después del tratamiento), no se observa la liberación de citocromo-c o AIF desde la fracción membranosa al citosol (figura 2.6 A). Asimismo, tampoco hemos observado la migración de Bax a la mitocondria tras el tratamiento. Ya que el método de análisis de western blot no es el mejor para determinar la liberación de AIF, aunque ha sido utilizado en algunos artículos, hemos realizado ensayos de inmunofluorescencia frente a AIF para poder analizar con más profundidad el desplazamiento de esta proteína. Los resultados obtenidos (figura 2.6 B), indican que no existe migración nuclear de AIF inducida por el tratamiento con doxorrubicina, con lo que se pueden confirmar los datos obtenidos por western blot (figura 2.6 A).



**Figura 2.6.- Eventos mitocondriales en la muerte celular inducida por doxorrubicina.** (A) Western blot de las fracciones citosólicas y membranosas en células *parp-1*<sup>+/+</sup> 48 horas tras el tratamiento con doxo (5 µg/ml, 1 hora). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 min, 1 mM) se utilizó como control positivo de la liberación mitocondrial de citocromo c, AIF y desplazamiento de Bax a la mitocondria. Los resultados muestran que no existe liberación de citocromo c ni de AIF, así como el desplazamiento de Bax a la mitocondria. (B) Inmunofluorescencia de las células 3T3 MEF *parp-1*<sup>+/+</sup> para la liberación mitocondrial de AIF y su migración nuclear (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Las células se trataron con doxo 5 µg/ml durante 1 hora y se fijaron 48 horas después del tratamiento. Las imágenes muestran que no existe liberación de AIF, ni por lo tanto su migración al núcleo. Se empleó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM como control positivo de dicha liberación y migración nuclear de AIF.

Para un mejor análisis de los eventos mitocondriales implicados en la muerte celular inducida por doxorrubicina, se ha examinado la caída del potencial de membrana mitocondrial tras el tratamiento con doxorrubicina, siguiendo el protocolo indicado en

el apartado de material y métodos (Pág. 135). Como se observa en la figura 2.6 C, una ligera caída del potencial de membrana mitocondrial sigue al tratamiento con doxo (2 veces con respecto al control), pero la caída queda lejos de la que se observa tras el tratamiento con estaurosporina. De estos resultados, se puede deducir que los eventos mitocondriales permanecen prácticamente inalterados durante el desarrollo de este tipo de muerte celular inducida por doxorrubiciна.

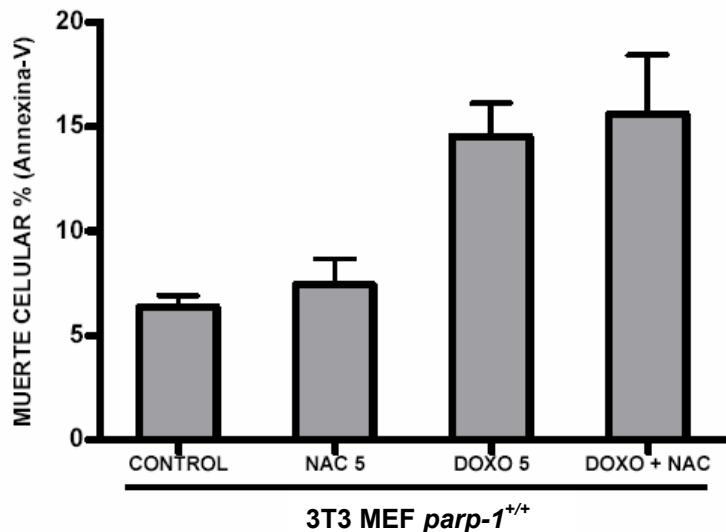


**Figura 2.6.- Eventos mitocondriales en la muerte celular inducida por doxorrubiciна.** (C, i) Medida del potencial de membrana mitocondrial transcurridas 48 horas del tratamiento con 5 µg/ml de doxo, detectado por citometría de flujo con tinción con DIOC6. Las marcas sobre los histogramas indican la región de la población utilizada para el análisis (población con bajo potencial de membrana). (C, ii) Análisis y representación por histogramas de la despolarización mitocondrial. Una pequeña caída del potencial se observó tras la incubación con doxo (2 veces frente al control). Se utilizó estaurosporina (12 horas, 1 µM), como control positivo.

#### 2.4.7.- ¿Ejerce su acción doxorrubiciна a través de la inducción de estrés oxidativo?

El mecanismo de acción de doxorrubiciна ha sido atribuido principalmente a dos factores, a su papel como inhibidor de la topoisomerasa II que produce roturas en el ADN y a su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno (ROS). Este proceso produce a su vez daños en el ADN y puede dirigir a la muerte celular (Gutierrez et al. 2000; Kurz et al. 2004). Para intentar discernir qué faceta es la responsable de la ejecución del daño en el ADN, hemos utilizado N-acetil cisteína (NAC, 5 mM), como potente agente antioxidante. El uso de NAC no protege de la muerte celular producida

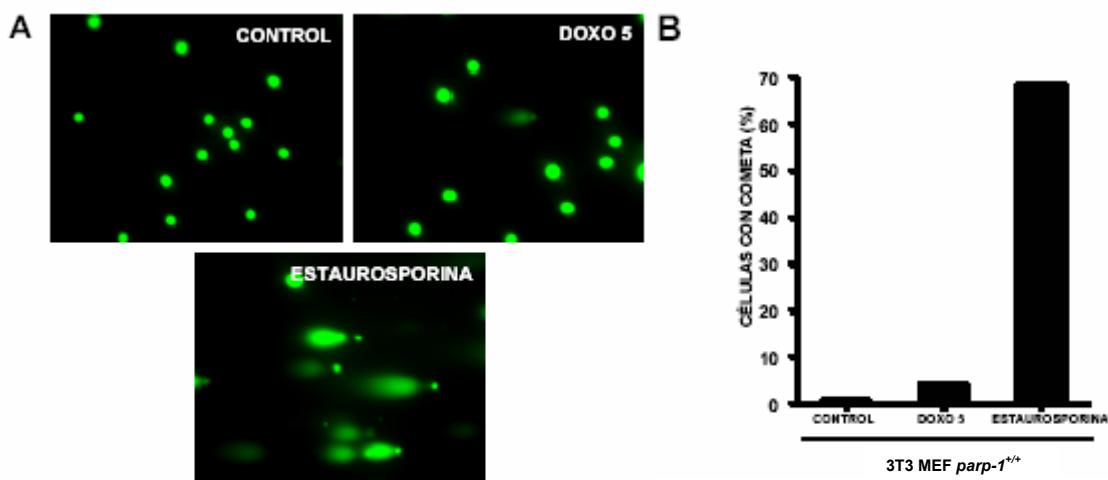
por doxo, lo que sugiere que la acción de doxo se ejerce directamente sobre el ADN como inhibidor de la topoisomerasa II y no a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (figura 2.7).



**Figura 2.7.- Estrés oxidativo y doxorrubicina.** Se evaluó si el compuesto N-acetil-L-cisteina (NAC, 5 mM, agente antioxidante y precursor de glutatión), ejerce un papel protector en la muerte celular producida por doxo. El análisis de la muerte celular se realizó por citometría de flujo con anexina-V (24 Horas). No se observa protección tras el tratamiento con NAC. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM), de al menos tres experimentos independientes.

#### 2.4.8.- Estudio de la fragmentación del ADN en los procesos de muerte generados por doxorrubicina

Para la detección de la posible fragmentación del ADN asociada a la muerte celular inducida por doxorrubicina hemos realizado el ensayo cometa en condiciones neutras. En estas condiciones el ensayo cometa ha sido descrito como un procedimiento apropiado para la media de la fragmentación oligonucleosomal del ADN ocurrida durante la apoptosis (Yasuhara et al. 2003). Nuestros resultados indican no se detectan células con cometa que transcurridas 48 horas del tratamiento con doxo (5 µg/ml, 1 hora), sugiriendo que la muerte celular ocurre en ausencia de fragmentación en el ADN (figura 2.8 A y B). Este resultado constituye nueva prueba acerca de la no implicación de la apoptosis en la muerte celular generada por doxo a la dosis de 5 µg/ml. El protocolo experimental seguido ha sido descrito en el apartado de material y métodos (Pág. 137).



**Figura 2.8.- Ensayo cometa en condiciones neutras en células 3T3 MEF *parp-1*<sup>+/+</sup>.** (A) Las células fueron procesadas para el ensayo cometa 48 horas después de la estimulación con doxo (5 µg/ml). Se utilizó estauroporina (12 horas, 1 µM) como control positivo. (B) Se procedió al recuento de más de 800 núcleos por cada condición y se anotaron los núcleos que presentaban cometas. Las columnas representan el porcentaje de células con cometa en cada condición.

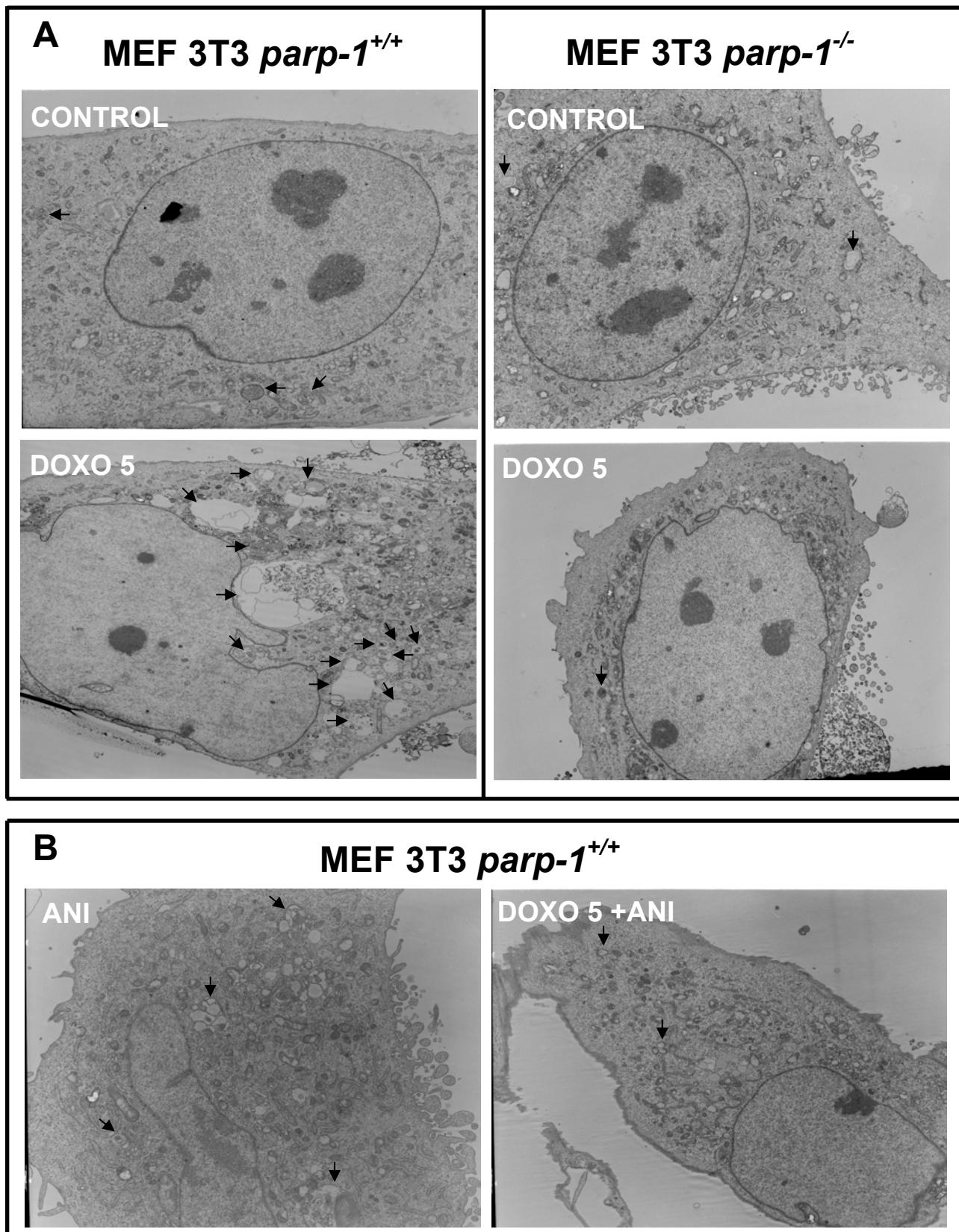
#### 2.4.9.- La muerte celular ejercida por doxorrubicina posee las características de la muerte celular autofágica o muerte celular programada tipo II

Para determinar la morfología celular que caracteriza a la muerte inducida por doxorrubicina hemos realizado estudios de la conformación celular mediante microscopía electrónica. Las imágenes obtenidas demuestran que la muerte celular inducida por doxo (5 µg/ml, 48 horas) en los fibroblastos *parp-1*<sup>+/+</sup>, se acompaña de la presencia de abundantes vesículas autofágicas (flechas en la figura 2.9 A). Estas vesículas presentan orgánulos citosólicos en su interior (mitocondrias, etc.) y abundante contenido de desecho. Las vesículas son de considerable tamaño y ocupan en ciertas ocasiones, la mayor parte del citosol. Además se observa el engrosamiento del aparato de Golgy y la frecuente dilatación del retículo endoplasmático (figura 2.9 C, indicado por dos flechas). Los núcleos permanecen intactos durante todo el proceso y la membrana plasmática no presenta discontinuidades en ningún momento (corroborando una vez más los datos de que doxo no provoca muerte celular por necrosis además de los resultados sobre la fragmentación nuclear). Las imágenes de microscopía electrónica muestran la morfología típica de la muerte celular tipo II o autofágica (Gozuacik and Kimchi 2004). Esta morfología, caracterizada por la gran proliferación de vesículas autofágicas, está considerablemente reducida en los fibroblastos 3T3 *parp-*

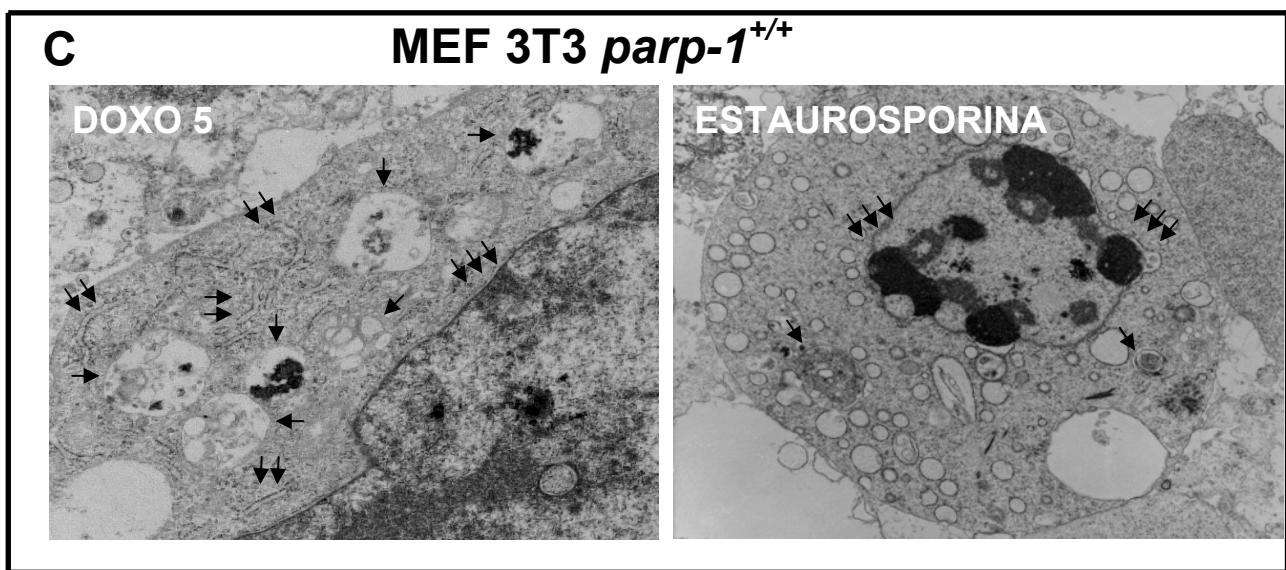
*I<sup>-/-</sup>* tratados con doxo y así como en las células *parp-1<sup>+/+</sup>* incubadas con el inhibidor de PARP, ANI (10 µM) (figura 2.9 B). Estos resultados demuestran que PARP-1 ejerce un papel importante en este tipo de muerte celular ejercida por dosis moderadamente elevadas de doxorrubicina.

Para confirmar los datos de microscopía electrónica sobre la inducción de autofagia por parte de doxorrubicina, hemos utilizado la construcción LC3-GFP. La proteína LC3 (*Microtubule-associated protein 1 light chain 3*), está implicada directamente en la formación de las vesículas autofágicas (autofagosomas) y ha sido utilizada como marcador de las mismas y por lo tanto constituye un marcador de la actividad autofagia (Kabeya et al. 2000; Kamada et al. 2000; Mizushima et al. 2001). Esta construcción fue transfectada de forma transitoria en las células *parp-1<sup>+/+</sup>* y 3T3 *parp-1<sup>-/-</sup>*, según el protocolo descrito en el apartado de material y métodos (Pág. 138). El análisis se realizó 48 horas después del tratamiento con doxo por microscopía de fluorescencia. Tras la transfección se observa un patrón difuso de la localización celular de la proteína LC3-GFP tanto en las células *parp-1<sup>+/+</sup>* como en las *parp-1<sup>-/-</sup>* no tratadas. Sin embargo, el tratamiento con doxorrubicina en las células *parp-1<sup>+/+</sup>*, origina la relocalización de la proteína LC3-GFP, mostrando un patrón punteado característico de la formación de las vesículas autofágicas (figura 2.10 A). Por el contrario, los fibroblastos *parp-1<sup>-/-</sup>* no presentan esta distribución punteada característica de la activación de la autofagia. Estos resultados demuestran que la proteína LC3 es reclutada a la membrana del autofagosoma en el proceso de muerte celular inducida por doxorrubicina, apoyando la hipótesis que surge del estudio de las imágenes de microscopía electrónica. Además, las células *parp-1<sup>+/+</sup>* tratadas con la combinación de ambos fármacos, doxo y ANI, no presentan este característico patrón punteado, indicando que la activación de PARP-1 es importante en la ejecución de la vía autofágica.

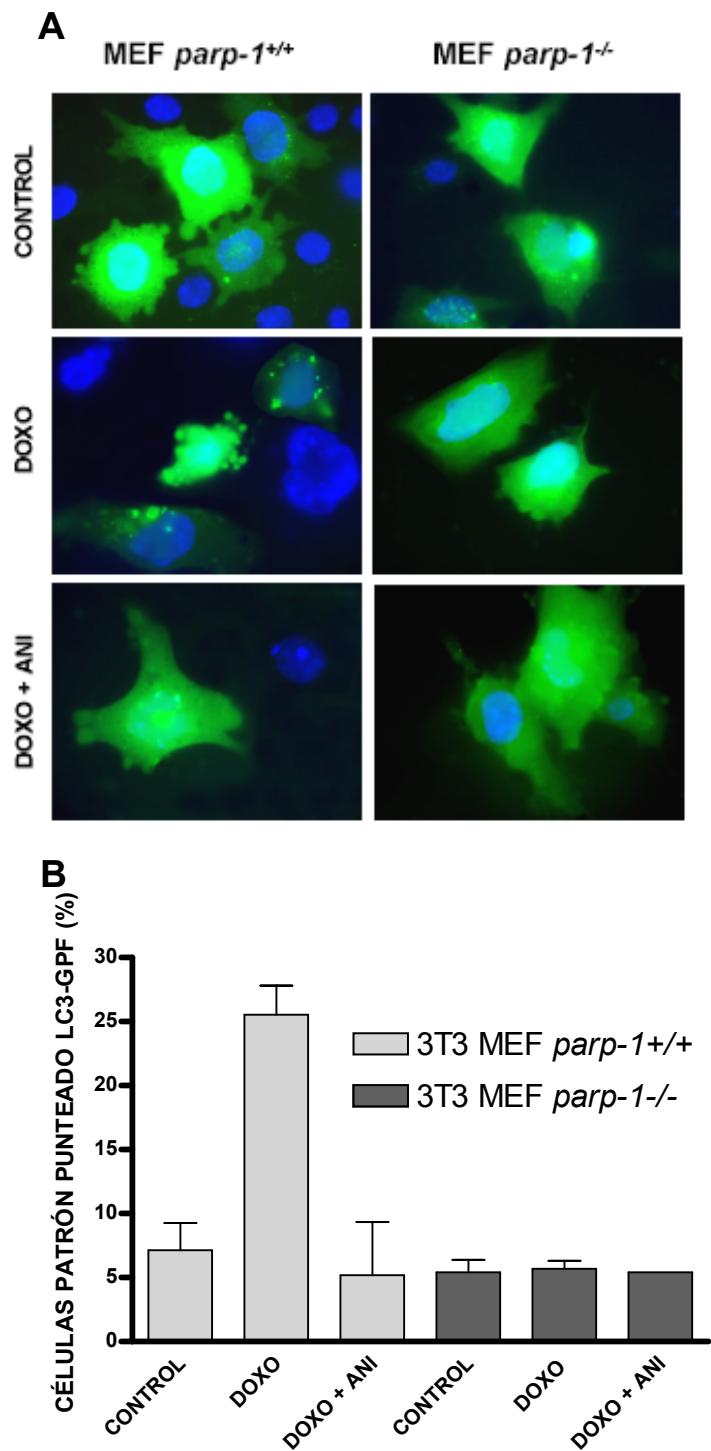
Estas observaciones indican que la activación de PARP-1 puede conectar la apoptosis y la autofagia en función de la intensidad del daño generado en el ADN, quizás a través del descenso energético originado tras dicha activación.



**Figura 2.9.- Caracterización por microscopía electrónica de transmisión de la morfología de la muerte celular producida por doxorubicina. (A)** Imágenes de microscopía electrónica de células *parp-1*<sup>+/+</sup> y *parp-1*<sup>-/-</sup> 48 horas después del tratamiento con doxorubicina (5 µg/ml, 1 hora) y **(B)** células *parp-1*<sup>+/+</sup> tratadas con ANI (10 µM) con y sin doxo. Las flechas indican la presencia de vesículas autofágicas. Se puede observar el gran tamaño y contenido de autofagosomas en las células *parp-1*<sup>+/+</sup> y prácticamente la ausencia en las *parp-1*<sup>-/-</sup> tras el tratamiento con doxo. Interesantemente, el tratamiento con ANI reduce la presencia y tamaño de dichas vesículas en las células *parp-1*<sup>+/+</sup> tratadas con doxo.



**Figura 2.9.- Caracterización por microscopía electrónica de transmisión de la morfología de la muerte celular producida por doxorrubiciна.** (C) Detalle de microscopía electrónica en células *parp-1*<sup>+/+</sup> 48 horas después del tratamiento con doxorrubiciна (5 µg/ml, 1 hora). Se puede observar el gran número de vesículas autofágicas, las cuales presentan en su interior contenido de degradación del citoplasma (indicado por flechas simples). Las flechas dobles indican la presencia de dilataciones en el retículo endoplasmático rugoso. Tres flechas muestran la posición del núcleo, que permanece intacto tras el tratamiento con doxo. Se utilizó estaurosporina como control positivo de muerte celular por apoptosis. Se puede observar la morfología característica de este tipo de muerte, como la condensación perinuclear (tres flechas) y la formación de numerosas vesículas (pero sin contenido en su interior). También se observan vesículas autofágicas (indicadas con una flecha), pero su número es muy reducido con respecto a las que se observan tras tratamiento con doxorrubiciна.



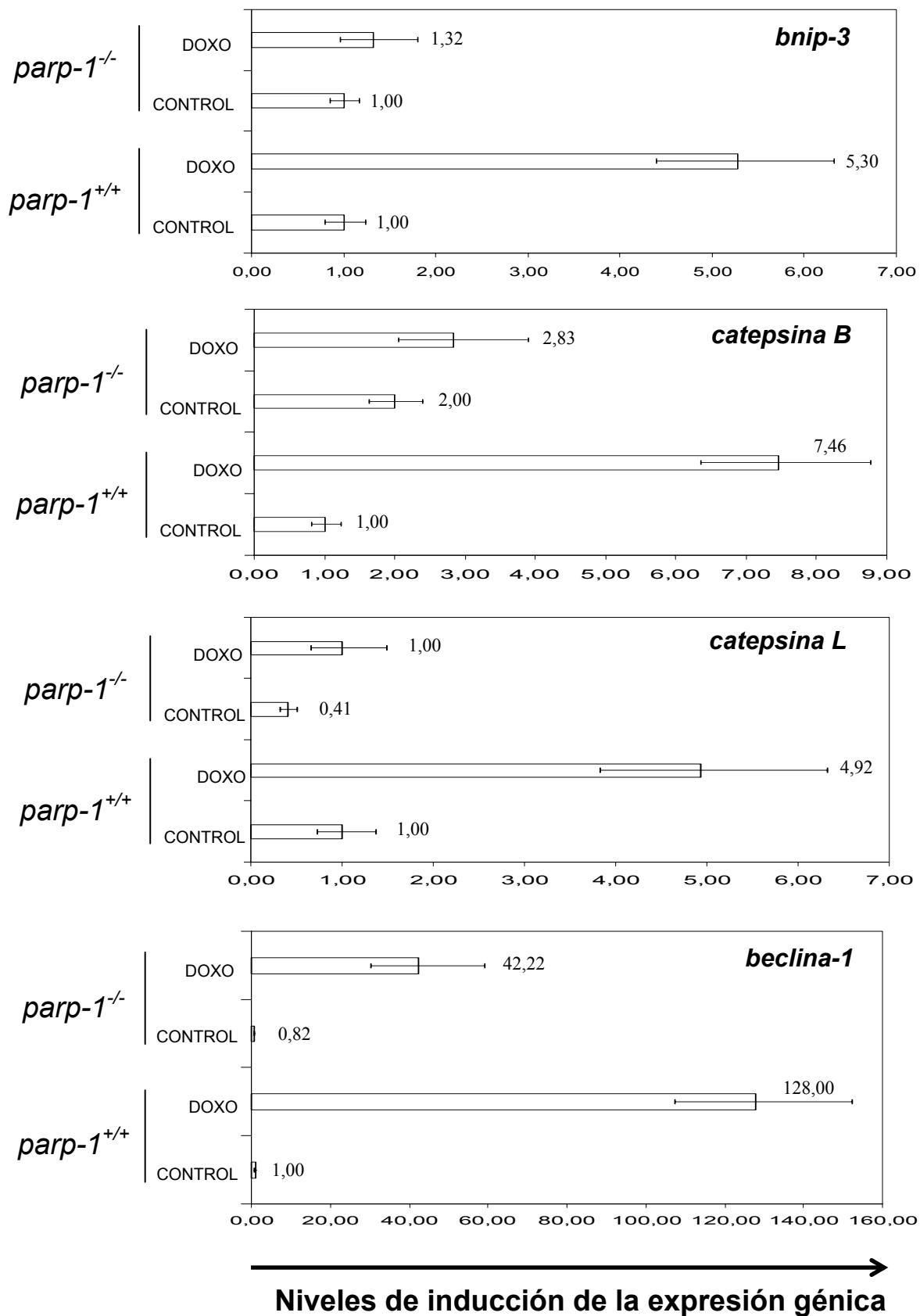
**Figura 2.10.- Efecto de doxo y ANI sobre la localización celular del marcador de vacuolas autofágicas LC3.** (A) Redistribución de LC3-GFP, 48 horas después del tratamiento con doxo. Las células fueron transfectadas de forma transitoria con la construcción LC3-GFP, tratadas con doxo (5 µg/ml) y/o ANI (10 µm), fijadas y teñidas con DAPI. Las muestras se analizaron mediante microscopía de fluorescencia. Las células *parp-1*<sup>+/+</sup> tratadas con doxo presentan un patrón punteado de LC3-GFP. Sin embargo, las células *parp-1*<sup>-/-</sup> o las *parp-1*<sup>+/+</sup> tratadas con ANI están protegidas frente a la formación de este patrón punteado originado por doxo, característico de la formación de las vesículas autofágicas. (B) Análisis por recuento del patrón punteado de LC3-GFP. Más de doscientos núcleos fueron contados para cada condición y el histograma representa el porcentaje de células que presentan este característico patrón punteado.

#### 2.4.10.- Doxorrubicina produce la sobre-expresión de genes pro-autofágicos en las células 3T3 MEF *parp-1*<sup>+/+</sup>.

Con el objetivo de evaluar si la expresión de los genes relacionados con la muerte celular por autofagia se modifica por el tratamiento con doxo, se realizaron PCRs Cuantitativas en Tiempo Real en las células 3T3 MEF *parp-1*<sup>+/+</sup> y *parp-1*<sup>-/-</sup>

tratadas con doxo. Se ha descrito que la sobre-expresión de *bnip-3*, condición necesaria y suficiente para la ejecución de la muerte celular tipo II o autofagia sobre ciertas líneas celulares de cáncer (Vande Velde et al. 2000; Kanzawa et al. 2005). La proteína BNIP-3 pertenece a la familia de Bcl-2 (en concreto a la subclase “solo BH3”), se induce tras hipoxia y no se conoce con exactitud el su mecanismo de actuación. Se ha reseñado que bajo ciertas circunstancias se integra en la membrana externa mitocondrial, se cree que como señal para la eliminación de estas mitocondrias dañadas por autofagia, pero no induce la liberación de citocromo-c o AIF (Gozuacik and Kimchi 2004). Mediante PCR en Tiempo Real se ha determinado que el gen de *bnip-3* esta sobre-expressado en las células 3T3 MEF *parp-1<sup>+/+</sup>* tras el tratamiento con doxo (5.3 veces con respecto al control sin tratar, medido 48 horas tras la incubación con doxo) y por el contrario, no fue sobre-regulado en las células *parp-1<sup>-/-</sup>* (figura 2.11). Además, se analizó la expresión de las cisteina proteinasas lisosomales, enzimas encargadas de la lisis de los contenidos celulares del autofagosoma, por tanto ejecutoras de la muerte por autofagia (Bursch 2001). La expresión de las **catepsinas B y L** está incrementada en las células *parp-1<sup>+/+</sup>* tratadas con doxo 7.5 y 4.9 veces respectivamente, con respecto a las células sin tratar. Sin embargo, no se observa un aumento de su expresión tras el tratamiento en las células deficientes en PARP-1. Finalmente, hemos evaluado la expresión del gen que codifica la proteína pro-autofágica ***beclin-1***. Esta proteína está localizada en el trans-Golgy y participa, junto con las fosfatidil inositol 3 quinasas clase III (PI3K clase III), en la transmisión de señales que derivan en la formación del autofagosoma (Liang et al. 1999; Kihara et al. 2001; Yue et al. 2003; Pattingre et al. 2005). Se ha descrito que en muchos casos de cáncer de mama, ovario y próstata se produce la eliminación de uno de los dos alelos del gen de la *beclin-1* (Liang et al. 1999; Qu et al. 2003; Yue et al. 2003) y que este defecto correlaciona con una reducción considerable de la actividad autofágica. En nuestro modelo, la expresión del gen de la *beclin-1* aparece incrementada considerablemente (128 veces) en las células *parp-1<sup>+/+</sup>* después del tratamiento con respecto a los fibroblastos control. Sin embargo, el aumento en la expresión del gen de la *beclin-1* en las células deficientes en PARP-1 es muy inferior al producido en las células que expresan esta proteína.

Por tanto, el tratamiento con doxo incrementa la expresión de los genes pro-autofágicos en las células *parp-1<sup>+/+</sup>* tras el tratamiento con doxo, lo cual confirma los datos mostrados en apartados anteriores y corrobora de forma sólida, la implicación de PARP-1 en estos procesos de muerte celular autofágica.



---

**Figura 2.11.- Expresión diferencial de genes pro-autofágicos medidos por PCR cuantitativa a Tiempo Real.** El ARN total se aislo de células *parp-1<sup>+/+</sup>* y *parp-1<sup>-/-</sup>* controles y tratadas con doxo (5 µg/ml), transcurridas 48 horas de la incubación. 2 µg de ARN fue usado para la síntesis de ADN complementario mediante PCR de transcripción inversa obteniéndose 20 µl del producto. Con el ADN complementario se analizó la expresión de ciertos genes pro-autofágicos implicados en la formación de los autofagosomas y en la muerte celular por autofagia. *bnip-3*: (*BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3*), *catepsina B*, *catepsina L* y *beclin-1*. La expresión de estos genes implicados en autofagia resulta incrementada considerablemente tras el tratamiento con doxorrubicina con respecto a las células control en las células *parp-1<sup>+/+</sup>*; por el contrario, no se observa tal inducción en las células *parp-1<sup>-/-</sup>* tratadas con doxo. Todos los experimentos de PCR en tiempo real se realizaron de forma independiente por triplicado y en todos los casos las curvas estándar presentaron un coeficiente de correlación superior a 0.98. Los resultados fueron normalizados con la expresión del *18S ARNr* para cada una de las muestras. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes.

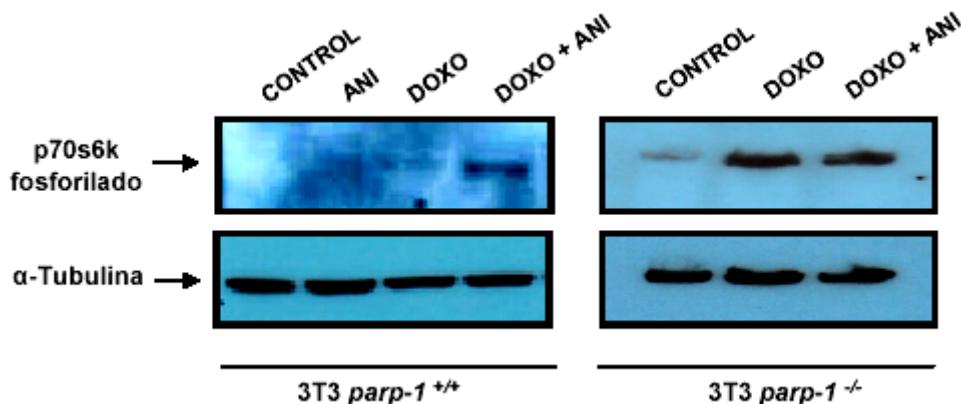
---

#### 2.4.11.- Implicación de mTOR en la autofagia inducida por Doxorrubicina.

La autofagia es la mayor vía de degradación de proteínas de larga vida (*long-lived proteins*) y de orgánulos citoplasmáticos en células eucariotas (Levine and Klionsky 2004). Una gran variedad de estímulos tanto intracelulares como procedentes del exterior de la célula (reducción del contenido en aminoácidos y la invasión de microorganismos, etc.) son capaces de inducir en las células la respuesta por autofagia. El descubrimiento de los genes *atg* en levaduras y su implicación en autofagia ha sido el detonante que ha permitido el gran avance experimentado en el conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en la autofagia y de los genes implicados en la regulación de esta vía. Se han descrito los genes homólogos en mamíferos para los genes *atg* de levaduras, esto sugiere que la maquinaria básica de la autofagia ha sido altamente conservada a lo largo de la evolución (Yang et al. 2005). La regulación de la autofagia es un proceso muy complicado y han sido descritas muchas vías de señalización participantes en la activación de la misma. Entre las rutas de control se incluye la vía PI3K-I/AKT y en concreto juega un papel importante la proteína mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*). La proteína mTOR actúa como un sensor del contenido en aminoácidos y de ATP intracelulares (Beugnet et al. 2003). Además, esta proteína funciona a través de su conexión con la vía PI3K-I y AKT, en la recepción y transmisión de las señales de factores de crecimiento y niveles de nutrientes extracelulares (Petiot et al. 2000). Se ha descrito que la proteína mTOR actúa como un interruptor de la vía autófágica mediante la detección de los niveles energéticos y

factores de crecimiento tanto internos como externos (Meijer and Codogno 2004). Los mecanismos por los cuales la proteína TOR regula la autofagia han sido estudiados principalmente en levaduras. En este modelo TOR fosforila la proteína ATG-13 cuando los niveles de nutrientes son elevados. ATG-13 fosforilado tiene baja afinidad por ATG-1 promoviendo la reducción de la actividad quinasa de ATG-1, lo que conduce a la inhibición de la autofagia. Por el contrario, cuando los niveles energéticos o de aminoácidos son reducidos, la proteína TOR está inactiva, ATG-13 es rápidamente desfosforilado y se asocia fuertemente con ATG-1 activando la inducción de la autofagia (Kamada et al. 2000).

En este trabajo hemos estudiado la activación de mTOR tras tratamiento con doxorrubicina en las células *parp-1<sup>+/+</sup>* y *parp-1<sup>-/-</sup>* mediante western blot frente a la proteína p70s6k (fosforilada), que es un sustrato directo de mTOR y que se utiliza habitualmente como indicador indirecto de la activación de mTOR (Kanazawa et al. 2004; Lafay-Chebassier et al. 2005; Ito et al. 2006).



**Figura 2.12.- Western blot de la proteína p70s6k fosforilada como medida indirecta de la activación de mTOR.** Las células se tratan con ANI (10  $\mu$ M), al menos dos horas antes del tratamiento con doxorrubicina (1 hora, 5  $\mu$ g/ml) y ANI estuvo presente durante todo el experimento. Transcurridas 48 horas se realizaron western blot frente a la proteína p70s6k que se fosforila por mTOR y que se utiliza de forma indirecta como indicador de la activación de la proteína mTOR. Se utilizó  $\alpha$ -tubulina como control de carga. Los resultados muestran que tras el tratamiento con doxo, la ausencia de la proteína PARP-1 o su inactivación con ANI desencadena en la activación de mTOR. La activación de mTOR regula negativamente la activación de la autofagia mediante la fosforilación e inactivación de proteínas ATG claves en el desarrollo de la misma (Kanazawa et al. 2004).

Como se puede observar en la figura 2.12, tras el tratamiento con doxorrubicina, la ausencia de PARP-1 o la inhibición de la actividad de PARP produce la fosforilación de la proteína p70s6k y por lo tanto la activación de mTOR que desencadena en la

inactivación de la autofagia y en la protección de estas células frente a las tratadas con doxo.

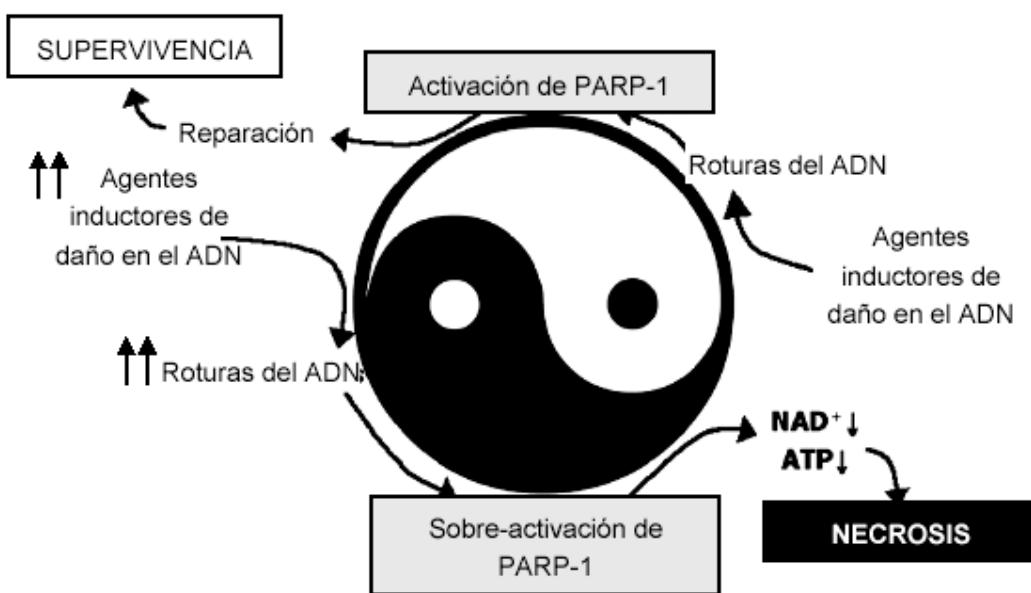
La reducción de los niveles energéticos tras el tratamiento con doxo, desencadenados por la sobre-activación de PARP-1 y la posterior detección de este descenso energético por la proteína mTOR origina su inactivación y la consiguiente inducción de la vía autofágica de muerte celular en los fibroblastos *parp-1<sup>+/+</sup>*. Este evento puede explicar así mismo, los fenómenos de protección observados en los fibroblastos *parp-1<sup>-/-</sup>* tras tratamiento con doxo así como la protección de los fibroblastos *parp-1<sup>+/+</sup>* tratados conjuntamente con el inhibidor de PARP, en los que no se produce descenso energético y en los que la proteína mTOR permanece activa bloqueando la ejecución de los procesos de autofagia.

## 2.5.- DISCUSIÓN

La poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1), es una proteína nuclear muy abundante que se encuentra constitutivamente expresada y que actúa como un sensor de roturas del ADN. Tras la unión de PARP-1 al ADN dañado se produce su activación, produciendo la disociación del sustrato NAD<sup>+</sup> en nicotinamida y en ADP-ribosa que se utiliza como monómero para la formación de largos y ramificados polímeros de poli (ADP-ribosa) sobre diferentes proteínas aceptadoras, como las histonas, los factores de transcripción, las proteínas de reparación y la propia PARP-1 (Introducción General, Pág. 12) (D'Amours et al. 1999). La modificación post-transduccional de proteínas por poli (ADP-ribosilación) contribuye a la reparación del ADN dañado y al mantenimiento de la integridad genómica. Por otra parte, la sobre-activación de PARP-1 ejercida por daños elevados sobre el ADN origina un alto consumo en NAD<sup>+</sup> y a su vez una reducción elevada de los niveles de ATP, culminando en disfunción celular y necrosis (Virag and Szabo 2002). Este mecanismo de muerte celular ha sido descrito en las complicaciones producidas en las enfermedades inflamatorias (ictus cerebral, isquemia de miocardio, diabetes, disfunción cardíaca asociada a diabetes, choque séptico, artritis, colitis, etc.), en las cuales, el estrés oxidativo originado induce la sobre-activación de PARP-1 y el consumo energético que deriva en necrosis. El uso de inhibidores de PARP-1 reduce los efectos patológicos de dichas enfermedades, protegiendo a la célula del alto consumo energético que conlleva la sobre-activación de PARP-1 y de la asociada muerte celular necrótica (Virag and Szabo 2002; Di Paola et al. 2005; Graziani et al. 2005; Kaplan et al. 2005; Strosznajder et al. 2005; Virag 2005). Debido a este papel beneficioso de la activación de PARP-1, así como por los efectos adversos descritos derivados de su sobre-activación, ciertos autores han denominado a este fenómeno como el yin-yang de la activación de PARP-1, o la espada de doble filo, haciendo referencia a su participación en reparación (supervivencia) y su implicación en muerte celular (figura 2.13).

Además, PARP-1 se degrada por la acción de las caspasas-3 y -7 durante la ejecución de la apoptosis (Tewari et al. 1995; D'Amours et al. 1998; Germain et al. 1999). La inactivación de PARP-1 es de vital importancia para el adecuado desarrollo de la apoptosis. Con su fragmentación se evita la activación de PARP-1 y el intento de reparación de la fragmentación oligonucleosomal originada durante el proceso

apoptótico, preservándose los niveles energéticos necesarios para el desarrollo de este mecanismo de muerte. De la misma forma, se ha descrito que la fragmentación de PARP-1 es necesaria para la activación de la endonucleasa DNAS1L3 durante la ejecución de la apoptosis, que se encuentra inhibida por poli (ADP-ribosilación) (Boulares et al. 2002). Sin embargo, PARP-1 parece que no es necesaria para el desarrollo de la apoptosis, es decir, no participa directamente activando o regulando esta ruta de muerte, pero su fragmentación si constituye un evento importante para el transcurso de la misma para evitar el consumo energético asociado.



**Figura 2.13.- El Yin-Yang de la activación de PARP-1.** En la figura se describe el efecto beneficioso de la activación de PARP-1 que conlleva a supervivencia mediante la estimulación de los procesos de reparación (Yin-) y el efecto negativo de su sobre-activación que origina un alto consumo energético, disfunción celular y la activación de la muerte celular por necrosis (Yang). Finalmente, como consecuencia de la necrosis, se activan los procesos inflamatorios derivados. Figura adaptada de (Virág and Szabó 2002).

Por el contrario, si se ha relacionado a PARP-1 con la muerte celular dependiente de la proteína AIF (Yu et al. 2002). En este proceso, la liberación mitocondrial de AIF y su migración al núcleo es dependiente de la activación de PARP-1 tras daño en el ADN.

El objetivo del presente estudio ha sido dilucidar el doble papel que juega PARP-1 como potenciador o como protector del efecto citotóxico ejercido por el agente quimioterapéutico doxorrubicina. En este trabajo se ha podido demostrar el comportamiento dual de la proteína en función de la intensidad del daño infringido en el ADN mediante el empleo de fibroblastos murinos inmortalizados 3T3 *parp-1<sup>+/+</sup>* y *parp-*

$I^{-/-}$ . Nuestros resultados muestran que con dosis reducidas de doxorrubicina, la ausencia de la proteína PARP-1, facilita la muerte celular inducida por el agente antitumoral, debido a defectos en la reparación de daños en el ADN (figura 2.3 A, inserto). Estos resultados confirman el efecto potenciador de la citotoxicidad ejercido por doxo con el tratamiento conjunto con el inhibidor de PARP, anteriormente descrito en las líneas celulares de cáncer de mama (Munoz-Gomez et al. 2005).

Por el contrario, con dosis moderadamente elevadas de doxo, los fibroblastos deficientes en PARP-1 están protegidos frente a la muerte celular producida por el tratamiento con el agente antitumoral. Además el tratamiento con 5 µg/ml de doxo produce una reducción considerable en los niveles de NAD<sup>+</sup> y de ATP en los fibroblastos que expresan esta proteína, sin embargo, hemos observado descenso en los niveles energéticos de las células deficientes en PARP-1 tras tratamiento con doxorrubicina (figura 2.4 A y B). Simultáneamente, el tratamiento con los inhibidores de PARP (ANI) en las células *parp-1<sup>+/+</sup>*, confirma que la muerte celular observada es dependiente de la activación de PARP-1 (figura 2.3 C). Estos resultados sugieren que la reducción en los niveles energéticos como resultado de la sobre-activación de PARP-1 puede ser la señal bioquímica desencadenante de la activación del proceso de muerte.

Sorprendentemente, la muerte celular inducida por dosis moderadamente elevadas de doxorrubicina y dependiente de la activación de PARP-1 no transcurre a través de las etapas que caracterizan a la necrosis, como hemos demostrado mediante el análisis de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio extracelular y la incorporación intranuclear del colorante ioduro de propidio. Además, nuestros resultados demuestran que la muerte celular dependiente de PARP-1 no es debida a la liberación mitocondrial de AIF y su posterior desplazamiento al núcleo. Por lo tanto, este trabajo se descarta los dos procesos que han sido descritos como clave en la implicación de PARP-1 en los procesos de muerte celular. En contraposición, nuestros resultados muestran que la muerte celular producida como consecuencia de la hiperactividad de PARP-1, posee las características de la muerte celular programada tipo II o autofagia (figura 2.9). Asimismo, esta muerte es independiente de la activación de las caspasas, de la liberación mitocondrial de citocromo-c, de la migración a la mitocondria de Bax, ocurre con una reducida caída del potencial mitocondrial y sin fragmentación del ADN. Estos hallazgos suponen la descripción de una novedosa e interesante implicación de la activación de PARP-1 en relación con los procesos de muerte celular.

La autofagia o muerte celular tipo II se caracteriza morfológicamente por la acumulación de vesículas autofágicas (autofagosomas y autolisosomas) que integran en su interior orgánulos y restos citoplasmáticos como mitocondrias y retículo endoplasmático. Este proceso de muerte es independiente de la activación de las caspasas y la degradación de los componentes celulares se lleva a cabo por enzimas lisosomales, como las catepsinas. La autofagia desempeña múltiples funciones fisiológicas en los organismos multicelulares, entre ellas la degradación de proteínas y el reciclado de orgánulos (Klionsky and Emr 2000; Levine and Klionsky 2004; Meijer and Codogno 2004). La autofagia ofrece una ventaja evolutiva adaptativa celular frente a la reducción de aminoácidos y de nutrientes, al ser capaz de suministrar, mediante la degradación de orgánulos y demás componentes celulares, los aminoácidos y las macromoléculas necesarias hasta el restablecimiento de las condiciones óptimas de nutrientes. Sin embargo, bajo condiciones severas de reducción en el contenido en nutrientes y energía, se promueve la sobre-activación de la maquinaria autofágica. Este fenómeno puede originar la desregulación de la maquinaria celular por degradación de sus orgánulos y demás componentes celulares e induce muerte celular tipo II o autofagia de forma irremediable. Esta situación en la que no existe posibilidad de recuperación celular tras la degradación de gran parte del contenido de la célula se le ha denominado *punto de no retorno* (figura 2.14).

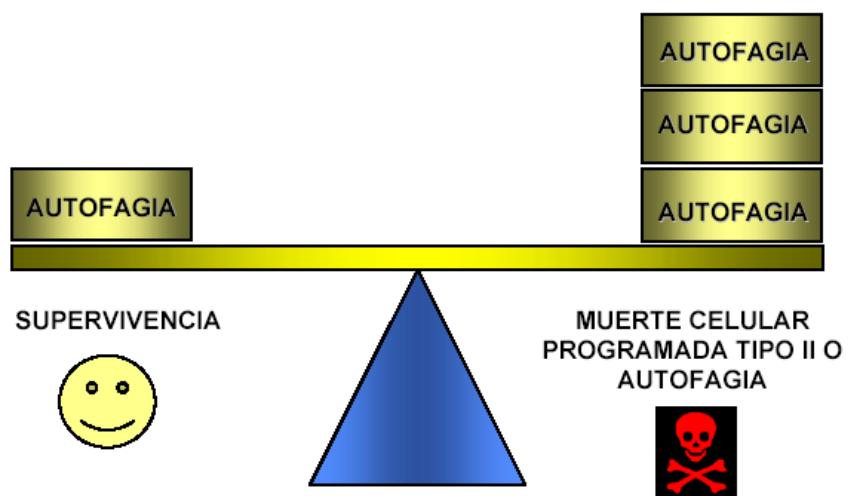


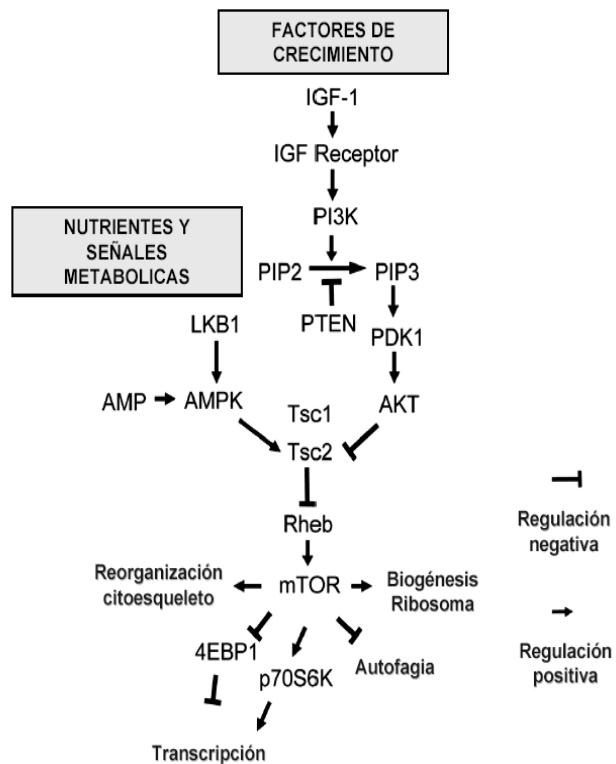
Figura 2.14.- Esquema que representa los niveles de la autofagia y su implicación en los procesos de supervivencia y muerte celular.

Números estudios muestran que la autofagia constituye un proceso de muerte celular tras depleción energética o tras la inducción de daños celulares (Saeki et al. 2000; Bursch 2001; Inbal et al. 2002; Kanzawa et al. 2003; Daido et al. 2004; Kanzawa et al. 2004; Lockshin and Zakeri 2004a; Ravikumar et al. 2004; Rusten et al. 2004; Shimizu et al. 2004; Yu et al. 2004; Bursch and Ellinger 2005; Canu et al. 2005; Pattingre et al. 2005). Debido a los pocos métodos descritos y a la escasa información acerca de las marcas moleculares para la determinación de la autofagia, se ha hecho difícil el estudio de la misma y esto ha retrasado considerablemente el conocimiento de su mecanismo. Sin embargo, el descubrimiento de las proteínas pro-autofágicas ATG en levaduras y sus proteínas homólogas en mamíferos, ha permitido el desarrollo de una abundante investigación que ha traído como consecuencia la publicación en estos últimos años de numerosos artículos que han relacionado la autofagia con muerte celular, con cáncer, con enfermedades infecciosas y con diversas patologías neurodegenerativas. La relación entre muerte celular por necrosis y activación de PARP-1 debería ser reconsiderada en ciertos casos, ya que las lagunas en el conocimiento de la muerte celular por autofagia han podido conducir a interpretaciones equívocas, que ponen de manifiesto la participación de PARP-1 en procesos de muerte celular independiente de caspasas. La relación descrita entre autofagia y apoptosis es compleja y necesita de más investigación para dilucidar y esclarecer la maquinaria que controla la ejecución de uno u otro proceso. La mitocondria puede ser el orgánulo central que integre ambos tipos de muerte. Además, se ha descrito la implicación de las proteínas de la familia Bcl-2 en el control de la ejecución de la muerte celular por autofagia. Según esta hipótesis, las proteínas de la familia Bcl-2 no solo regulan la apoptosis, sino que pueden constituir el interruptor molecular que activa o desactiva los procesos autófágicos en beneficio de los apoptóticos y viceversa (Saeki et al. 2000; Cardenas-Aguayo Mdel et al. 2003; Shimizu et al. 2004; Pattingre et al. 2005).

La proteína TOR (*Target Of Rapamicine*) es una proteína serina-treonina quinasa evolutivamente conservada perteneciente a la familia PIKK (quinasas relacionadas con fosfatidil inositol 3-quinasas) que posee un papel importante en la regulación del crecimiento y la proliferación celular (Hay and Sonenberg 2004). En los mamíferos, la proteína mTOR (*mammalian TOR*), esta regulada por la vía PI3K-PDK1-AKT y por reguladores negativos de esta vía como PTEN y TSC1 y TSC2 (*Tuberculosis sclerosis*) (figura 2.15). A través de la ruta PI3K, mTOR participa en la

detección y respuesta celular frente a factores de crecimiento, y niveles de nutrientes extracelulares (Harris and Lawrence 2003). Se ha demostrado que los niveles energéticos y de nutrientes intracelulares pueden también regular la actividad de mTOR a través de cambios conformacionales en los complejos oligoméricos formados por esta proteína (Kim and Sabatini 2004). También se ha descrito que la proteína AMPK (*AMP-activated kinase*) y el complejo TSC1/TSC2 pueden señalizar a mTOR los niveles de AMP (Inoki et al. 2003; Feng et al. 2005). Una vez activada, mTOR fosforila a sus proteínas diana entre las que se puede destacar a las proteínas p70s6k, a 4EBP1 y a proteínas de la familia ATG. En resumen, la activación de mTOR promueve el crecimiento y la proliferación celular, mientras que su inactivación frena estos mecanismos e inicia los procesos catabólicos entre los que se incluye la autofagia. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con doxorrubicina produce la activación de mTOR (medido de forma indirecta por western blot de la proteína p70s6k fosforilada), en las células deficientes en PARP-1 y en las células que expresan PARP-1 tratadas con el inhibidor de la actividad de PARP reprimiéndose en estos casos la respuesta autofágica.

A modo de resumen, nuestros resultados son demostrativos de que las células que expresan PARP-1 son más sensibles a la muerte celular inducida por doxorrubicina (5 µg/ml). Nuestra hipótesis indica que el factor determinante para el desarrollo de la muerte celular es la reducción energética observada tras el tratamiento con doxo dependiente de la presencia de PARP-1. En este sentido se ha descrito que los niveles de ATP y NAD<sup>+</sup> son importantes y determinantes en el modo de ejecución de la muerte celular (Nicotera et al. 1998; Ran et al. 1999; Crowley et al. 2000). El descenso



**Figura 2.15.- Esquema de la ruta de transmisión de señales que dirige a la activación de mTOR.** Figura adaptada de (Feng et al. 2005)

energético se detecta por la proteína mTOR, que tras su inactivación promueve la inducción de la autofagia como recurso de supervivencia para la obtención de nutrientes y energía necesarios para el mantenimiento de la supervivencia celular. La autofagia llega a ser de tal magnitud que alcanza el punto de no retorno y provoca la ejecución de la muerte celular programada tipo II o autofágica. Las células deficientes en PARP-1 o las que expresan esta proteína y son tratadas con el inhibidor ANI, resultan protegidas de los procesos autofágicos debido a que no se produce una sobre-activación de PARP-1 que compromete al consumo energético elevado.

Desde una óptica clínica, creemos que la estimulación de la autofagia puede constituir un mecanismo alternativo y novedoso para el tratamiento de tumores resistentes a la muerte celular por apoptosis al presentar defectos en su maquinaria básica apoptótica. Así mismo, el tratamiento con doxorrubicina puede constituir una herramienta útil al emergente estudio de la biología fundamental de la muerte celular autofágica en células de mamífero. Del conocimiento derivado de estos estudios pueden surgir datos interesantes que trasladados a la clínica de origen a nuevos tratamientos antitumorales.

Finalmente, la sobre-activación de PARP-1 ha sido descrita en diversas patologías con carácter inflamatorio, en las cuales la activación de esta proteína dirige a procesos de muerte celular secundarios que podrían ser debidos a procesos autofágicos que desencadenan el agravamiento de la enfermedad. En ellos, el tratamiento con inhibidores de PARP podría reducir los efectos secundarios patológicos derivados de los procesos inflamatorios mediante el freno de la muerte celular tipo II.

Los resultados que se describen en este capítulo se recogen en la siguiente publicación:

*“ROLE OF PARP-1 IN A NON-APOPTOTIC NON-NECROTIC  
AUTOPHAGIC-LIKE CELL DEATH INDUCED BY DOXORRUBICIN”*

**José Antonio Muñoz-Gámez** <sup>1,2</sup>, David Martín-Oliva <sup>1,2</sup>, Rocío Aguilar-Quesada <sup>2</sup>, Gilbert de Murcia <sup>3</sup>, Mariano Ruiz de Almodóvar <sup>1</sup>, F. Javier Oliver<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>IBIMER, Universidad de Granada; <sup>2</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada, Spain; <sup>3</sup>Departement Intégrité du Genome, UMR 7100, CNRS, Strasbourg, France.

Que actualmente se encuentra enviada para su revisión y posible publicación en la revista Cell Death and Differentiation.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Alano CC, Ying W, Swanson RA (2004) Poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated cell death in astrocytes requires NAD<sup>+</sup> depletion and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 279:18895-18902
- Ashkenazi A, Dixit VM (1999) Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11:255-260
- Assuncao Guimaraes C, Linden R (2004) Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 271:1638-1650
- Beugnet A, Tee AR, Taylor PM, Proud CG (2003) Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability. *Biochem J* 372:555-566
- Bouillet P, Cory S, Zhang LC, Strasser A, Adams JM (2001) Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev Cell* 1:645-653
- Boulares AH, Zoltoski AJ, Contreras FJ, Yakovlev AG, Yoshihara K, Smulson ME (2002) Regulation of DNAS1L3 endonuclease activity by poly(ADP-ribosyl)ation during etoposide-induced apoptosis. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage in endonuclease activation. *J Biol Chem* 277:372-378
- Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 25:1025-1040
- Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 11:3155-3162
- Burbach GJ, Dehn D, Del Turco D, Deller T (2003) Quantification of layer-specific gene expression in the hippocampus: effective use of laser microdissection in combination with quantitative RT-PCR. *J Neurosci Methods* 131:83-91
- Bursch W (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 8:569-581
- Bursch W, Ellinger A (2005) Autophagy--a basic mechanism and a potential role for neurodegeneration. *Folia Neuropathol* 43:297-310
- Canu N, Tufi R, Serafino AL, Amadoro G, Ciotti MT, Calissano P (2005) Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 92:1228-1242
- Cardenas-Aguayo Mdel C, Santa-Olalla J, Baizabal JM, Salgado LM, Covarrubias L (2003) Growth factor deprivation induces an alternative non-apoptotic death mechanism that is inhibited by Bcl2 in cells derived from neural precursor cells. *J Hematother Stem Cell Res* 12:735-748

- Crowley CL, Payne CM, Bernstein H, Bernstein C, Roe D (2000) The NAD<sup>+</sup> precursors, nicotinic acid and nicotinamide protect cells against apoptosis induced by a multiple stress inducer, deoxycholate. *Cell Death Differ* 7:314-326
- Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Threadgill M, Caputi AP, Thiemermann C (2002) Effects of 5-aminoisoquinolinone, a water-soluble, potent inhibitor of the activity of poly (ADP-ribose) polymerase, in a rodent model of lung injury. *Biochem Pharmacol* 63:293-304
- Chatterjee S, Berger SJ, Berger NA (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian of the genome that facilitates DNA repair by protecting against DNA recombination. *Mol Cell Biochem* 193:23-30
- Chen M, Zsengeller Z, Xiao CY, Szabo C (2004) Mitochondrial-to-nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in cardiac myocytes during oxidant stress: potential role of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cardiovasc Res* 63:682-688
- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG (1999) Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342 ( Pt 2):249-268
- D'Amours D, Germain M, Orth K, Dixit VM, Poirier GG (1998) Proteolysis of poly(ADP-ribose) polymerase by caspase 3: kinetics of cleavage of mono(ADP-ribosyl)ated and DNA-bound substrates. *Radiat Res* 150:3-10
- Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, Takeuchi H, Kondo Y, Kondo S (2004) Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res* 64:4286-4293
- Dawson VL, Dawson TM (2004) Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr* 36:287-294
- de Murcia G, Schreiber V, Molinete M, Saulier B, Poch O, Masson M, Niedergang C, Menissier de Murcia J (1994) Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem* 138:15-24
- de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P, de Murcia G (1997) Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7303-7307
- Di Paola R, Mazzon E, Xu W, Genovese T, Ferraris D, Muia C, Crisafulli C, Zhang J, Cuzzocrea S (2005) Treatment with PARP-1 inhibitors, GPI 15427 or GPI 16539, ameliorates intestinal damage in rat models of colitis and shock. *Eur J Pharmacol* 527:163-171
- Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J (2005) Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37:719-727

- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:8204-8209
- Germain M, Affar EB, D'Amours D, Dixit VM, Salvesen GS, Poirier GG (1999) Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem* 274:28379-28384
- Gluck S (2002) The expanding role of epirubicin in the treatment of breast cancer. *Cancer Control* 9:16-27
- Gonzalez-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquere S, Eskelinan EL, Pierron G, Saftig P, Kroemer G (2005) The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* 118:3091-3102
- Gozuacik D, Kimchi A (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23:2891-2906
- Graziani G, Battaini F, Zhang J (2005) PARP-1 inhibition to treat cancer, ischemia, inflammation. *Pharmacol Res* 52:1-4
- Gutierrez M, Chabner BA, Pearson D, Steinberg SM, Jaffe ES, Cheson BD, Fojo A, Wilson WH (2000) Role of a doxorubicin-containing regimen in relapsed and resistant lymphomas: an 8-year follow-up study of EPOCH. *J Clin Oncol* 18:3633-3642
- Ha HC, Snyder SH (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13978-13982
- Harris TE, Lawrence JC, Jr. (2003) TOR signaling. *Sci STKE* 2003:re15
- Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18:1926-1945
- Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL (2004) Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* 25:259-264
- Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A (2002) DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *J Cell Biol* 157:455-468
- Inoki K, Zhu T, Guan KL (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115:577-590
- Ito H, Aoki H, Kuhnel F, Kondo Y, Kubicka S, Wirth T, Iwado E, Iwamaru A, Fujiwara K, Hess KR, Lang FF, Sawaya R, Kondo S (2006) Autophagic cell death of malignant glioma cells induced by a conditionally replicating adenovirus. *J Natl Cancer Inst* 98:625-636
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J* 19:5720-5728
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150:1507-1513

- Kanazawa T, Taneike I, Akaishi R, Yoshizawa F, Furuya N, Fujimura S, Kadowaki M (2004) Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signaling pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 279:8452-8459
- Kang YH, Yi MJ, Kim MJ, Park MT, Bae S, Kang CM, Cho CK, Park IC, Park MJ, Rhee CH, Hong SI, Chung HY, Lee YS, Lee SJ (2004) Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria. *Cancer Res* 64:8960-8967
- Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S (2004) Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 11:448-457
- Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, Kondo S, Germano I (2003) Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide. *Cancer Res* 63:2103-2108
- Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y, Kondo S (2005) Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene* 24:980-991
- Kaplan J, O'Connor M, Hake PW, Zingarelli B (2005) Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase ameliorate myocardial reperfusion injury by modulation of activator protein-1 and neutrophil infiltration. *Shock* 23:233-238
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53:3976-3985
- Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T (2001) Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2:330-335
- Kim DH, Sabatini DM (2004) Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. *Curr Top Microbiol Immunol* 279:259-270
- Klionsky DJ, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290:1717-1721
- Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S (2005) The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 5:726-734
- Kurz EU, Douglas P, Lees-Miller SP (2004) Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 279:53272-53281
- Lafay-Chebassier C, Paccalin M, Page G, Barc-Pain S, Perault-Pochat MC, Gil R, Pradier L, Hugon J (2005) mTOR/p70S6k signalling alteration by Abeta exposure as well as in APP-PS1 transgenic models and in patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 94:215-225

- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371:346-347
- Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6:463-477
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402:672-676
- Lockshin RA, Zakeri Z (2002) Caspase-independent cell deaths. *Curr Opin Cell Biol* 14:727-733
- Lockshin RA, Zakeri Z (2004a) Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2405-2419
- Lockshin RA, Zakeri Z (2004b) Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23:2766-2773
- Los M, Mozoluk M, Ferrari D, Stepczynska A, Stroh C, Renz A, Herceg Z, Wang ZQ, Schulze-Osthoff K (2002) Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol Biol Cell* 13:978-988
- Marino G, Lopez-Otin C (2004) Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci* 61:1439-1454
- Meijer AJ, Codogno P (2004) Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2445-2462
- Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152:657-668
- Munoz-Gamez JA, Martin-Oliva D, Aguilar-Quesada R, Canuelo A, Nunez MI, Valenzuela MT, Ruiz de Almodovar JM, De Murcia G, Oliver FJ (2005) PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Biochem J* 386:119-125
- Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E (1998) Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 102-103:139-142
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122:927-939
- Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaart EF, Meijer AJ, Codogno P (2000) Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* 275:992-998

- Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH (1999) Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci* 20:171-181
- Qian J, Niu J, Li M, Chiao PJ, Tsao MS (2005) In vitro modeling of human pancreatic duct epithelial cell transformation defines gene expression changes induced by K-ras oncogenic activation in pancreatic carcinogenesis. *Cancer Res* 65:5045-5053
- Qin ZH, Wang Y, Kegel KB, Kazantsev A, Apostol BL, Thompson LM, Yoder J, Aronin N, DiFiglia M (2003) Autophagy regulates the processing of amino terminal huntingtin fragments. *Hum Mol Genet* 12:3231-3244
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelin EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 112:1809-1820
- Ran Z, Rayet B, Rommelaere J, Faisst S (1999) Parvovirus H-1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis. *Virus Res* 65:161-174
- Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36:585-595
- Rusten TE, Lindmo K, Juhasz G, Sass M, Seglen PO, Brech A, Stenmark H (2004) Programmed autophagy in the Drosophila fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway. *Dev Cell* 7:179-192
- Saeki K, Yuo A, Okuma E, Yazaki Y, Susin SA, Kroemer G, Takaku F (2000) Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Differ* 7:1263-1269
- Schreiber V, Hunting D, Trucco C, Gowans B, Grunwald D, De Murcia G, De Murcia JM (1995) A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4753-4757
- Shall S, de Murcia G (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 460:1-15
- Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X (2004) Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:18030-18035
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6:1221-1228

- Strosznajder RP, Jesko H, Zambrzycka A (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase: the nuclear target in signal transduction and its role in brain ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol* 31:149-167
- Szabo C, Dawson VL (1998) Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 19:287-298
- Tanida I, Ueno T, Kominami E (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36:2503-2518
- Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM (1995) Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitible protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* 81:801-809
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316
- Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, Alimonti J, Brown T, Israels S, Hakem R, Greenberg AH (2000) BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore. *Mol Cell Biol* 20:5454-5468
- Virág L (2005) Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. *Curr Vasc Pharmacol* 3:209-214
- Virág L, Szabo C (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54:375-429
- Wang H, Shimoji M, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL (2003) Apoptosis inducing factor and PARP-mediated injury in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:132-139
- Wang KK, Liu N, Radulovich N, Wigle DA, Johnston MR, Shepherd FA, Minden MD, Tsao MS (2002) Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma. *Oncogene* 21:7598-7604
- Weiss RB (1992) The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol* 19:670-686
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:130-131, 134-138
- Xiao CY, Chen M, Zsengeller Z, Li H, Kiss L, Kollai M, Szabo C (2005) Poly(ADP-Ribose) polymerase promotes cardiac remodeling, contractile failure, and translocation of apoptosis-inducing factor in a murine experimental model of aortic banding and heart failure. *J Pharmacol Exp Ther* 312:891-898
- Xue L, Fletcher GC, Tolokovsky AM (1999) Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci* 14:180-198

- Yang YP, Liang ZQ, Gu ZL, Qin ZH (2005) Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin* 26:1421-1434
- Yasuhara S, Zhu Y, Matsui T, Tipirneni N, Yasuhara Y, Kaneki M, Rosenzweig A, Martyn JA (2003) Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 51:873-885
- Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ (2004) Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 304:1500-1502
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297:259-263
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15077-15082
- Zhang Y, Zhang X, Park TS, Gidday JM (2005) Cerebral endothelial cell apoptosis after ischemia-reperfusion: role of PARP activation and AIF translocation. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:868-877
- Zhu CQ, Blackhall FH, Pintilie M, Iyengar P, Liu N, Ho J, Chomiak T, Lau D, Winton T, Shepherd FA, Tsao MS (2004) Skp2 gene copy number aberrations are common in non-small cell lung carcinoma, and its overexpression in tumors with ras mutation is a poor prognostic marker. *Clin Cancer Res* 10:1984-1991

## **CONCLUSIONES**



El análisis y discusión crítica del conjunto de observaciones y resultados experimentales contenidos en esta memoria nos ha permitido formular las siguientes conclusiones:

## **CAPÍTULO I:**

**PRIMERA:** El tratamiento con el inhibidor de la topoisomerasa II, doxorrubicina, produce la activación de PARP-1 en líneas celulares derivadas de cáncer de mama deficientes en p53.

**SEGUNDA:** La supresión de la actividad de PARP mediante la utilización de inhibidores químicos, aumenta el efecto citotóxico producido por dosis farmacológicas de doxorrubicina mediante la potenciación de la vía apoptótica mitocondrial en el modelo tumoral constituido por células de cáncer de mama deficientes en p53.

**TERCERA:** La inhibición de la actividad de PARP provoca deficiencias en los procesos de reparación de daños en el ADN producidos por el tratamiento con el agente antitumoral. La acumulación de roturas en el genoma que permanecen sin reparar es la causa más probable de la quimio-sensibilización ejercida por el inhibidor de PARP tras el tratamiento con doxorrubicina.

**CUARTA:** El factor de transcripción NF-κB no está implicado en la potenciación del efecto citotóxico producido por doxorrubicina tras el tratamiento de las células con el inhibidor de la actividad PARP.

## **CAPÍTULO II:**

**QUINTA:** La doxorrubicina induce la activación de PARP-1 en modelos celulares de fibroblastos murinos en respuesta al daño inflingido en el ADN.

**SEXTA:** La proteína PARP-1 dirige la ejecución de diferentes alternativas de muerte celular en función de la magnitud del daño inducido en el ADN. La

activación de PARP-1 frente a daños moderados promueve la reparación del daño y la supervivencia celular y su inhibición sensibiliza a la muerte celular por apoptosis debida a la acumulación de daños en el ADN sin reparar. Daños elevados en el genoma inducen la sobre-activación de PARP-1 y como consecuencia, la reducción de los niveles energéticos y la inducción de muerte celular dependiente de PARP-1 e independiente de la activación de las caspasas.

**SÉPTIMA:** La muerte celular mediada por la activación de PARP-1 en situaciones de daño moderadamente elevado en el ADN posee las características de la muerte celular programada tipo II o autofágica.

**CONCLUSIÓN FINAL:** El uso de inhibidores de PARP en la terapia antineoplásica potencia la apoptosis inducida por doxorrubicina en células tumorales deficientes en p53 y la sobre-activación de PARP conduce a la célula a la depleción energética y muerte celular por autofagia tras el tratamiento con doxorrubicina.

## **ABREVIATURAS**



**3-ABA:** 3-Aminobenzamida

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AIF:** Factor inductor de apoptosis (*Apoptosis Inducing Factor*)

**ANI:** 4-amino-1,8-naftalimida, Inhibidor de PARP

**AP-1:** *Activator protein 1*

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ácido mensajero

**ATP:** Adenosina 5'-trifosfato

**BER:** *Base Escisión Repair*

**BH:** Dominio de homología de las proteínas de la familia de Bcl-2 (*Bcl-2 Homology*)

**BRCT:** *BRCA1 C-terminus*

**BrdU:** Bromodesoxiuridina

**CARD :** Dominio reclutador de caspasas

**DAPK:** *Death-Associated Protein kinase*

**DPM:** Desintegraciones Por Minuto

**DBD:** *DNA binding domain*

**DEPC:** Dietilpirocarbonato

**DMBA:** 7,12-dimetilbenzo[a]-antraceno)

**DMEM:** *Dulbeco's modified Eagle's medium*

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DPQ:** 3,4-Dihidro-5-[4-(1-piperidinil)butoxi]-1(2H)-isoquinolinona

**cDNA:** ADN complementario

**DED:** Dominio Efector de Muerte

**DISC:** Complejo de señalización e inducción de muerte (*Death Inducing signaling complex*)

**DTT:** Ditiotreitol

**DOXO:** Doxorrubicina

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**ERK:** Quinasas activadas por señales extracelulares

**FBS:** Suero bovino fetal (*Foetal bovine serum*)

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**GFP:** Proteína de fusión Verde

**HEPES:** N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(1-ácido etanofulfónico)

**HMG:** *High Mobility Group proteins*

**HRP:** Peroxidasa del rábano

**HTH:** Motivos *helix Turn Helix*

**IAP:** *Inhibitor of Apoptosis*

**IC<sub>50</sub>:** *Inhibitory concentration 50%*

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IR:** Radiación Infrarroja

**JNK:** c-Jun N-terminal quinasa

**LC3:** *Microtubule-associated protein 1 light chain 3*

**LD<sub>50</sub>:** *Lethal doses 50%*

**LPS:** Lipopolisacárido

**LZ:** *Leucine Zipper* (cremallera de leucina)

**2-ME:** 2-Mercaptoetanol

**3-MA:** 3- metil adenina

**MAPK:** Quinasas activadas por mitógenos

**MEF:** Fibroblastos murinos inmortalizados

**MNU:** 1-metil-1-nitrosourea

**MNNG:** N-Metil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina

**MPTP:** 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

**NAD<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenina dinucleótido

**NF-κB:** *nuclear factor κB*

**NLS:** Señal de localización nuclear

**dNTP:** Desoxinucleótido trifosfato

**Oct-1:** Factor de transcripción octámero

**PAR:** Polímero de poli (ADP-ribosa)

**PARP:** Poli-ADP-ribosa polimerasa

**PARG:** Poli-ADP-ribosa glicohidrolasa

**PAS:** *Periodic Acid Schiff*

**pb:** Pares de bases

**PBS :** Solución tampón fosfato

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PI3K :** Fosfatidil Inositol-3 quinasa

**PTPM:** Poro de transición de permeabilidad mitocondrial

**PS:** Fosfatidil serina

**RE:** Retículo endoplasmático

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**RT-PCR:** PCR en tiempo real

**SDS:** Sodio dodecil sulfato

**SSBR:** *Single Strand Break Repair*

**SSC:** *Saline-Sodium Citrate*

**TE:** Solución Tris/EDTA

**TEF-1:** *Transcription Enhancer Factor-1*

**TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**TOR:** *Target Of Rapamicin*

**mTOR:** *mammalian Target Of Rapamicin*

**TRAIL:** *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

**UV/UVA:** Radiación ultravioleta

**XRCC1:** *X-ray cross complementing factor 1*

**YY-1:** Ying-Yang-1



## **PUBLICACIONES CIENTÍFICAS**



# PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis

José Antonio MUÑOZ-GÁMEZ\*, David MARTÍN-OLIVA\*, Rocío AGUILAR-QUESADA†, Ana CAÑUELO‡, M. Isabel NUÑEZ§, M. Teresa VALENZUELA\*, J. M. RUIZ DE ALMODÓVAR§, Gilbert DE MURCIA|| and F. Javier OLIVER†<sup>1</sup>

\*Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain, †Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Avda. del Conocimiento s/n, 18100-Armilla, Granada, Spain,

‡Departamento de Biología Experimental, Universidad de Jaén, Jaén, Spain, §Departamento de Radiología y Medicina Física, Universidad de Granada, Granada, Spain, and ||UPR 9003 du CNRS, École de Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Strasbourg, France

p53 deficiency confers resistance to doxo (doxorubicin), a clinically active and widely used antitumour anthracycline antibiotic. The purpose of the present study was to investigate the reversal mechanism of doxo resistance by the potent PARP [poly(ADP-ribose) polymerase] inhibitor ANI (4-amino-1,8-naphthalimide) in the p53-deficient breast cancer cell lines EVSA-T and MDA-MB-231. The effects of ANI, in comparison with doxo alone, on doxo-induced apoptosis, were investigated in matched pairs of EVSA-T or MDA-MB-231 with or without ANI co-treatment. Doxo elicited PARP activation as determined by Western blotting and immunofluorescence of poly(ADP-ribose), and ANI enhanced the cytotoxic activity of doxo 2.3 times and in a caspase-dependent manner. The long-term cytotoxic effect was studied by a colony-forming assay. Using this assay, ANI also significantly

potentiates the long-term cytotoxic effect with respect to treatment with doxo alone. Decrease in mitochondrial potential together with an increase in cytochrome *c* release, association of Bax with the mitochondria and caspase 3 activation were also observed in the presence of ANI. Therefore PARP inhibition may represent a novel way of selectively targeting p53-deficient breast cancer cells. The underlying mechanism is probably a potentiation of unrepaired DNA damage, shifting from DNA repair to apoptosis due to the effective inhibition of PARP activity.

**Key words:** apoptosis, Bax, breast cancer, chemotherapy, doxorubicin, mitochondria, p53, poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1).

## INTRODUCTION

Dysregulation of normal apoptotic mechanisms provides a growth advantage to cancer cells [1]. In breast cancer, dysregulated apoptotic pathways include down-regulated death receptor pathway function, p53 mutations and abnormal bcl-2 pathway function [2–4]. Furthermore, breast cancer treatments including chemotherapy, radiation therapy and hormone therapy induce apoptotic mechanisms to cause cancer cell death [5]. Therefore activation of specific apoptotic mechanisms in breast cancer cells could be an effective means to treat breast cancer.

PARP-1 [poly(ADP-ribose) polymerase-1] is the principal member of a family of enzymes possessing poly(ADP-ribosylation) catalytic capacity. It is a conserved nuclear protein that binds rapidly and directly to both single- and double-strand breaks. Both processes activate the catalytic capacity of the enzyme, which in turn modulates the activity of a wide range of nuclear proteins by covalent attachment of branching chains of ADP-ribose moieties. Organisms and cellular systems deficient in functional PARP-1 display severely impaired base excision repair and genomic instability, suggesting that the enzyme may play a primary role in the cellular response to DNA damage [6].

Increasing interest in potential clinical applications of PARP inhibition has led to the development of a wide range of new compounds, the more recently developed of which display greatly increased potency and specificity compared with the prototype PARP inhibitor 3-aminobenzamide [7]. In particular, higher potency PARP inhibitors have a greatly decreased effect on mono(ADP-ribosyl) transferase enzymes. ANI (4-amino-1,8-naphthalimide) is a potent PARP inhibitor ( $IC_{50} = 180$  nM) and

has been reported to increase the sensitivity to radiation in a number of human tumour cell lines, both *in vitro* and when grown as xenografts in mice [8]. Apoptosis is one of the most important pathways through which chemotherapeutic agents inhibit the growth of cancer cells. Thus it is crucial to investigate whether the induction of apoptosis is associated with the molecular mechanism by which inhibition of PARP may exert its biological effects on breast cancer cells.

The objectives of the present study were to investigate whether ANI could potentiate the cytotoxic effect of doxo (doxorubicin) in the p53-deficient human breast cancer cell lines, EVSA-T and MDA-MB-321, and elucidate the molecular mechanism by which ANI and doxo may induce apoptotic cell death in these cell lines. Our results show that doxo induces a rapid PARP activation and moderate cell killing, which is markedly potentiated by co-treatment with the PARP inhibitor ANI by accelerating the mitochondrial steps of apoptosis. In summary, our results suggest that PARP inhibition may represent a novel way of selectively targeting p53-deficient breast cancer cells.

## EXPERIMENTAL

### Cell culture

EVSA-T and MDA-MB-231 cells (breast cancer cell lines with p53 mutated [9,10]) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were plated for 24 h before doxo treatment.

Abbreviations used: ANI, 4-amino-1,8-naphthalimide; CFA, colony-forming assay; doxo, doxorubicin; NF-κB, nuclear factor κB; PAR, poly(ADP-ribose); PARP, PAR polymerase; PI, propidium iodide; Z-Val-Ala-DL-Asp-CH<sub>2</sub>F, benzylloxycarbonyl-valylalanyl-DL-aspartylfluoromethane.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email joliver@ipb.csic.es).

## Drugs

Cells were treated with doxo for 1 h in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal bovine serum at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The PARP inhibitor ANI (10 μM) was dissolved in culture medium immediately before use. ANI solutions (10 μM) also contained < 2% DMSO to improve solubility. ANI is sparingly soluble in water without adding DMSO. ANI was added 1 h before doxo treatment and thereafter present in the culture throughout the experiment. The pan-caspase inhibitor Z-Val-Ala-DL-Asp-CH<sub>2</sub>F (benzyloxycarbonyl-valylalanyl-DL-aspartylfluoromethane, also known as Z-VAD-FMK; 50 μM) was added 2 h before doxo treatment and was thereafter present in the culture throughout the experiment.

## Analysis of cell death

Cell viability was evaluated as described previously by the sulphonrhodamine B method [11]. Measurement of apoptosis was determined by annexin V staining. After drug treatments, cells were harvested using trypsin-EDTA, washed once with ice-cold PBS and resuspended in 1 ml of annexin V binding buffer (10 mM Hepes, pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>). Then, 75 000 cells were stained with 5 μl of annexin V FLUOS (Roche Molecular Biochemicals) in 100 μl of annexin V buffer at 4°C. After 30 min, 100 μl of binding buffer was added to each tube and samples were analysed using a tri-laser FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) using CellQuest software (Becton Dickinson).

Sub-G<sub>1</sub> analysis was examined by flow cytometry using the PI (propidium iodide) DNA-staining method. Cells were harvested with trypsin-EDTA, washed once with ice-cold PBS and resuspended in 100 μl of PBS. Ice-cold ethanol (70%, 900 μl) was added to the cells for 5 min, washed with 2 ml of PBS and the cells were resuspended in 250 μl of PI/RNase solution (PBS, 100 μg/ml RNase and 40 μg/ml PI). After 30 min, samples were analysed using a tri-laser FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) using CellQuest software (Becton Dickinson).

## CFA (colony-forming assay)

Semi-confluent culture flasks were trypsinized, and adequate number of cells were seeded in 25 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks. One day later, cells were exposed to doxo at the indicated concentrations for 1 h. Cells were treated with the PARP inhibitor ANI (10 μM) for 24 h. Cells were stained with crystal violet, 15 or 20 days later, and colonies of 50 or more cells were scored. Surviving fractions were determined from colony counts and were corrected for the plating efficiency of the non-treated controls.

## Immunofluorescence

Immunostaining for PAR [poly(ADP-ribose)] was performed on the cells, which were grown on glass coverslips and fixed in ice-cold methanol/acetone (1:1, v/v) for 10 min. PAR was detected by immunofluorescence using the monoclonal antibody 10H (Alexis, Grünberg, Germany) and FITC-conjugated goat anti-mouse immunoglobulins (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.). Nuclear counterstaining with PI was performed after removal of excess secondary antibody. Immunostaining was visualized with a Leica Spectral confocal laser microscope.

## Western-blot analysis

Cells were detached from the culture flask, washed with PBS and resuspended in 100 μl of lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 0.1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100 and 12.5 mM 2-mercaptop-

ethanol) for 30 min on ice. The pellet was eliminated and a sample buffer [50 mM Tris/HCl, pH 6.8, 6 M urea, 6% 2-mercaptoethanol, 3% (w/v) SDS and 0.003% Bromophenol Blue] was added to the supernatant. Proteins were resolved by SDS/PAGE (12% gel) and transferred on to Immun-Blot PVDF membranes (Bio-Rad). The blot was blocked with 5% (w/v) milk powder in PBS containing 0.1% Tween 20 for 30 min, washed with PBS/Tween, incubated overnight with the antibodies PAR (Biomol, Hamburg, Germany), anti-PARP-1 (EGF-69), anti-Bax and anti-cytochrome c (Pharmingen, San Diego, CA, U.S.A.) and anti-α-tubulin (Sigma) and incubated for 2 h with appropriate secondary antibodies. Bands were visualized by ECL-PLUS (Amersham Biosciences) and pictures were taken with the imaging system ChemiDoc XRS System (Bio-Rad).

For the measurements of cytochrome *c* and Bax, cells were washed with PBS and lysed for 5 min in 30 μl of ice-cold lysis buffer (80 mM KCl, 250 mM sucrose, 500 μg/ml digitonin, 1 μg/ml each of the protease inhibitors leupeptin, aprotinin, pepstatin and 0.1 mM PMSF in PBS). Then, cell lysates were centrifuged for 5 min at 10 000 g. Proteins from the supernatant (cytosolic fraction) and pellet (membrane fraction) were mixed with sample buffer and resolved by SDS/PAGE (12% gel). Cytochrome *c* and Bax were determined by Western-blot analysis as described above.

## Detection of mitochondrial membrane potential

Cells were plated in 6-well plates (2 × 10<sup>5</sup> cells) and grown for 24 h. After this period, the cells were treated with doxo (1 μg/ml) and doxo (1 μg/ml) + ANI (10 μM). Cells were harvested using trypsin-EDTA, washed once with ice-cold PBS and resuspended in PBS with 40 nM DIOC<sub>6</sub> (3,3'-dihexyloxacarboxyanine iodide; Molecular Probes, Eugene, OR, U.S.A.) for 30 min at 37°C. Samples were then analysed with an FACScan cytometer (Becton Dickinson) and the fluorescence was detected in FL1. During analysis of the flow-cytometric data, a marker indicating a cell population having lower Δψ<sub>m</sub> was applied to histograms, and the percentage of cells in the region was determined. The number of cells with lower membrane potential (cells treated with doxo, with or without ANI) were expressed as a percentage of the cells without treatment (control cells).

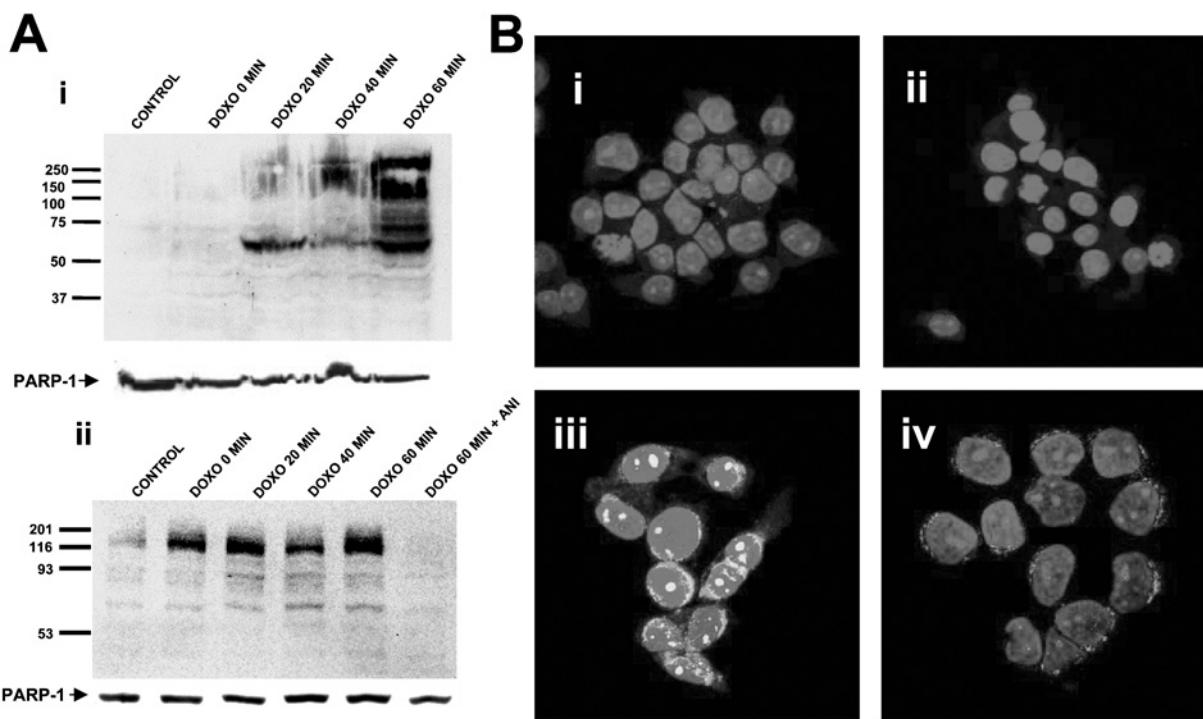
## Electrophoretic mobility-shift assay

The double-stranded oligonucleotides 5'-TGCTAGGGGATT-TTCCCTCTTGT-3' [12] with the sequences of the binding sites for NF-κB (nuclear factor κB) of the inducible nitric oxide synthase promoter were purchased. These oligonucleotides were end-labelled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP and T4 DNA polynucleotide kinase and used as probe. Nuclear extracts were obtained according to a previous report [13]. Nuclear extracts (3 μg of protein) were incubated with 2 μl of <sup>32</sup>P-labelled probe (6 × 10<sup>4</sup> d.p.m.) in a final volume of 20 μl of reaction mixture for 15 min at 4°C as described previously [14]. The DNA-protein complexes were separated on native 5% polyacrylamide gels in 0.5 Tris/borate/EDTA buffer.

## RESULTS

### Doxo treatment induces PARP activation

Many different cell insults infringing DNA damage have been shown to be capable of activating PARP. Doxo is a powerful DNA-damaging agent but there is no evidence in the literature of a direct effect on PARP activation in tumour cells. We hypothesized that the activation of PARP may counteract the doxo-induced cytotoxicity by promoting DNA repair. First, we demonstrate that



**Figure 1** PARP activation after doxo treatment

(A) Time course of PAR formation in (i) EVSA-T and (ii) MDA-MB-231 cell lines. After treatment with 1 µg/ml doxo (1 h), cells were harvested and analysed by immunoblotting for PAR formation. PARP-1 was used as the loading control. (B) Immunofluorescence staining of EVSA-T cells for PAR formation. Nuclei are counterstained with PI: (i) control, (ii) 10 µM ANI, (iii) treated with doxo (1 µg/ml, 1 h), (iv) EVSA-T treated with doxo (1 µg/ml) + ANI (10 µM). Overlaid images show that doxo induces PAR formation in nuclei (white), and it is reduced with ANI treatment. Cells grown on coverslips were fixed for 40 min after treatment with doxo.

doxo induced PARP activation. In Figure 1, we show that doxo (1 µg/ml) is capable of inducing a rapid PARP activation (20 min after treatment) measured by Western blotting [Figure 1A(i) (EVSA-T) and 1A(ii) (MDA-MB-231)] or immunofluorescence [Figure 1B(iii), EVSA-T cells]. Pretreatment with 10 µM ANI completely prevented doxo-induced PARP activation [Figure 1B(iv)]. The action of ANI as a PARP inhibitor has been extensively described elsewhere [15].

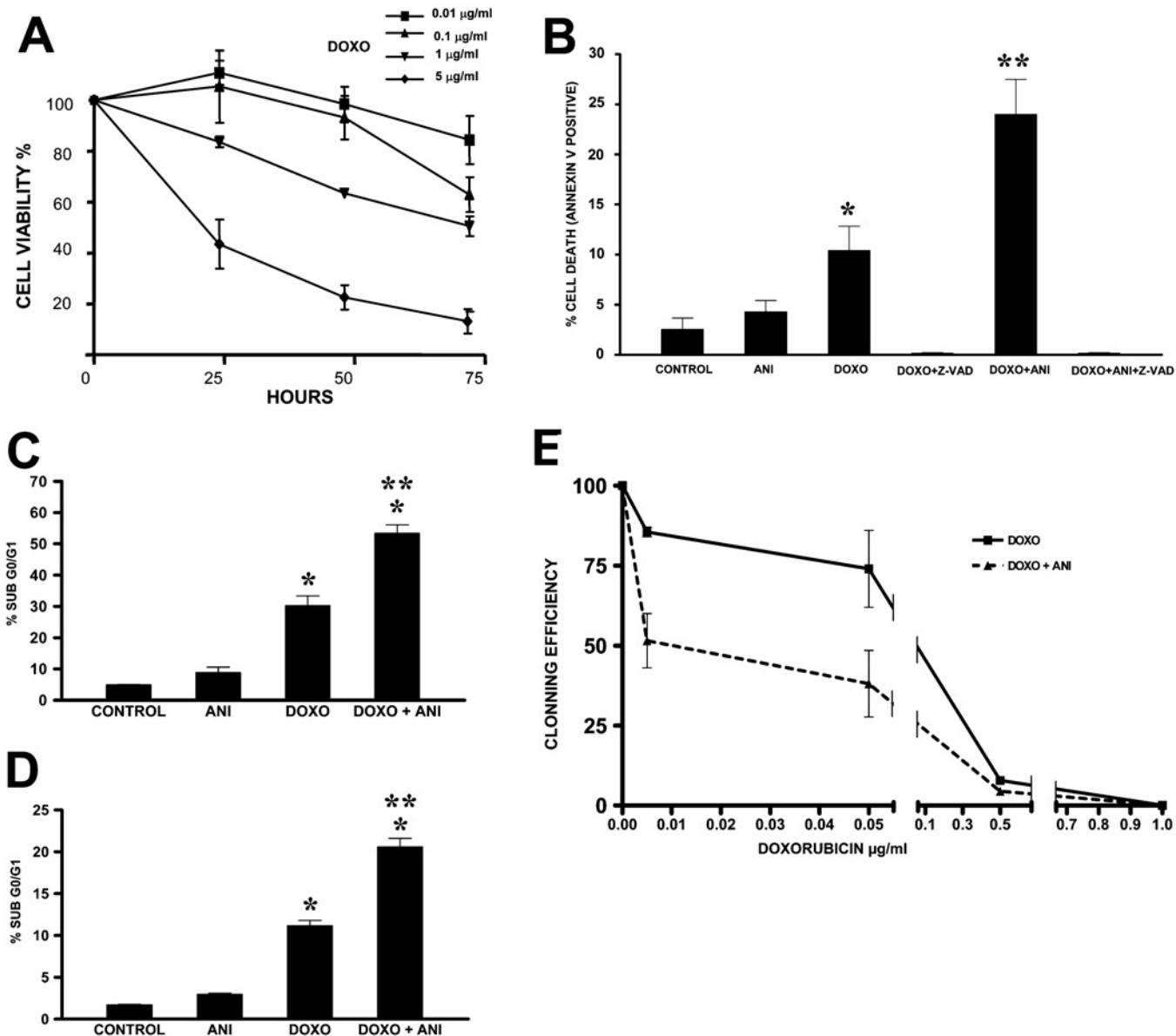
#### Co-treatment of p53-deficient breast cancer cells with doxo + ANI potentiates apoptotic cell death

EVSA-T breast cancer cells are resistant to treatment with a number of chemotherapeutic agents, including doxo [9]. In a preliminary assay, we performed a dose-response of doxo-induced cell death to determine at which dose these cells start to be sensitive to the drug. In short-term experiments of cell viability (until 72 h), they were completely resistant to doses below 1 µg/ml and partially sensitive to a dose of 1 µg/ml, reaching a 50% cell death after doxo treatment (Figure 2A). These results show that EVSA-T cells were very poorly sensitive to doxo-induced cytotoxic effect, as has been shown previously [11]. Then, we used annexin V and sub-G<sub>1</sub> to evaluate cell death as a measure of short-term cytotoxic effects and CFA as a measure of long-term cytotoxic effects, and we also studied the effect of ANI co-treatment in a second p53-deficient breast cancer cell line, MDA-MB-231, to substantiate further our observation. Pretreatment with 10 µM ANI resulted in a potentiation of doxo-induced cell death measured by all three criteria [Figures 2B (annexin V in EVSA-T), 2C (sub-G<sub>1</sub> in EVSA-T), 2D (sub-G<sub>1</sub> in MDA-MB-231) and 2E (CFA in EVSA-T)]. The extent of potentiation of cell death was 2.3-fold with annexin V (Figure 2B) and 1.7-fold

(Figure 2C) or 2-fold (Figure 2D) with sub-G<sub>1</sub>. Long-term cytotoxicity using ANI and doxo was also potentiated subsequent to treatment with doxo alone according to the CFA (Figure 2E). The effect of ANI was completely abolished with the pan-caspase inhibitor Z-Val-Ala-DL-Asp-CH<sub>2</sub>F (Figure 2B), suggesting that ANI was activating the apoptotic pathway at some point.

In most cases, p53-induced apoptosis proceeds through translocation of the cytoplasmic protein Bax to the mitochondria, where it co-operates with truncated Bid in the release of cytochrome *c*, leading to caspase activation. This pathway is impaired in p53 mutant cells like EVSA-T. To analyse more precisely which steps of apoptosis were altered by ANI, we studied depolarization of mitochondrial membrane potential, mitochondrial Bax translocation, cytochrome *c* release and activation of caspase 3 by PARP-1 cleavage (which have been described as the hallmark of doxo-induced apoptosis) in EVSA-T cells. In Figures 3(A)–3(C), the change in mitochondrial permeability was poorly shifted by doxo alone, and the pretreatment with ANI further increased the decrease in permeability. This change was also accompanied by an increase in Bax migration, cytochrome *c* release (Figure 3D) and caspase 3 activation, as measured by PARP-1 cleavage (Figure 3E), suggesting that PARP inhibition is capable of restoring a p53-like response in these cells.

Another mechanism by which tumour cells may be resistant to chemotherapy is by activation of the transcription factor NF-κB, which is responsible for the activation of anti-apoptotic genes [16] and has been involved in the progression to hormone independence in breast cancer [17]. Several laboratories, including ours, have shown that elimination of PARP-1 impairs the response of NF-κB [13,14]. We assessed the impact of ANI on doxo-induced NF-κB activation using an electrophoretic mobility-shift assay and found that ANI does not affect the ability of



**Figure 2** Effects of PARP inhibition on cell death after doxo treatment

(A) Cell viability in the EVSA-T cell line was assessed by the sulphorhodamine B assay in the presence of increasing concentrations of doxo until 72 h; results are the average of three separate experiments. (B) Induction of apoptosis, 24 h after treatment with 1  $\mu\text{g/ml}$  doxo in the EVSA-T cell line, measured by phosphatidylserine externalization (annexin-V) using flow-cytometry analysis. The PARP inhibitor ANI (10  $\mu\text{M}$ ) significantly increased (2.25 times) the cell death induced by doxo. Analysis of doxo-induced cell death with or without the PARP inhibitor (ANI, 10  $\mu\text{M}$ ) and the pan-caspase inhibitor Z-Val-Ala-DL-Asp-CH<sub>2</sub>F (Z-VAD; 50  $\mu\text{M}$ ) showed that the cell death induced by doxo was caspase-dependent. Cytotoxicity of the PARP inhibitor (ANI, 10  $\mu\text{M}$ ) was measured and it showed a low toxicity (4%) 24 h after treatment. Error bars represent the S.E.M. for at least four independent experiments. \* $P < 0.05$  compared with control cells, cells treated with ANI and cells treated with doxo + ANI. \*\* $P < 0.001$  compared with control and ANI-treated cells. (C, D) Cell death 48 h after treatment with 1  $\mu\text{g/ml}$  doxo in EVSA-T (C) and MDA-MB-231 (D) cell lines, measured by PI staining and flow-cytometry analysis. The cytotoxic effect of doxo was increased by PARP inhibition 1.7 times in EVSA-T and two times in MDA-MB-231 cells. Cytotoxicity of the PARP inhibitor (ANI, 10  $\mu\text{M}$ ) was measured and it showed a low toxicity (6% in EVSA-T and 2.9% in MDA-MB-231) 48 h after treatment. Error bars represent the S.E.M. for at least four independent experiments. \* $P < 0.001$  compared with control and ANI-treated cells. \*\* $P < 0.001$  compared with cells treated with doxo. (E) CFA after incubation with different concentrations of doxo and with or without PARP inhibitor (ANI, 10  $\mu\text{M}$ ). ANI co-treatment significantly potentiated the cytotoxicity of doxo. CFA with ANI alone gave essentially the same result as the untreated control. Survival was determined from triplicate measurements from three independent experiments and normalized for the plating efficiency or untreated controls. Error bars represent S.E.M.

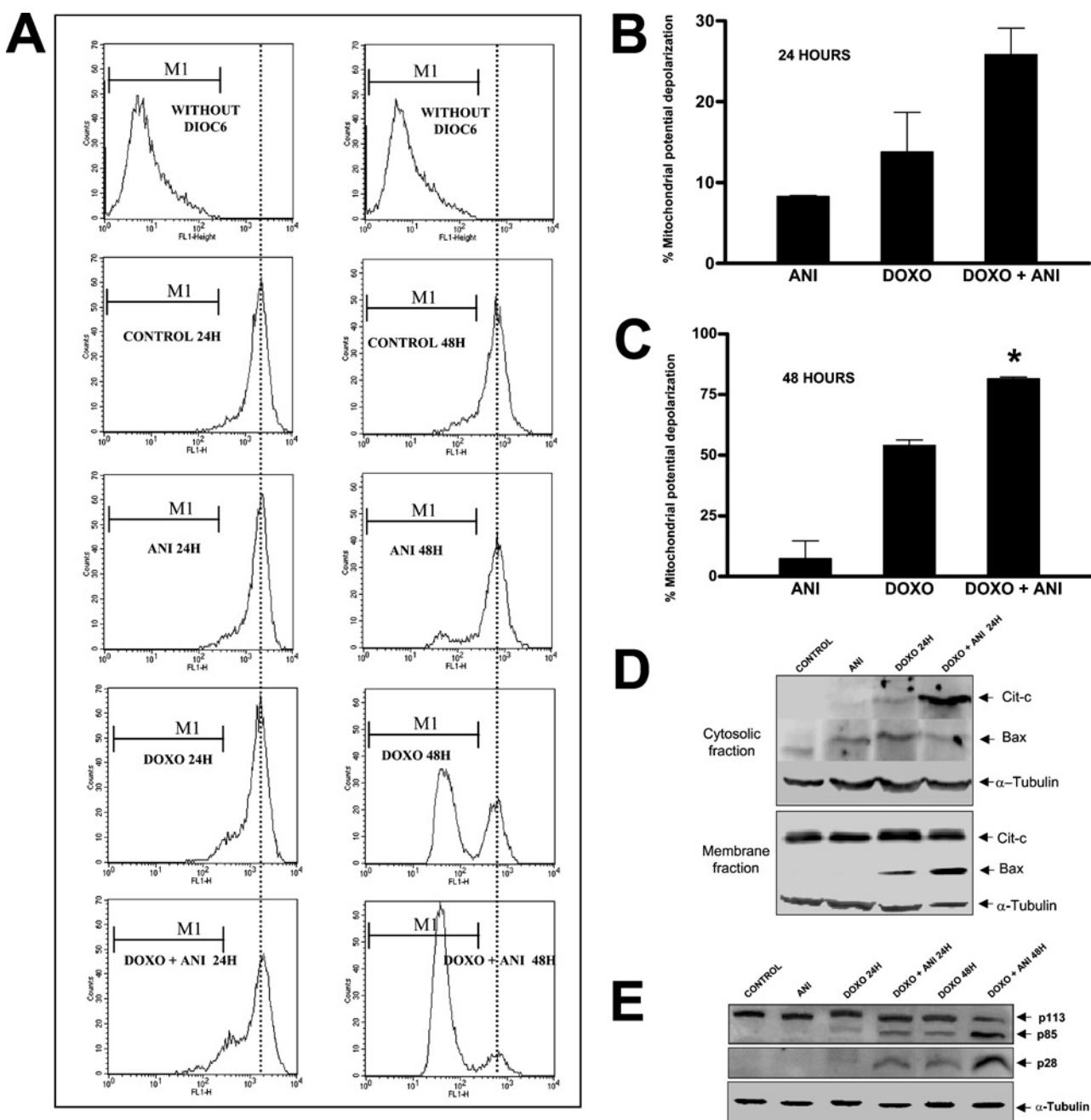
doxo to induce NF- $\kappa$ B activation, suggesting that ANI-induced potentiation of cell death is independent of NF- $\kappa$ B (Figure 4).

## DISCUSSION

A panel of biological markers including regulators such as p53, Bcl-2 family proteins, caspases and DNA fragmentation factor has

been described as having a role in apoptosis. Their assessment in cell lines and in clinical samples, particularly in the neo-adjuvant setting, would help to build a picture of their contribution to the biology of chemoresistance.

EVSA-T and MDA-MB-231 breast-cancer-derived cell lines are deficient in p53 and relatively insensitive to many chemotherapeutic agents [18]. As demonstrated by LD<sub>50</sub> (median lethal dose) determination and biochemical data, co-treatment with



**Figure 3** Effects of PARP inhibition on mitochondrial membrane potential and PARP-1 cleavage after doxo treatment

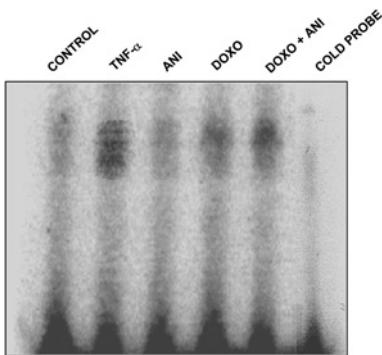
(A) Mitochondrial membrane potential in EVSA-T cell line, 24 and 48 h after treatment with 1  $\mu$ g/ml doxo, detected by DIOC<sub>6</sub> staining and flow-cytometry analysis. Marker indicates the region of cell population used for analysis. (B, C) Analysis of mitochondrial membrane depolarization in EVSA-T for 24 h (B) and 48 h (C). Mitochondrial membrane depolarization triggered by doxo was increased after PARP inhibition (ANI, 10  $\mu$ M) for both times. Error bars represent S.E.M. for at least three independent experiments. \*P < 0.001 compare with cells treated only with ANI and cells treated only with doxo. (D) Cytochrome *c* release from mitochondria to cytosolic fractions and translocation of cytosolic Bax to mitochondrial fractions after treatment with 1  $\mu$ g/ml doxo or doxo + ANI in EVSA-T cells. (E) Caspase-mediated PARP-1 cleavage in EVSA-T was determined by Western blotting. The 85 and 28 kDa fragment of PARP cleavage is shown 24 and 48 h after 1  $\mu$ g/ml doxo treatment. PARP-1 cleavage triggered by doxo was increased after PARP inhibition for both times.

PARP inhibitors sensitized EVSA-T and MDA-MB-231 cells to doxo-induced apoptosis. Significant increases in the proteolysis of cell death substrates and DNA fragmentation (sub-G<sub>1</sub>) further verified a caspase 3-mediated sensitization in doxo-induced apoptosis.

Doxo is an active chemotherapeutic agent used in clinical oncology. Doxo is a key adjuvant drug for breast cancer treatment. It triggers apoptosis through several mechanisms. As with many

therapeutic agents, it induces DNA damage by interacting with topoisomerase II, leading to DNA breakage [19]. So far, there are no reports describing PARP activation by topoisomerase II inhibitors. In the present study, we have found a rapid activation of PAR synthesis after doxo treatment, suggesting a direct effect of doxo on PARP activity (Figure 1).

The ability of PARP inhibitors to potentiate drug-induced cell death in tumour cells has been shown in multiple studies due to



**Figure 4** The doxo-induced activation of NF- $\kappa$ B is not counteracted by ANI

Band-shift analysis of NF- $\kappa$ B activation using the  $\kappa$ B inducible nitric oxide synthase promoter sequence under different conditions in EVSA-T cell lines: untreated control, internal control for NF- $\kappa$ B activation using TNF- $\alpha$  (20 ng/ml, 2 h), cells incubated with ANI (10  $\mu$ M), cells treated with doxo (1  $\mu$ g/ml) and cells treated with doxo (1  $\mu$ g/ml) + ANI (10  $\mu$ M), 24 h after treatment. Competition with an unlabelled probe was used to confirm that the shifted complex was NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B activation is similar in cells treated with doxo and cells treated with doxo + ANI. The results shown are representative of three independent experiments.

their potential application as chemo- and radiopotentiators [7,20]. Although there are examples showing direct toxic effects of PARP inhibitors in tumour cells [21], most of the studies focus on the potentiating effects of PARP inhibitors on alkylating agents or ionizing radiation-induced tumour cell death.

Exposure of cells to ionizing radiation leads to hydroxyl radical-mediated DNA injury, whereas alkylating agents directly damage DNA. Other types of cytotoxic drugs such as topoisomerase I and II inhibitors may also lead to DNA breakage. A previous study has shown that the DNA strand breaks induced by the topoisomerase I inhibitor, camptothecin, were increased by the PARP inhibitor NU1025 and on exposure to camptothecin-activated PARP. In contrast, NU1025 did not increase the DNA strand breakage or cytotoxicity caused by the topoisomerase II inhibitor etoposide [22]. However, in our model, we have found that PARP is involved in the cellular response to doxo-mediated DNA damage. This is probably the first report showing that PARP inhibition increases the cytotoxic effects by topoisomerase II inhibitor.

Owing to this, deficient repair of DNA breaks after the inhibition of PARP leads to accumulation of DNA damage and shift from a repair response to an apoptotic one. This apoptotic response is, moreover, p53-independent, since EVSA-T and MDA-MB-231 contain a mutant-inactive p53. The mechanism by which ANI facilitates doxo-induced apoptosis is related not to a decreased NF- $\kappa$ B response (Figure 4) but rather to an acceleration of apoptosis due to an increased loss of the mitochondrial potential, leading to activation of the final caspase 3, as revealed by the increase in PARP-1 cleavage and oligonucleosomal DNA fragmentation (sub-G<sub>1</sub>, Figures 2C and 2D). Moreover, the CFA assay shows a striking potentiation of doxo-induced cell death after co-treatment with ANI, suggesting that the long-term effect of doxo is amplified with the use of PARP inhibitors, minimizing clonal expansion of resistant tumour cells. A recent work has also reported that the use of PARP inhibitors together with doxo reduces doxo-induced cardiac dysfunction by avoiding necrotic cell death [23].

On the basis of these results, PARP inhibitors may be potentially useful, in combination with topoisomerase II inhibitors, in anti-cancer chemotherapy in p53-deficient tumours, which is the direct cause of resistance against chemotherapy.

We acknowledge Dr A. Lopez-Rivas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, Spain) for a helpful discussion. This work was supported by grants FIS 00/0948, FIS G03/152 and SAF:2003-01217 to F.J.O., SAF:2001-3533 to J. M. R. A. and FIS CP03/00142 to M. T. V., J. A. M. G. and D. M. O. are recipients of fellowships from FIS, and R. A. Q. from Ministerio de Educación y Ciencia.

## REFERENCES

- Johnstone, R. W., Rueffli, A. A. and Lowe, S. W. (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* (Cambridge, Mass.) **108**, 153–164
- Shin, M. S., Kim, H. S., Lee, S. H., Park, W. S., Kim, S. Y., Park, J. Y., Lee, J. H., Lee, S. K., Lee, S. N., Jung, S. S. et al. (2001) Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res.* **61**, 4942–4946
- Geisler, S., Lonning, P. E., Aas, T., Johnsen, H., Fluge, O., Haugen, D. F., Lillehaug, J. R., Akslen, L. A. and Borresen-Dale, A. L. (2001) Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer: prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Cancer Res.* **61**, 2505–2512
- Krajewski, S., Krajewska, M., Turner, B. C., Pratt, C., Howard, B., Zapata, J. M., Frenkel, V., Robertson, S., Ionov, Y., Yamamoto, H. et al. (1999) Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **6**, 29–40
- Makin, G. and Dive, C. (2001) Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends Cell Biol.* **11**, S22–S26
- Shall, S. and de Murcia, G. (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat. Res.* **460**, 1–15
- Miknyoczki, S. J., Jones-Bolin, S., Pritchard, S., Hunter, K., Zhao, H., Wan, W., Ator, M., Bihovsky, R., Hudkins, R., Chatterjee, S., Klein-Szanto, A. et al. (2003) Chemopotentiation of temozolamide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* **2**, 371–382
- Schlicker, A., Peschke, P., Burkle, A., Hahn, E. W. and Kim, J. H. (1999) 4-Amino-1,8-naphthalimide: a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase and radiation sensitizer. *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 91–100
- Ruiz-Ruiz, M. C. and Lopez-Rivas, A. (1999) p53-mediated up-regulation of CD95 is not involved in genotoxic drug-induced apoptosis of human breast tumor cells. *Cell Death Differ.* **6**, 271–280
- Ostrakhovitch, E. A. and Cherian, M. G. (2004) Differential regulation of signal transduction pathways in wild type and mutated p53 breast cancer epithelial cells by copper and zinc. *Arch. Biochem. Biophys.* **423**, 351–361
- Valenzuela, M. T., Nunez, M. I., Villalobos, M., Siles, E., Olea, N., Pedraza, V., McMillan, T. J. and Ruiz de Almodovar, J. M. (1995) Relationship between doxorubicin cell sensitivity, drug-induced DNA double-strand breaks, glutathione content and P-glycoprotein in mammalian tumor cells. *Anti-Cancer Drugs* **6**, 749–757
- Xie, Q. W., Kashiwabara, Y. and Nathan, C. (1994) Role of transcription factor NF- $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **269**, 4705–4708
- Martin-Oliva, D., O'Valle, F., Munoz-Gomez, J. A., Valenzuela, M. T., Nunez, M. I., Aguiar, M., Almodovar, J. R., Moral, R. G. and Oliver, F. J. (2004) Crosstalk between PARP-1 and NF- $\kappa$ B modulates the promotion of skin neoplasia. *Oncogene* **23**, 5275–5283
- Oliver, F. J., Menissier-de Murcia, J., Nacci, C., Decker, P., Andriantsitohaina, R., Muller, S., de la Rubia, G., Stoclet, J. C. and de Murcia, G. (1999) Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF- $\kappa$ B activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J.* **18**, 4446–4454
- Banasik, M., Komura, H., Shimoyama, M. and Ueda, K. (1992) Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J. Biol. Chem.* **267**, 1569–1575
- Lin, A. and Karin, M. (2003) NF- $\kappa$ B in cancer: a marked target. *Semin. Cancer Biol.* **13**, 107–114
- Pratt, M. A., Bishop, T. E., White, D., Yasivinski, G., Menard, M., Niu, M. Y. and Clarke, R. (2003) Estrogen withdrawal-induced NF- $\kappa$ B activity and bcl-3 expression in breast cancer cells: roles in growth and hormone independence. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 6887–6900
- de Almodovar, C. R., Ruiz-Ruiz, C., Rodriguez, A., Ortiz-Ferron, G., Redondo, J. M. and Lopez-Rivas, A. (2004) Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) decoy receptor TRAIL-R3 is up-regulated by p53 in breast tumor cells through a mechanism involving an intronic p53-binding site. *J. Biol. Chem.* **279**, 4093–4101
- Gudkov, A. V., Zelnick, C. R., Kazarov, A. R., Thimmappaya, R., Suttle, D. P., Beck, W. T. and Roninson, I. B. (1993) Isolation of genetic suppressor elements, inducing resistance to topoisomerase II-interactive cytotoxic drugs, from human topoisomerase II cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 3231–3235

- 20 Virág, L. and Szabo, C. (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol. Rev.* **54**, 375–429
- 21 Mendeleyev, J., Kirsten, E., Hakam, A., Buki, K. G. and Kun, E. (1995) Potential chemotherapeutic activity of 4-iodo-3-nitrobenzamide. Metabolic reduction to the 3-nitroso derivative and induction of cell death in tumor cells in culture. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 705–714
- 22 Bowman, K. J., Newell, D. R., Calvert, A. H. and Curtin, N. J. (2001) Differential effects of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor NU1025 on topoisomerase I and II inhibitor cytotoxicity in L1210 cells *in vitro*. *Br. J. Cancer* **84**, 106–112
- 23 Pacher, P., Liaudet, L., Bai, P., Virág, L., Mabley, J. G., Hasko, G. and Szabo, C. (2002) Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 862–867

Received 11 May 2004/7 September 2004; accepted 29 September 2004

Published as BJ Immediate Publication 29 September 2004, DOI 10.1042/BJ20040776

## **ROLE OF PARP-1 IN A NON-APOPTOTIC NON-NECROTIC AUTOPHAGIC-LIKE CELL DEATH INDUCED BY DOXORRUBICIN**

**José Antonio Muñoz-Gámez<sup>1,2</sup>, David Martín-Oliva<sup>1,2</sup>, Rocío Aguilar-Quesada<sup>2</sup>, Gilbert de Murcia<sup>3</sup>, Mariano Ruiz de Almodóvar<sup>1</sup>, F. Javier Oliver<sup>2</sup>**

**<sup>1</sup>IBIMER, Universidad de Granada; <sup>2</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada, Spain; <sup>3</sup>Departement Intégrité du Genome, UMR 7100, CNRS, Strasbourg, France**

Running Title: *Role of PARP-1 in doxorubicin-induced autophagy*

Address correspondence to: F. Javier Oliver, Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC,  
Avda del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain  
Tel.: 34958 181655, Fax: 34958 181632, E-mail: [joliver@ipb.csic.es](mailto:joliver@ipb.csic.es)

Doxorubicin (doxo) is an anthracyclin with antineoplastic properties and wide clinical use. In the present study we show that moderately high concentrations of doxo induce cell death independent of caspase activation but dependent in part on the presence of PARP-1. PARP-1 deficient cells are protected against doxo induced loss of ATP and NAD<sup>+</sup>. These changes took place in the absence of Bax translocation, changes in mitochondrial permeability, AIF nuclear translocation, and with preservation of chromatin integrity. Electron microscopy examination and LC3-GFP transfection revealed autophagic vesicles and increased expression of genes involved in autophagy (*bnip-3, cathepsin b and l and beclin-1*) in wild type cells treated with doxo but not in *parp-1* <sup>-/-</sup> cells or cells treated with a PARP inhibitor. In summary these data indicate that moderately high doses of doxo induce autophagic-like cell death and suggest that PARP-1 is mechanistically associated with this type of cell demise.

Enviado para su revisión y posible publicación en la revista “Cell Death & Differentiation”.

## Crosstalk between PARP-1 and NF-κB modulates the promotion of skin neoplasia

David Martín-Oliva<sup>1</sup>, Francisco O'Valle<sup>2</sup>, Jose A Muñoz-Gámez<sup>1</sup>, M Teresa Valenzuela<sup>1</sup>, M Isabel Nuñez<sup>3</sup>, Mariano Aguilar<sup>2</sup>, JM Ruiz de Almodóvar<sup>3</sup>, Raimundo García del Moral<sup>2</sup> and F Javier Oliver<sup>\*4</sup>

<sup>1</sup>University Hospital, San Cecilio, Granada; <sup>2</sup>Department of Pathology, University of Granada; <sup>3</sup>Department of Radiology and Physical Medicine, University of Granada; <sup>4</sup>Institute of Parasitology and Biomedicine, CSIC, Granada, Spain

**Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1)-deficient mice are protected against septic shock, type I diabetes, stroke and inflammation. It is now accepted that inflammation and related events, such as activation of NF-κB, are key components in the initiation and progression of epithelial cancer and in particular in the neoplastic transformation of keratinocytes and skin carcinogenesis. Here, we report that PARP-1-deficient mice display a strikingly reduced susceptibility to skin carcinogenesis. In *parp-1*<sup>-/-</sup> mice, development of papilloma-like premalignant lesions induced with DMBA and TPA, is strongly delayed and the final number of tumor-bearing mice and total tumor number were significantly reduced. In addition, epidermis of *parp-1*<sup>-/-</sup> mice did not show increased proliferation rates after treatment with carcinogen. Deregulated NF-κB is a hallmark for tumorigenesis together with the concomitant release of early inflammatory mediators. In the absence of PARP-1, NF-κB activation and induction κB-target genes did not take place during the promotion of tumor development. These results suggest that PARP-1 abolition impairs the promotion of skin carcinogenesis interfering with the activation of NF-κB and might have an important implication in targeting PARP-1 as a new antineoplastic therapeutic approach.**

Oncogene (2004) 23, 5275–5283. doi:10.1038/sj.onc.1207696

Published online 12 April 2004

**Keywords:** skin carcinogenesis; PARP-1; NF-κB; inflammation

### Introduction

Nuclear factor-κB (NF-κB)/Rel transcription factors play a central role in the regulation of genes involved in a variety of cellular processes (Bauerle and Baltimore,

1996). They are crucial mediators of immune and stress responses, exert pro- and antiapoptotic effects and are important in cell proliferation and differentiation. Dysregulation of the NF-κB system is thought to be involved in acute and chronic inflammatory processes as well as in cancer (Baldwin, 2001). The active NF-κB complex is either a homo or heterodimer composed of proteins of the NF-κB/Rel family: p50, p52, p65, Rel B and c-Rel (Israel, 2000; Li and Verma, 2002). These structurally related interacting proteins bind as a dimer to κB motif sequences found in the promoter regions of the genes. The primary level of control for NF-κB is mediated through the cytoplasmic inhibitory proteins called IκB. When nuclear localization sequences of NF-κB/Rel are covered by IκB, they are retained in the cytoplasm and do not function as active transcription factors. Most of the pathways that result in NF-κB activation converge on activating the IκB kinase (IKK) complex. Upon stimulation, the IκB proteins are phosphorylated by IKK and rapidly degraded through ubiquitin-dependent proteolysis releasing NF-κB to translocate to the nucleus and to activate the expression of target genes. Several lines of evidences suggest that proteins from NF-κB and IκB families are involved in carcinogenesis. NF-κB controls the expression of several growth factors, oncogenes and tumor-suppressor genes, genes encoding cell adhesion proteins, and proteases of the extracellular matrix. Thus, dysregulation NF-κB may play a critical role in carcinogenesis through either the alteration of cell growth or disruption of cell adhesion due to gene expression patterns involved in tumor growth, invasion and metastasis (Pahl, 1999; Baldwin, 2001). A constitutive NF-κB activation has been detected in hematopoietic malignancies such as Hodgkin's disease or acute lymphoblastic leukemia, as well as in several types of solid tumors (Bargou *et al.*, 1996; Mayo and Baldwin, 2000). The genes for the NF-κB subunits, as well as the IκB proteins including Bcl-3 are all located at sites of recurrent translocation and genomic rearrangement in human cancer (Rayet and Gelinas, 1999). Furthermore, a marked homology of the amino termini of both p50 and p65 with the viral oncoprotein v-Rel was found (Mayo and Baldwin, 2000). These findings point to an involvement of

\*Correspondence: FJ Oliver, Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, C/ Ventanilla 11, 18001 Granada, Spain; E-mail: joliver@ipb.csic.es

Received 23 December 2003; revised 26 February 2004; accepted 4 March 2004; published online 12 April 2004

NF- $\kappa$ B transcription factors in the initiation, development and/or promotion of carcinomas of the skin.

There is a large body of evidences involving NF- $\kappa$ B factors involved in keratinocyte transformation and skin carcinogenesis. Using a murine model, the SEN-CAR mouse, the carcinogenesis of the skin has been well studied (Slaga *et al.*, 1995). Epidermal inflammation and hyperplasia play a critical role in skin tumor promotion and NF- $\kappa$ B is one of the well-known mediators of these effects (Budunova *et al.*, 1999). Substances like phorbol ester and okadaic acid which are promoters of skin cancer are also strong inducers of an NF- $\kappa$ B response in keratinocytes (Budunova *et al.*, 1999). Furthermore, a Ha-ras oncogene point mutation is found in over 90% of mouse skin tumors which is also implicated in NF- $\kappa$ B activation (Budunova *et al.*, 1999). Using this mouse model, it has been shown that while in normal epidermis NF- $\kappa$ B was expressed in the cytoplasm of basal cells, p50 and p52 are elevated in squamous cell carcinoma as well as in skin papillomas (Pandolfi *et al.*, 1992). I $\kappa$ B $\alpha$  protein levels are reduced in carcinoma and papilloma cells. Thus, these data are in line with other results on overexpression of p50 and p52 in solid tumors and others (Siebenlist *et al.*, 1994; Bargou *et al.*, 1996; Mayo and Baldwin, 2000). Nonetheless, this concept has been challenged by the Khavari's group in a recent publication where they find that blockade of NF- $\kappa$ B by I $\kappa$ B $\alpha$  circumvents restraints on human epidermal cells growth promotion induced by oncogenic Ras (Dajee *et al.*, 2003).

On the other hand, poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is a nuclear, zinc-finger, DNA-binding protein that detects specifically DNA-strand breaks generated by different genotoxic agents (de Murcia and Menissier de Murcia, 1994; D'Amours *et al.*, 1999). PARP-1 is associated *in vivo* with XRCC1, a DNA repair protein involved, together with DNA polymerase  $\beta$  and DNA ligase III, in the base excision repair (Masson *et al.*, 1998) of DNA. Treatment of PARP-1 knockout mice with either alkylating agents or  $\gamma$ -irradiation reveals an extreme sensitivity and a high genomic instability to both agents (de Murcia *et al.*, 1997; Samper *et al.*, 2001).

In a recent study (Conde *et al.*, 2001), we have established that the absence of PARP-1 is able to slow down tumor formation and to increase the lifespan of p53-deficient mice by a mechanism dependent on the inhibition of oxidative stress and partial restoration of the G1/S checkpoint after DNA damage. We and others have shown that PARP-1 is a transcriptional coactivator of NF- $\kappa$ B and PARP-1 knockout mice are much less sensitive to inflammatory stress (Hassa and Hottiger, 1999; Oliver *et al.*, 1999; Hassa *et al.*, 2001) as a result of a diminished release of proinflammatory mediators, including NO. The understanding of the role and involvement of PARP-1 in many biological mechanisms, health and diseases, has steadily increased in recent years, but its role in carcinogenesis has not been completely clarified. Our results clearly support the idea that PARP-1 is an

important regulator of skin carcinogenesis and this is due, at least in part, to its ability to modulate the response through NF- $\kappa$ B.

## Results

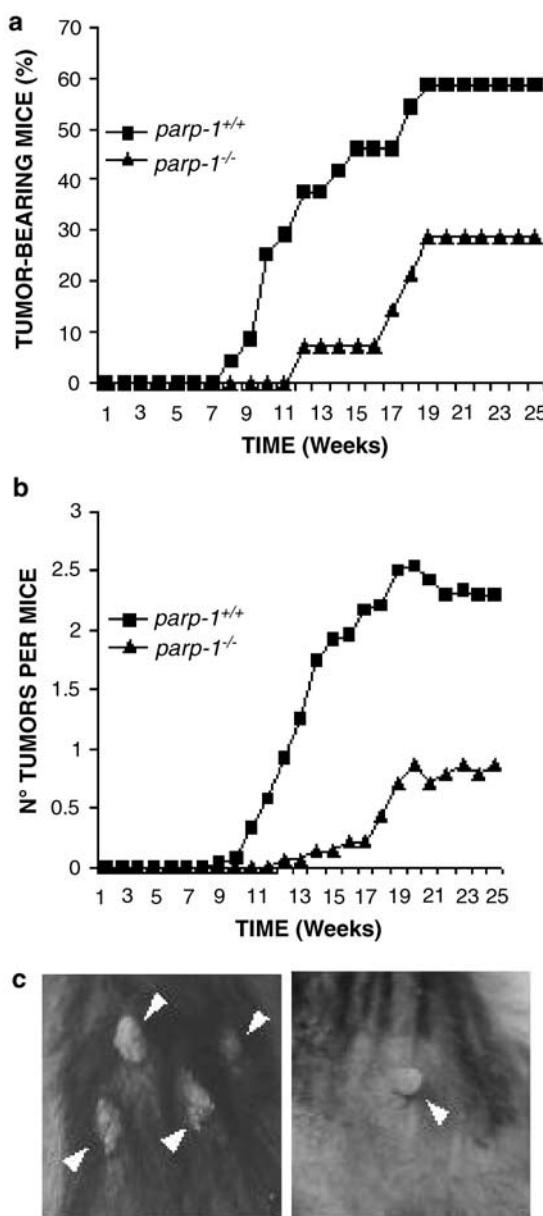
As a first approach to elucidate the role of the interaction between PARP-1 and NF- $\kappa$ B in carcinogenesis, we studied the development of papilloma in PARP-1 knockout mice by the standard DMBA (7,12-dimethylbenz[a]-anthracene) plus TPA (12-O-tetra-decanoyl-phorbol-13-acetate) skin carcinogenesis protocol.

Mice of a C57BL/6 background were subjected to a single topical application of carcinogen (25  $\mu$ g DMBA in 100  $\mu$ l of acetone) and 1 week later, to promotion with 12  $\mu$ g TPA in 200  $\mu$ l of acetone. Papillomas were first found in the wild-type mice 8 weeks after promotion while *parp-1*<sup>-/-</sup> mice developed tumors starting at week 12, 3 weeks later than in *parp-1*<sup>+/+</sup> mice. Tumor multiplicity, found after papillomas promotion, is similar to previously reported data for this genetic background (Moore *et al.*, 1999). The percentage of tumor-bearing mice at the end of treatment was 58.3% for *parp-1*<sup>+/+</sup> mice ( $n=24$ ) versus 28.6% for *parp-1*<sup>-/-</sup> mice ( $n=14$ ) ( $P<0.05$ ) (Figure 1a). Figure 1b represents the number of tumor per mice. The papilloma latent period (number of weeks to obtain at least one papilloma per mice) for *parp-1*<sup>+/+</sup> was 11.5 weeks while *parp-1*<sup>-/-</sup> mice did not attain one tumor per mice in average during the experimental period, suggesting that the time of tumor latency in *parp-1*<sup>-/-</sup> mice is largely delayed with respect to the wild-type *parp-1*<sup>+/+</sup> strain. The differences in the number of tumor per mice obtained during the 25 weeks were statistically significant between these two groups of mice ( $P<0.05$ ). Figure 1c shows the difference in morphology between papilloma in *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> taken at week 17th.

The epithelium in control mice are compound by two or three layers of cells with very thin granulosum stratum in some cases absent, and scant corneum stratum, and an homogeneous thickness of a maximum of 0.02 mm. All mice treated with DMBA plus TPA, developed epithelial hyperplasia with significant increase and irregular thickness of epithelium and granulosum stratum versus nontreated mice ( $P<0.0001$ ). This treatment also induce moderate hyperkeratosis (100%), thickness of hair infundibulum (100%), and dermal pigmentary incontinence in more than 75% of *parp-1*<sup>+/+</sup> or *parp-1*<sup>-/-</sup> mice (not shown).

The presence of acute inflammatory infiltrate and the number of mastocytes per mm<sup>2</sup> in papilloma are significantly decreased in *parp-1*<sup>-/-</sup> mice versus parental mice (Figure 2a and b;  $P<0.01$ ). The cell turnover is also clearly increased in *parp-1*<sup>+/+</sup> mice versus *parp-1*<sup>-/-</sup>, displaying increased mitosis (7.10/hpf) and apoptotic bodies (6.37/hpf) ( $P<0.05$ ) (Figure 2a, c).

To further support the previous observations, proliferation of keratinocytes was determined by BrdU



**Figure 1** Skin carcinogenesis in *parp-1<sup>+/+</sup>* and *parp-1<sup>-/-</sup>* mice. C57BL/6 mice were treated with one dose of 25  $\mu$ g DMBA and then 12  $\mu$ g TPA twice weekly for 25 weeks. Tumors more than 1 mm in diameter were counted every week. (a) final number of tumor-bearing mice in *parp-1<sup>+/+</sup>* ( $n=24$ ) (■) and *parp-1<sup>-/-</sup>* mice ( $n=14$ ) (▲). (b) Average number of tumors per mouse by tumor promotion in *parp-1<sup>+/+</sup>* ( $n=24$ ) (■) and *parp-1<sup>-/-</sup>* mice ( $n=14$ ) (▲). The differences are statistically significant ( $P<0.05$ ). (c) Examples of skin papillomas in *parp-1<sup>+/+</sup>* (left) and *parp-1<sup>-/-</sup>* mice (right) at week 17 after the start of the treatment.

incorporation after 1 week challenge with DMBA and TPA as described in Materials and methods. Clearly, keratinocytes proliferation was decreased in *parp-1* knockout mice compared with that in wild type. In the wild-type skin, 17.21% of basal keratinocytes labeled with BrdU compared with 9.08% in the skin from *parp-1* knockout mice ( $P<0.01$ , Figure 3a, b). We have also measured apoptosis using the TUNEL assay, but this phenomenon was extraordinarily rare in the treated

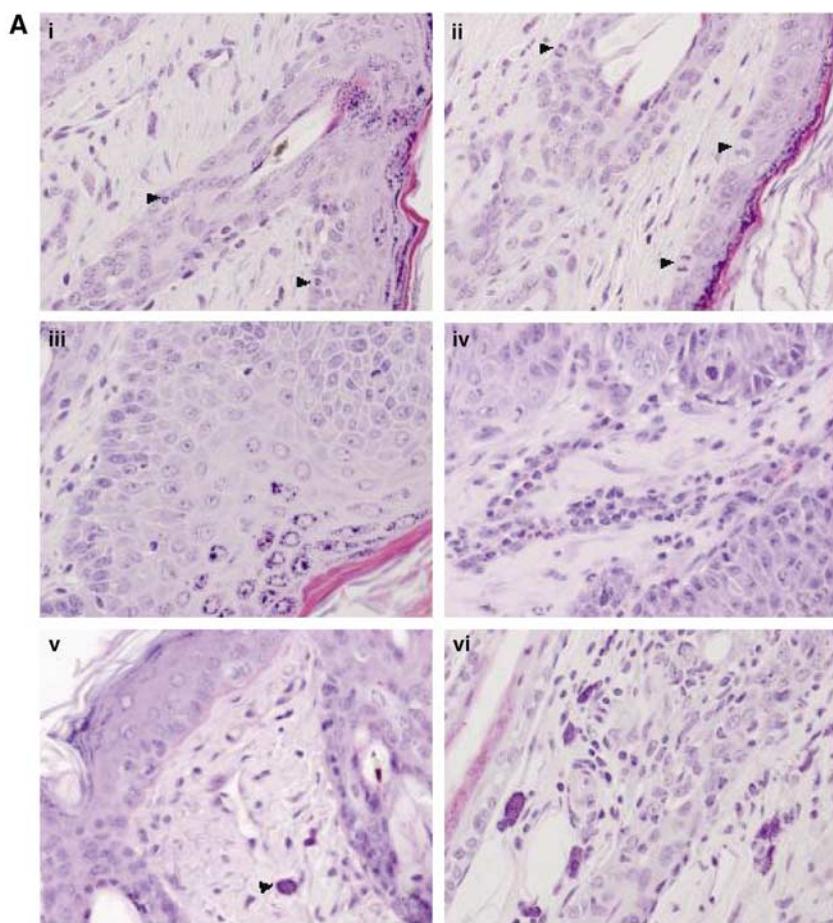
dorsal skin. Nonetheless, TUNEL-positive cells were more represented in wild-type tissue (Figure 3c), suggesting that the increased rate of cell proliferation correlates with an augmented cell elimination.

Mice deficient in PARP-1 display a decreased activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B (Oliver *et al.*, 1999; Hassa and Hottiger, 2002). In order to find a mechanistic explanation for the reduced and delayed papilloma formation and the decreased keratinocytes proliferation in *parp-1*-deficient mice during the chemical carcinogenesis, we have focused on the activation of NF- $\kappa$ B and the activation of some key NF- $\kappa$ B responsive genes. In nuclear extracts from the epidermis of wild-type mice, TPA markedly induced NF- $\kappa$ B activation. However, in the skin of *parp-1<sup>-/-</sup>* mice there was no activation of NF- $\kappa$ B during carcinogenesis (Figure 4a). The lack of NF- $\kappa$ B activation is also revealed by the decreased or even absent induction of genes under the control of NF- $\kappa$ B such as IL-1 $\beta$ , MnSOD and TRAIL ligand, in the skin of *parp-1<sup>-/-</sup>* mice (Figure 4b). TNF- $\alpha$  is upregulated very early after the initial TPA treatment, and we think that the lack of stimulation in TNF- $\alpha$  in our experiments is probably due to a downregulation due to the repeated treatment with this tumor promoter agent.

## Discussion

PARP-1 is a multifunctional protein and the outcome of its genetical elimination or pharmacological inhibition is dependent on the type and intensity of the stimulus arriving to the cell. In the case of the oxidative cell damage produced during the inflammatory response the initial steps of skin neoplasia, the absence of PARP-1 represents a net advantage because two pathways leading to exacerbating cell and tissue damage, activation of NF- $\kappa$ B and nonapoptotic PARP-1-mediated cell death (Yu *et al.*, 2002), are avoided through the downregulation/abolition of PARP-1. In the present study, we show that the indirect inhibition of NF- $\kappa$ B by the elimination of PARP-1, result in a dramatic decrease in the incidence of premalignant skin lesions development.

The role of PARP-1 in carcinogenesis and tumor development has been addressed for a long time based on the use of chemical inhibitors and in the last years using *parp-1* single- or double-knockout mice after breeding with different DNA surveilling genes (reviewed in Shall and de Murcia, 2000; Conde *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2002). Although the use of PARP inhibitors to potentiate chemo and radiotherapy has been a long-standing approach from different laboratories in the last decades, all the results reported so far in PARP-1 knockout mice show a tumor type-dependent effect of single *parp-1* elimination with respect to carcinogenesis. In this respect, recent reports by Tsutsumi *et al.* (2001) and Nozaki *et al.* (2003) indicates that *parp-1* knockout mice are more sensitive to chemically induced tumorigenesis in liver and colon, respectively. We think that this controversy is only apparent because the balance



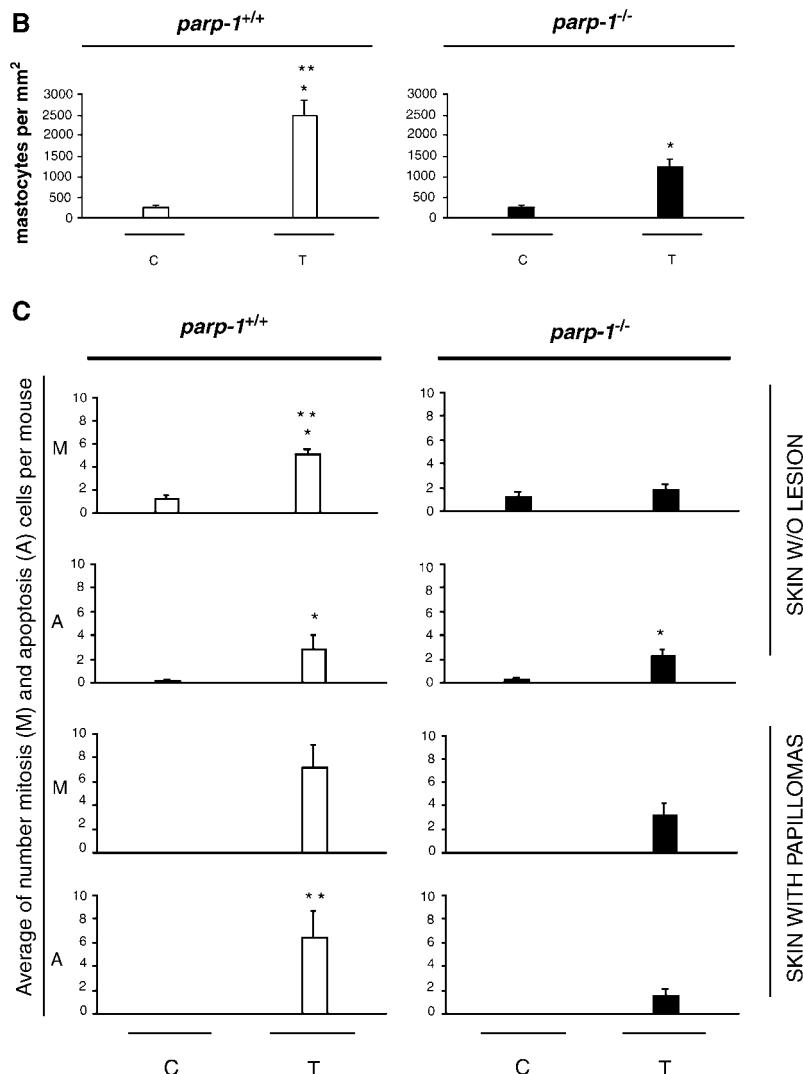
**Figure 2** Morphological evaluation of mitosis, apoptosis and inflammation (A) Histological analysis of *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> mice skin at the end of treatment (25 weeks) with DMBA + TPA. (i) *parp-1*<sup>-/-</sup> with evidence of apoptotic bodies (arrowheads) (H&E  $\times 400$ ). (ii) *parp-1*<sup>+/+</sup> with increased number of mitotic cells in basal layer (arrowheads) (H&E  $\times 400$ ). (iii) Skin of *parp-1*<sup>-/-</sup> with papilloma. Note the scant inflammatory infiltrate (H&E  $\times 400$ ) versus (iv) *parp-1*<sup>+/+</sup> with evident acute and chronic inflammatory infiltrate in papilloma (H&E  $\times 400$ ). (v) *parp-1*<sup>-/-</sup> with scant mastocytes (arrowheads) (H&E  $\times 400$ ). (vi) Cluster of mastocytes in *parp-1*<sup>+/+</sup> (H&E  $\times 400$ ). (B) Number of mastocytes per mm<sup>2</sup> in papilloma from *parp-1*<sup>+/+</sup> mice and *parp-1*<sup>-/-</sup> mice treated with a single dose of DMBA and promotion with TPA during 25 weeks. (C) Increased cell turnover in skin of *parp-1*<sup>+/+</sup> mice versus *parp-1*<sup>-/-</sup> mice treated as described above. The mitotic (M) and apoptotic cells (A) were counted as for mastocytes. Error bars represent s.e. of the mean (s.e.m.). (C) Increased cell turnover in skin of *parp-1*<sup>+/+</sup> mice versus *parp-1*<sup>-/-</sup> mice treated as described above. The mitotic (M) and apoptotic cells (A) were counted as for mastocytes. Error bars represent s.e. of the mean (s.e.m.). \* $P < 0.05$  with respect to untreated control; \*\* $P < 0.01$  with respect to treated *parp-1*<sup>-/-</sup> mice

between environmental factors (the influence of chronic inflammation and trans-activation of stress-related genes by the tumor and surrounding tissues) and intrinsic components involved in genetic instability of the tumor, is dependent on the type of tumor in study. In our case, the development of skin carcinogenesis the inflammatory status has repeatedly been reported to be key determinant (Moore *et al.*, 1999; Budunova *et al.*, 1999; Bell *et al.*, 2003).

On the other hand, multiple evidence suggests that activation of NF- $\kappa$ B can lead to tumor cell proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis (Gilmore *et al.*, 2002). Recent work suggests the involvement of *p53* promoter activation by NF- $\kappa$ B (Benoit *et al.*, 2000) and the existence of a promoter element that is involved in basal *p53* gene expression and the stress response (Noda *et al.*, 2000). Thus, suppression of NF- $\kappa$ B in cancer cells may provide an additional target for prevention of cancer. NF- $\kappa$ B blockers (which is the case for *parp-1*

inactivation) can also be considered for the therapy of cancer, perhaps in combination with chemotherapeutic agents or gamma irradiation.

Cancer is a multifactorial disease, and its treatment may also require multimodal therapy. In most instances when the diseases are diagnosed, numerous changes in the tumor have already taken place, thus creating a challenge for the physician to treat the patient. Most recent treatments for cancer have been a combination therapy consisting of chemotherapeutic agents, inhibitors of signal transduction and antibodies against various cell surface antigens. Therefore, it is reasonable to combine chemotherapeutic agents with chemopreventive agents for the treatment of cancer. In this way, our results suggest that targeting PARP-1 might have a clear benefit in tumor treatment by limiting the rate of cell proliferation and activation of NF- $\kappa$ B leading to suppression of inflammation and expression of genes related with tumor progression. Nonetheless, the bene-

**Figure 2** Continued

fits derived from pharmacological inhibition of PARP-1 activity seems not to be related with inhibition of NF- $\kappa$ B activation (Oliver *et al.*, 1999; Hassa *et al.*, 2001). Thus, new strategies should be conceived in order to locally avoid PARP-1 protein expression such as siRNA, which will have multiple benefits in the short term such as potentiation of chemo- and radiotherapy, inhibition of the inflammatory and tumor promotion-related NF- $\kappa$ B activity and perhaps improving cancer therapy by decreasing the devastating effects of p53 induction in normal tissue and therefore improve the quality of life of patients during treatment.

## Materials and methods

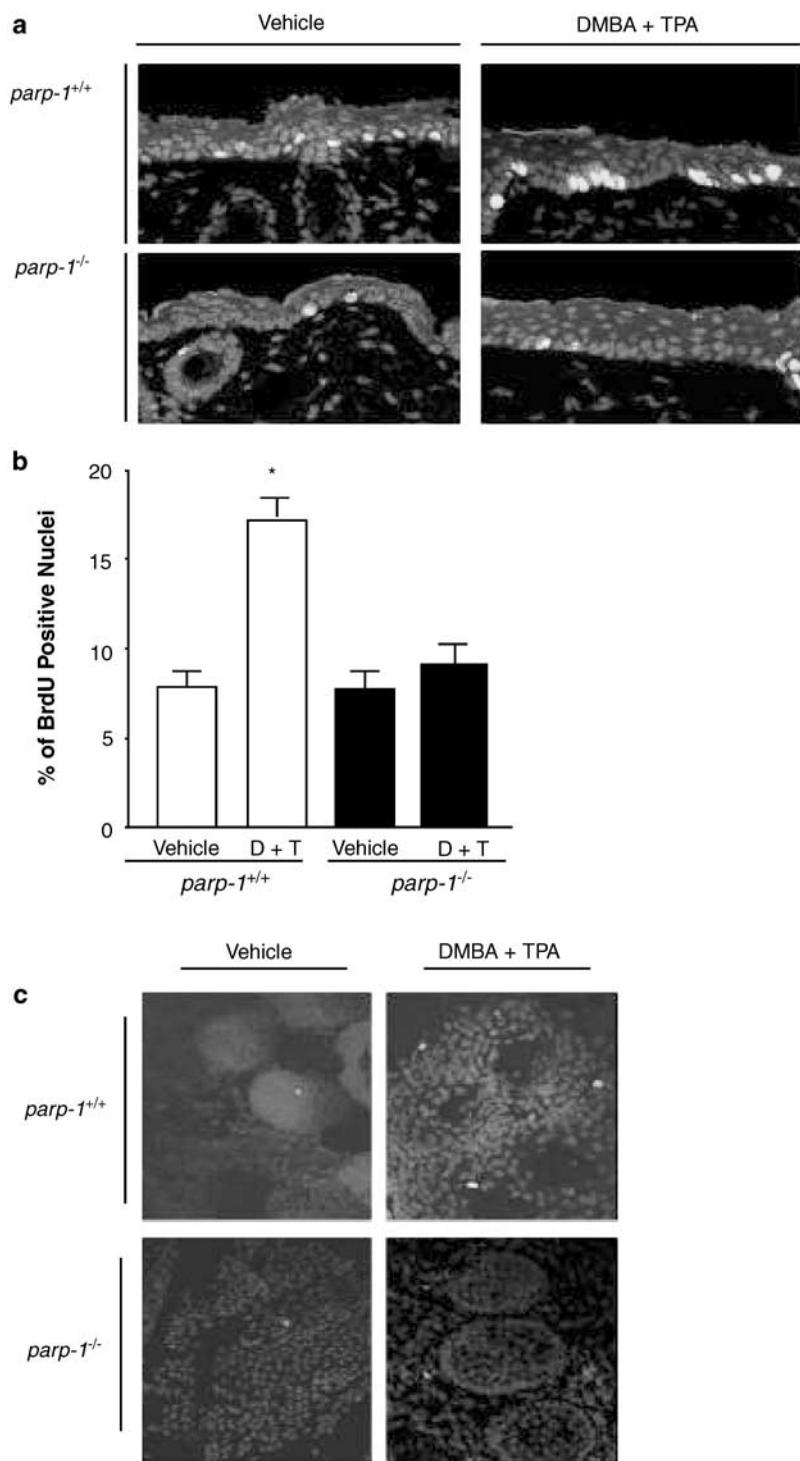
### Mice/tumor induction protocols

*parp-1<sup>-/-</sup>* and *parp-1<sup>+/+</sup>* mice on the C57BL/6 background were generated by homologous recombination in the de Murcia laboratory, as described previously (de Murcia *et al.*, 1997). Tumor induction was performed as described before for mice

with this genetic background (Moore *et al.*, 1999). Briefly, mice 6–8 weeks of age were initiated with a single dose of 25  $\mu$ g DMBA (Sigma, St Louis, MO, USA), applied in 100  $\mu$ l of acetone to the dorsal surface 2 days after shaving. TPA (12  $\mu$ g in 200  $\mu$ l of acetone; Sigma, St Louis, MO, USA), was applied topically twice per week for 25 weeks, beginning 1 week after initiation. Control animals were treated in parallel with acetone alone. The number of tumors more than 1 mm in diameter was counted weekly (Moore *et al.*, 1999; Weinberg *et al.*, 1999) and the experiment was terminated at week 25th when no further tumors were developed (Figure 1a). A short initiation/promotion protocol was used in order to assess for changes in proliferation, apoptosis and NF- $\kappa$ B activation in the initial steps of carcinogenesis. This treatment consisted of a single dose of DMBA (25  $\mu$ g) and four doses of 12  $\mu$ g TPA given over 7 days (Moore *et al.*, 1999) before evaluation of proliferation with BrdU, NF- $\kappa$ B activation, and induction of  $\kappa$ B-dependent genes.

### Proliferation and apoptosis assays

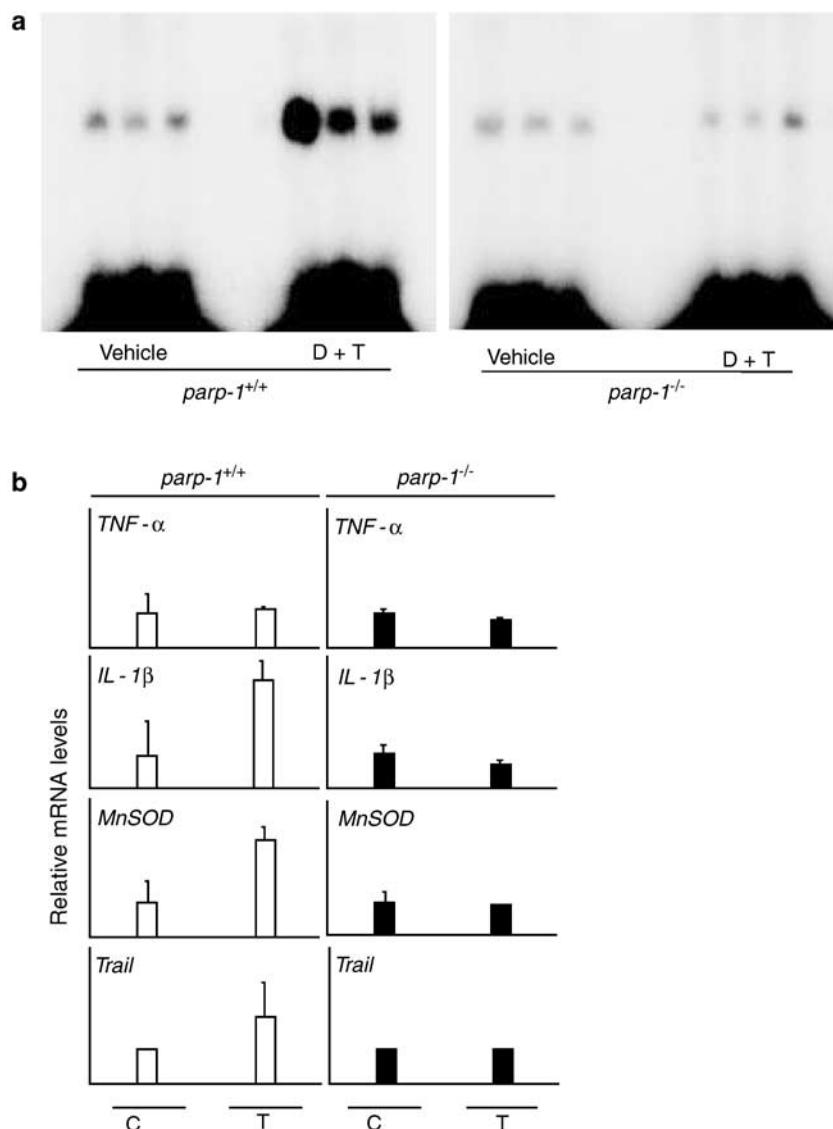
For proliferation assays, a BrdU pulse labeling was done 24 h after DMBA initiation (25  $\mu$ g) and four doses of 12  $\mu$ g TPA



**Figure 3** Cellular changes in skin of wild-type and *parp-1*<sup>-/-</sup> mice during tumor promotion. **(a)** Immunofluorescence analysis of BrdU incorporation in wild type and *parp-1*<sup>-/-</sup> mouse epidermis. Shown is BrdU labeling (white) 24 h after one dose of 25  $\mu$ g DMBA and then four application of 12  $\mu$ g TPA, as described in Materials and methods. Reduced BrdU labeling in treated *parp-1*<sup>-/-</sup> mouse epidermis in comparison with treated wild-type epidermis. Magnification,  $\times 400$ . **(b)** Basal cell proliferation as measured by BrdU pulse-labeling after DMBA initiation and TPA promotion (D + T). *parp-1*-deficient mice do not show increased labeling index (number of BrdU positive cells/1000 basal cells) of untreated (vehicle) or TPA-treated epidermis. The results represent the average of three independent experiments. Error bars represent s.e. of the mean (s.e.m.). \* $P < 0.01$  with respect to untreated control and treated *parp-1*<sup>-/-</sup> mice. **(c)** Apoptosis assays in skin biopsies of treated and untreated mice as described under Materials and methods

given over 7 days. Mice were injected (i.p.) with 200 mg/kg BrdU (Sigma, St Louis, MO, USA) in 0.9% NaCl and were killed after 2 h (Wang *et al.*, 1999). Biopsied skins were fixed in

Carnoy's solution (chloroform-acetic acid-ethanol, 3 : 1 : 6) at 4°C overnight, embedded in paraffin and sectioned to 4- $\mu$ m thickness. For immunofluorescence, samples were stained with



**Figure 4** Defective NF- $\kappa$ B activation and  $\kappa$ B-dependent gene expression in *parp-1<sup>-/-</sup>* mice during tumor promotion. **(a)** Band shift analysis of NF- $\kappa$ B activation using  $\kappa$ B iNOS promoter sequence. Defective NF- $\kappa$ B activation in *parp-1*-deficient mice epidermis 24 h after skin treatment with one dose of 25  $\mu$ g DMBA and four application of 12  $\mu$ g TPA, as described in Materials and methods. The results shown is representative of three independent experiments. **(b)** Expression levels of NF- $\kappa$ B regulated genes in the skin of untreated (C) or treated (T) epidermis of *parp-1<sup>-/-</sup>* mice compared with those of wild-type mice. Poly(A)<sup>+</sup> RNA was isolated from the skin of *parp-1<sup>-/-</sup>* and *parp-1<sup>+/+</sup>* mice 24 h after treatment with one dose of 25  $\mu$ g DMBA and four application of 12  $\mu$ g TPA, as described in Materials and methods. Expression levels of genes were determined by semiquantitative RT-PCR. Values are normalized to the level of  $\alpha$ -tubulin mRNA and represent mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments

monoclonal antibody to BrdU (Sigma, clone BU-33) using standard procedures (Brantley *et al.*, 2001; Greenhalgh *et al.*, 1996) and nuclei were counterstained with propidium iodide (0.5–1  $\mu$ g/ml). For quantification, random fields per section at  $\times 400$  magnification were documented by confocal microscopy, and the percentage of BrdU-positive epithelial basal cell nuclei was calculated. Five to eight skin samples were analysed in each animal and random tissue section derived for three animals per genotype were quantified. The total number of epithelial basal cell nuclei (at minimum of 1000) was also quantified in each of these samples. For apoptosis assays, ‘*in toto*’ skin biopsies were used in order to optimize visualization of apoptotic cells. Skin biopsies from treated

and untreated mice were fixed in 10% (v:v) neutral buffered formalin at 4°C overnight and the epidermis was separated after incubating skin biopsy in PBS with 2% Triton X-100 at 4°C for 24 h. Fragmented DNA was labeled with ApopTag® Fluorescein *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Intergen) according to the manufacturer’s protocol. Aleatory fields per epidermis samples at  $\times 200$  and  $\times 400$  magnification were documented by confocal microscopy. Independent biopsied skins derived for three animals per genotype were visualized.

#### Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

The double-stranded oligonucleotides 5'-TGCTAGGGG-GATTTCCCTCTTCTGT-3' (Xie *et al.*, 1994) with the

sequences of the binding sites for NF- $\kappa$ B of iNOS promoter were purchased. These oligonucleotides were end-labeled with [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP and T4 DNA polynucleotide kinase and used as probe. Nuclear extracts of the dorsal skin of untreated or from treated mice with the short protocol described above were obtained according to a previous report (Velasco *et al.*, 1997). Nuclear extracts (180 ng protein) were incubated with 2  $\mu$ l of  $^{32}$ P-labeled probe ( $6 \times 10^4$  d.p.m.) in a final volume of 20  $\mu$ l of reaction mixture for 15 min at 4°C as described previously (Oliver *et al.*, 1999). The DNA-protein complexes were separated on native 5% polyacrylamide gels in 0.5 Tris-borate EDTA buffer.

#### *Expression of NF- $\kappa$ B-dependent genes*

DMBA and TPA were applied to the skin of the backs of mice as described above for BrdU labeling and EMSA. Total RNA was isolated from the skin of the mice 24 h after the last TPA treatment by Trizol (Gibco) extraction method, according to the manufacturer's recommendations. Expression of various NF- $\kappa$ B-dependent genes (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MnSOD and TRAIL) was determined by semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).  $\alpha$ -Tubulin was used as an internal control. PCR conditions for amplification of NF- $\kappa$ B-dependent genes were 35 cycles of 95°C for 60 s, annealing at 58 or 50°C (IL-1 $\beta$ ) for 60 s and 72°C for 60 s, and  $\alpha$ -tubulin annealing at 66°C. The results were confirmed by three independent experiments. Primers used were: 5'-CCT-GTAGCCCACGTCTAGC-3' (sense) and 5'-GTTGAG-TCGCGACTCCAGTT-3' (antisense) for TNF- $\alpha$ ; 5'-AAGG-AGAACCAAGCAACGAC-3' (sense) and 5'-ACTCGT-CTGTCGAGTTAGAG-3' (antisense) for IL-1 $\beta$ ; 5'-GAC-CTGCCTTACGACTATGG-3' (sense) and 5'-GACCTT-GCTCCTTATTGAAGC-3' (antisense) for MnSOD; 5'-TCA-CCAACGAGATGAAGCAGC-3' (sense) and 5'-CTCA-CCTTGTCCTTGAGACC-3' (antisense) for TRAIL (Musgrave *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; Tucker and Sack, 2001).

#### *Histological techniques*

For conventional morphology, three buffered 4% formaldehyde-fixed, paraffin-embedded skin longitudinal tissue sections

(all thickness, with or without papillomatous lesion) of *parp-1*<sup>+/+</sup>, *parp-1*<sup>-/-</sup> and controls mice in week 25 were stained with hematoxylin and eosin. The study was done in blinded fashion on 4- $\mu$ m sections with light microscopy. The mitosis and apoptosis cells were assessed by examining their number in 10 high-power field ( $\times 600$  magnifications) in skin with and without papillomas. A count was made of the number of mastocyte cells in the skin was carried out with a 1 cm<sup>2</sup> grid divided into 100 mm<sup>2</sup> squares, placed in the eyepiece of an Olympus BH2 microscope (10 fields per mouse at  $\times 400$  magnifications were assessed). The results were expressed as number of cells per mm<sup>2</sup>. The presence of papillomas, epithelial hyperplasia, dysplasia, inflammatory infiltrated and pigmentary incontinence were also evaluated.

For morphometric study of epithelium (mean of thickness of epidermis and stratum granulosum) the software for development of image analysis program Visilog® 4.1 (Noesis S.A., Vélizy, France) was used and expressed in millimeters.

#### *Statistical analysis*

For data shown in Figure 1a and b we have fitted the values of the average number of tumors per mouse and the time after promotion, using the Mann-Whitney *u*-test. Statistical analysis of other experiments used unpaired Student's *t*-test (Figures 2b, c and 3b).

#### *Acknowledgements*

We would like to acknowledge very specially to the officials of the animal facility at the IPBLN, CSIC, Dolores Beriso García and Francisco Ferrer Gamarra. This work has been funded by Fondo de Investigaciones Sanitarias (Grants 00/0941 and G03/15 to FJO and Grant PI021505 and HF 2001-0067 to RGM), and Spanish Ministry for Science and Technology (Grant SAF2001-3533) to JMRA, DMO, JAMG and MTV were supported by Fellowships from Fondo de Investigaciones Sanitarias.

#### **References**

- Baldwin Jr AS. (2001). *J. Clin. Invest.*, **107**, 3–6.
- Bargou RC, Leng C, Krappmann D, Emmerich F, Mapara MY, Bommert K, Royer HD, Scheidereit C and Dorken B. (1996). *Blood*, **87**, 4340–4347.
- Bauerle PA and Baltimore D. (1996). *Cell*, **87**, 13–20.
- Bell S, Degitz K, Quirling M, Jilg N, Page S and Brand K. (2003). *Cell Signal*, **15**, 1–7.
- Benoit V, Hellin AC, Huygen S, Gielen J, Bours V and Merville MP. (2000). *Oncogene*, **19**, 4787–4794.
- Brantley DM, Chen CL, Muraoka RS, Bushdid PB, Bradberry JL, Kittrell F, Medina D, Matrisian LM, Kerr LD and Yull FE. (2001). *Mol. Biol. Cell*, **12**, 1445–1455.
- Budunova IV, Perez P, Vaden VR, Spiegelman VS, Slaga TJ and Jorcano JL. (1999). *Oncogene*, **18**, 7423–7431.
- Conde C, Mark M, Oliver FJ, Huber A, de Murcia G and Menissier-de Murcia J. (2001). *EMBO J.*, **20**, 3535–3543.
- Dajee M, Lazarov M, Zhang JY, Cai T, Green CL, Russell AJ, Marinkovich MP, Tao S, Lin Q, Kubo Y and Khavari PA. (2003). *Nature*, **421**, 639–643.
- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I and Poirier GG. (1999). *Biochem. J.*, **342**, 249–268.
- de Murcia G and Menissier de Murcia J. (1994). *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 172–176.
- de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walzinger C, Chambon P and de Murcia G. (1997). *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 73037.
- Gilmore T, Gapuzan ME, Kalaitzidis D and Starczynowski D. (2002). *Cancer Lett.*, **181**, 1–9.
- Greenhalgh DA, Wang XJ, Donehower LA and Roop DR. (1996). *Cancer Res.*, **56**, 4413–4423.
- Hassa PO, Covic M, Hasan S, Imhof R and Hottiger MO. (2001). *J. Biol. Chem.*, **276**, 45588–45597.
- Hassa PO and Hottiger MO. (1999). *Biol. Chem.*, **380**, 953–959.
- Hassa PO and Hottiger MO. (2002). *Cell Mol. Life Sci.*, **59**, 1534–1553.
- Israel A. (2000). *Trends Cell Biol.*, **10**, 129–133.
- Li Q and Verma IM. (2002). *Nat. Rev. Immunol.*, **2**, 725–734.
- Liu D, Pavlovic D, Chen MC, Flodstrom M, Sandler S and Eizirik DL. (2000). *Diabetes*, **49**, 1116–1122.

- Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J and de Murcia G. (1998). *Mol. Cell Biol.*, **18**, 3563–3571.
- Mayo MW and Baldwin AS. (2000). *Biochim. Biophys. Acta.*, **1470**, M55–M62.
- Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, Holdsworth H, Turner L, Rollins B, Pasparakis M, Kollias G and Balkwill F. (1999). *Nat. Med.*, **5**, 828–831.
- Musgrave BL, Phu T, Butler JJ, Makrigiannis AP and Hoskin DW. (1999). *Exp. Cell Res.*, **252**, 96–103.
- Noda A, Toma-Aiba Y and Fujiwara Y. (2000). *Oncogene*, **19**, 21–31.
- Nozaki T, Fujihara H, Watanabe M, Tsutsumi M, Nakamoto K, Kusuoka O, Kamada N, Suzuki H, Nakagama H, Sugimura T and Masutani M. (2003). *Cancer Sci.*, **94**, 497–500.
- Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC and de Murcia G. (1999). *EMBO J.*, **18**, 4446–4454.
- Pahl HL. (1999). *Oncogene*, **18**, 6853–6866.
- Pandolfi F, Trentin L, Boyle LA, Stamenkovic I, Byers HR, Colvin RB and Kurnick JT. (1992). *Cancer*, **69**, 1165–1173.
- Rayet B and Gelinas C. (1999). *Oncogene*, **18**, 6938–6947.
- Samper E, Goytisolo FA, Menissier-de Murcia J, Gonzalez-Suarez E, Cigudosa JC, de Murcia G and Blasco MA. (2001). *J. Cell Biol.*, **154**, 49–60.
- Shall S and de Murcia G. (2000). *Mutat. Res.*, **460**, 1–15.
- Siebenlist U, Franzoso G and Brown K. (1994). *Annu. Rev. Cell Biol.*, **10**, 405–455.
- Slaga TJ, DiGiovanni J, Winberg LD and Budunova IV. (1995). *Prog. Clin. Biol. Res.*, **391**, 1–20.
- Tong WM, Cortes U, Hande MP, Ohgaki H, Cavalli LR, Lansdorp PM, Haddad BR and Wang ZQ. (2002). *Cancer Res.*, **62**, 6990–6996.
- Tsutsumi M, Masutani M, Nozaki T, Kusuoka O, Tsujiuchi T, Nakagama H, Suzuki H, Konishi Y and Sugimura T. (2001). *Carcinogenesis*, **22**, 1–3.
- Tucker PC and Sack Jr GH. (2001). *FASEB J.*, **15**, 2241–2246.
- Velasco M, Diaz-Guerra MJ, Martin-Sanz P, Alvarez A and Bosca L. (1997). *J. Biol. Chem.*, **272**, 23025–23030.
- Wang XJ, Liefer KM, Tsai S, O'Malley BW and Roop DR. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8483–8488.
- Weinberg WC, Fernandez-Salas E, Morgan DL, Shalizi A, Mirosh E, Stanulis E, Deng C, Hennings H and Yuspa SH. (1999). *Cancer Res.*, **59**, 2050–2054.
- Xie QW, Kashiwabara Y and Nathan C. (1994). *J. Biol. Chem.*, **269**, 4705–4708.
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM and Dawson VL. (2002). *Science*, **297**, 259–263.

## PARP-1-Dependent 3-Nitrotyrosine Protein Modification After DNA Damage

E. Siles,<sup>1</sup> E. Martínez-Lara,<sup>1</sup> M.I. Núñez,<sup>2</sup> J.A. Muñoz-Gámez,<sup>2,3</sup> D. Martín-Oliva,<sup>2,3</sup> M.T. Valenzuela,<sup>2</sup> M.A. Peinado,<sup>1</sup> J.M. Ruiz de Almodóvar,<sup>2</sup> and F. Javier Oliver<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Biología Experimental, Universidad de Jaén, Spain

<sup>2</sup>Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain

<sup>3</sup>Instituto López Neyra de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada, Spain

**Abstract** 3-nitrotyrosine ( $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ ) is thought to be a specific marker of cell injury during oxidative damage. We have evaluated the role of poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) in protein nitration after treatment of immortalized fibroblasts *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> with the alkylating agent 2'-methyl-2'-nitroso-urea (MNU). Both cell lines showed increased iNOS expression following MNU treatment in parallel with a selective induction of tyrosine nitration of different proteins. PARP-1 deficient cells displayed a delayed iNOS accumulation, reduced number of nitrated proteins, and a lower global nitrotyrosine “footprint.” We have identified the mitochondrial compartment as the major site of oxidative stress during DNA damage, being MnSOD one of the  $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ -modified proteins, but not in *parp-1*<sup>-/-</sup> cells. These results suggest that NO-derived injury can be modulated by proteins involved in the response to genotoxic damage, such as PARP-1, and may account for the limited oxidative injury in *parp-1* knockout mice during carcinogenesis and inflammation. *J. Cell. Biochem.* 96: 709–715, 2005. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** PARP-1; DNA damage; protein nitration; nitric oxide; MnSOD

The presence of damaged DNA in the cell activates repair mechanisms as well as signal transduction pathways leading to cell cycle arrest and programmed cell death. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) is a nuclear, zinc-finger, DNA-binding protein that detects specifically DNA-strand breaks generated by different genotoxic agents [D'Amours et al., 1999]. PARP-1 is associated in vivo with XRCC1, a DNA repair protein involved, together with DNA polymerase β and DNA ligase III, in the base excision repair of DNA [Masson et al., 1998]. Treatment of *parp-1*<sup>-/-</sup> mice with either

alkylating agents or  $\gamma$  irradiation reveals an extreme sensitivity and a high genomic instability to both agents [de Murcia et al., 1997; Sampier et al., 2001].

In previous studies it has been established that the absence of PARP-1 is able to slow down tumor formation and to increase the lifespan of p53 deficient mice by a mechanism dependent on the inhibition of oxidative stress and partial restoration of the G<sub>1</sub>/S checkpoint after DNA damage [Conde et al., 2001; Martin-Oliva et al., 2004]. On the other hand, we and others have shown that PARP-1 is a transcriptional co-activator of NF-κB and PARP-1 knockout mice are much less sensitive to inflammatory stress [Oliver et al., 1999; Hassa et al., 2003] as a result of a diminished release of pro-inflammatory mediators, including nitric oxide (NO).

Reactive oxygen species (ROS), and specially  $\text{O}_2^-$ , are important modulators of NO activity under various pathophysiological conditions [Grisham et al., 1999] and are thought to be involved in cellular injury through the action of NO-derived radicals species such as the powerful oxidant peroxynitrite [Beckman et al., 1993]. 3-nitrotyrosine ( $\text{NO}_2\text{-Tyr}$ ) is a modified amino

Grant sponsor: Fondo de Investigaciones Sanitarias (to FJO); Grant numbers: 00/0941, G03/152; Grant sponsor: Spanish Ministry for Science and Technology (to MRA and FJO); Grant numbers: SAF2001-3533, SAF2003-01217.

\*Correspondence to: F. Javier Oliver, PhD, Instituto López Neyra de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Campus de Ciencias de la Salud. Avda. del Conocimiento s/n, 18100-Armilla, Granada, Spain. E-mail: joliver@ipb.csic.es

Received 26 April 2005; Accepted 6 June 2005

DOI 10.1002/jcb.20570

© 2005 Wiley-Liss, Inc.

acid formed by nitric oxide-derived species and has been implicated in the pathology of diverse human diseases including atherosclerosis, reperfusion injury, amyotrophic lateral sclerosis, septic lung, and rheumatoid arthritis [Macmillan-Crow and Cruthirds, 2001]. Free NO<sub>2</sub>-Tyr is produced in abundant concentrations under pathological conditions and its capacity to alter protein structure and function at the translational or post-translational level is well known [Beal, 2002]. The aim of this study was to evaluate the impact of the absence of PARP-1 in the NO-mediated oxidative stress response during the DNA damage.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Culture and Treatments

Immortalized murine embryonic fibroblasts expressing or lacking *PARP-1* (*parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup>) were obtained as described previously [Boczkowski et al., 2001]. They were grown in 10% fetal bovine serum-supplemented Dulbecco's modified Eagle's medium (FBS-DMEM, Sigma, St. Louis, MO) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 90% N<sub>2</sub>. Fibroblasts were treated for different periods of time with the monofunctional alkylating agent 2'-methyl-2'-nitroso-urea (MNU) at 0.5 mM or with lipopolysaccharide (LPS) at 15 µg/ml for 24 h.

### Western Blotting Assay

At the end of each incubation period, cells were collected, washed with cold PBS, and lysed for 20 min at 4°C in 20 mM phosphate buffer pH 7.5, 0.1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 12.5 mM β-mercaptoethanol, and protease inhibitors. After centrifugation at 14,000g for 15 min at 4°C, supernatant was collected and protein was quantified. Western blotting was carried out using standard procedures. Equal amounts of protein extracts were loaded into each well of a 7.5% or 10% SDS-polyacrylamide gel (NO synthases and NO<sub>2</sub>-Tyr-modified proteins analysis, respectively). Proteins in the gel were transferred to a PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and then blocked. Monoclonal antibodies to inducible and endothelial NO synthases (iNOS and eNOS respectively) (Transduction, BD), polyclonal antibodies to neuronal NOS and 3-nitrotyrosine (generous gifts from V. Riveros-Moreno of Welcome

Research Laboratories, Berkenhem, UK and Dr. Rodrigo, Instituto Cajal, C.S.I.C, Madrid) [Alonso et al., 2002] and a monoclonal antibody to α-tubulin, as internal control (Sigma) were used for detection of the respective proteins. Antibody reaction was revealed with chemiluminescence detection procedures according to the manufacturer's recommendations (ECL kit, Amersham Corp., Buckinghamshire, UK).

### Immunoprecipitation

For immunoprecipitation, cell lysates (1.2 mg) were precleared by constant mixing for 4 h with protein A-Sepharose (Pharmacia). The beads were removed by centrifugation, and the supernatant was mixed constantly overnight with 5 µg of monoclonal antibody against 3-nitrotyrosine (Upstate Biotechnology, Waltham, MA) or p53 (Novocastra, Newcastle, United Kingdom) as an immunoprecipitation control. Immune complex were adsorbed (2 h, 4°C) onto protein A-Sepharose, washed several times in a saline buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40), boiled and electrophoresed on 15% polyacrylamide gels. For detection of manganese-containing superoxide dismutase (MnSOD), electrotransferred proteins were incubated with a polyclonal anti-MnSOD antibody (1/4,000 dilution, StressGen Biotechnologies Corp., San Diego, CA). Immunoreactive proteins were detected as described above.

### 3-Nitrotyrosine Indirect Immunofluorescence

Cells were grown on slides and immunofluorescence was performed 24 h following MNU exposure. Cells were washed three times in PBS, fixed in fresh cold methanol-acetone (1:1) and then washed again with PBS-Tween 0.1%. The primary antibody for 3-nitrotyrosine analysis was used diluted 1/50 in PBS-Tween 0.1% and bovine serum albumin (BSA) 1%. Cells were incubated for 90 min at room temperature and then washed three times in PBS-Tween 0.1%. For colocalisation studies an antibody against cytochrome c (Pharmingen, San Jose, CA) was used. The secondary antibodies used were linked to the FITC (to reveal nitrotyrosine) or Cy3 (to reveal cytochrome c) (Sigma) and were diluted 1/400 in PBS-Tween 0.1%, BSA 1%. The cells were incubated 1 h at room temperature in the dark. Finally cells were washed three times in PBS-Tween 0.1% and stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

(DAPI) 1/1,000 10 min. Slides were prepared using the Dako mounting medium (Dako Corporation, Glostrup, Denmark), coverslipped and stored in the dark at 4°C.

## RESULTS

### Induction of iNOS and Tyrosine Nitrated Proteins After MNU Treatment

Firstly we established a sublethal dose of MNU (0.5 mM) which allows for the long incubation periods without inducing cell death (not shown). Inactivation of PARP-1 has been associated with a reduced induction of iNOS [Oliver et al., 1999]. To test the oxidative stress response as function of the presence or absence of PARP-1, we have determined iNOS induction and 3-nitrotyrosine-dependent protein modification following MNU treatment. After treatment iNOS accumulates gradually in both cell types (Fig. 1) reaching the maximum value after 24 h in both cases, however in *parp-1*–/– cells this accumulation is strongly delayed. The presence of eNOS and nNOS was also evaluated and no signal was found for these two isoforms (results not shown).

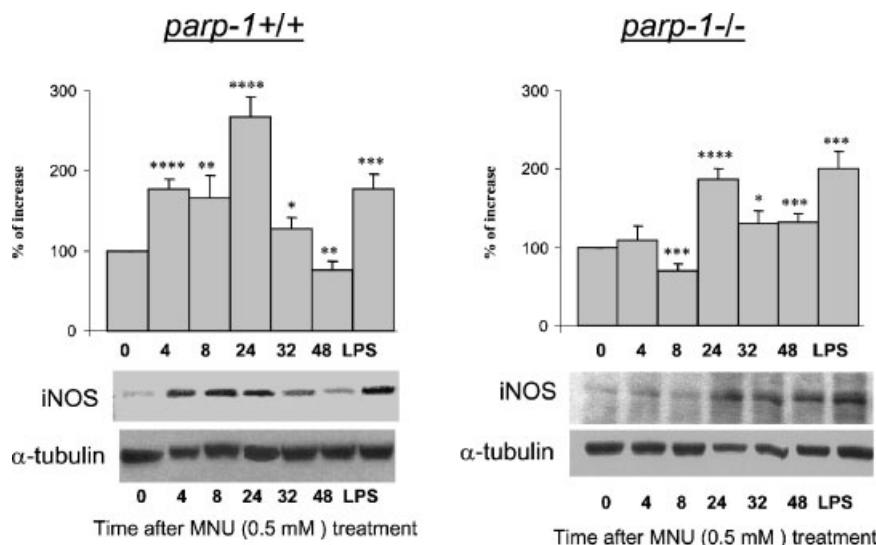
MNU treatment also results in the selective induction of tyrosine nitration of three different electrophoretic bands of approximately 44, 56, and 65 kDa (Fig. 2A). Constitutive nitration was found in a 31 kDa protein in *parp-1*+/+ cells but

not in *parp-1* mutant cells (Fig. 2B). Bulk tyrosine nitration increases gradually mainly in wt fibroblasts. If we compare the different electrophoretic bands in the two genotypes we find striking differences: *parp-1*+/+ fibroblasts accumulate nitrated tyrosine residues in the 65, 56, and 44 kDa bands until the end of the treatment (Fig. 2A). Nevertheless, the 31 kDa band does not seem to change. However, the most striking differences were found in *parp-1*–/– cells in which only two bands (of 56 and 44 kDa) were present, representing a clear global decrease in protein nitration levels (Fig. 2B).

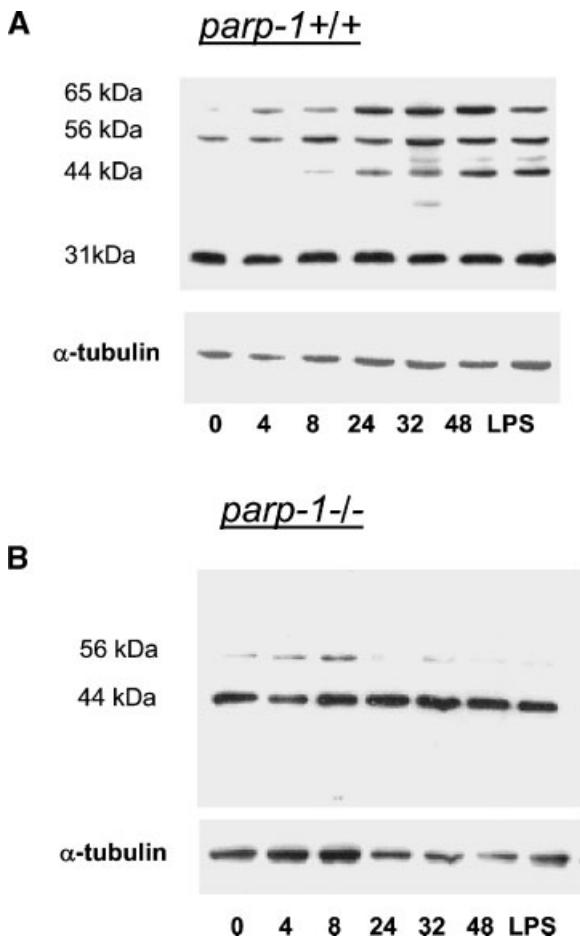
### Increased Nitration at Mitochondrial and Microtubule Compartments During DNA-Damage Derived Oxidative Stress

To support the biochemical evidence of MNU-induced nitration of tyrosine residues of different proteins, confocal microscopy studies were conducted using an anti-3-nitrotyrosine antibody. A treatment of 24 h with 0.5 mM MNU was used because at this time the highest levels of protein nitration were found (Fig. 2). Untreated *parp-1*+/+ and *parp-1*–/– cells displayed minimal immunoreactivity (Fig. 3). After MNU treatment, 3-nitrotyrosine immunoreactivity increased in *parp-1*+/+ cells, but again, *parp-1*–/– cells were minimally affected.

Peroxynitrite generation may have critical implications on mitochondrial functions



**Fig. 1.** Western blot analysis of iNOS expression in *parp-1*+/+ and *parp-1*–/–3T3 cell extracts. The experiments were carried out at different times (ranging from 0 to 48 h) after MNU treatment or 24 h after LPS treatment. Expression of α-tubulin is shown as a loading control. Results are from one representative experiment. Densitometries are shown in parallel and represents the average of three separate experiments ±SEM. (\*)  $P < 0.05$ ; (\*\*)  $P < 0.02$ ; (\*\*\* )  $P < 0.01$ ; (\*\*\*\*)  $P < 0.001$ .



**Fig. 2.** A, B: NO<sub>2</sub>-Tyr protein modification is dependent on the status of *parp-1* after MNU treatment. Expression of α-tubulin is shown as a loading control. These results are representative of three different experiments.

[Boczkowski et al., 2001]. Figure 3 shows a double confocal immunofluorescence using anti-NO<sub>2</sub>-Tyr and anti-cytochrome *c* as mitochondrial marker. These results suggest that the

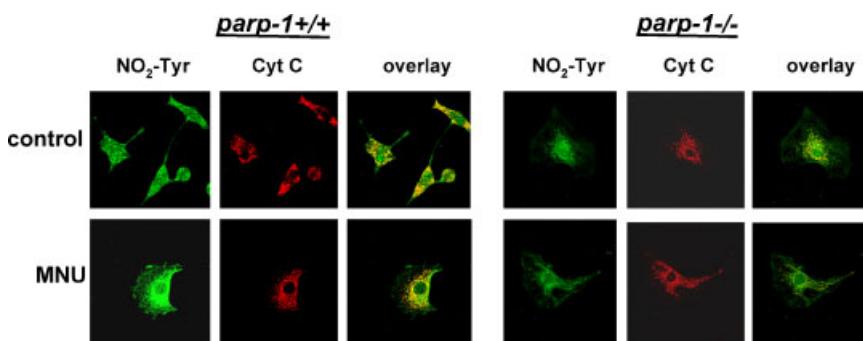
“footprint” of NO-derived oxidants is particularly high in the mitochondrial compartment and the intensity of the mitochondria-associated 3-nitrotyrosine signal is notably reduced in the absence of PARP-1 (Fig. 3).

#### MnSOD Is Modified by NO<sub>2</sub>-Tyr in Parental Cells but not in *parp-1* Single Mutant Cells

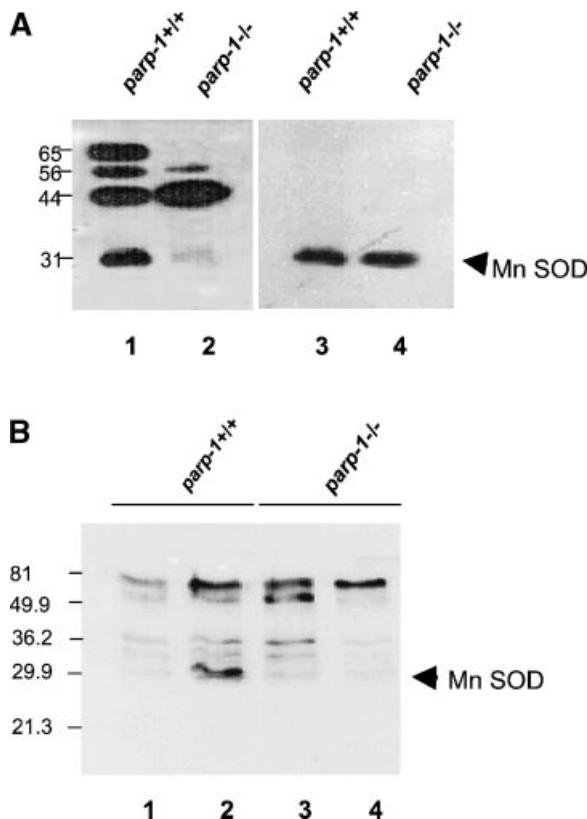
In order to identify a NO<sub>2</sub>-Tyr mitochondrial target we have focused on MnSOD that has been described as a substrate of NO-derived free radicals with critical pathological implications [Macmillan-Crow and Cruthirds, 2001]. Figure 4A shows a similar presence of MnSOD in both *parp-1*+/+ and *parp-1*-/- (lanes 3 and 4) compared with the levels of NO<sub>2</sub>-Tyr modification for both genotypes respectively (lanes 1 and 2 in Fig. 4A and Fig. 2). A clear modification of MnSOD by NO<sub>2</sub>-Tyr in parental cells but not in *parp-1* single mutant cells (Fig. 4B) has been demonstrated by immunoprecipitation. Reverse immunoprecipitation studies (IP with anti-MnSOD and revealed with anti-nitrotyrosine) confirmed the modification of MnSOD by nitrotyrosine (results not shown). These results are in agreement with those in Figure 2 showing a complete absence of the 31 kDa band in the western blot of NO<sub>2</sub>-Tyr modified proteins, thus identifying this band as MnSOD. A non related monoclonal antibody was used as control in lanes 1 and 3 of Figure 4B.

#### DISCUSSION

Increasing evidences suggest that oxidative damage to proteins and inflammation are prominent features in the development of cancer [Bentz et al., 2000; Ekmekcioglu et al., 2000].



**Fig. 3.** Confocal immunofluorescence of NO<sub>2</sub>-Tyr-modified proteins and cytochrome *c* as a mitochondrial marker in the different genotypes. The experiments were done 24 h after 0.5 mM MNU treatment and the extent of colocalisation is indicated by the merged images (yellow). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]



**Fig. 4.** MnSOD is the protein modified by NO<sub>2</sub>-Tyr corresponding to the 31 kDa band with anti-nitrotyrosine. **A:** Expression levels of MnSOD in *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> following 24 h of 0.5 mM MNU treatment. For better comparison the expression of NO<sub>2</sub>-Tyr-modified proteins in the same cells has been included in parallel (**lanes 1 and 2**). **B:** Immunoprecipitation of cell extracts (treated with 0.5 mM MNU) with an antibody against nitrotyrosine and revealed with anti-MnSOD. **Lanes 2 and 4** correspond to *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> respectively immunoprecipitated with anti-nitrotyrosine and an irrelevant monoclonal antibody (against p53) was used as control in **lanes 1 and 3**.

Establishing the source of oxidants is key to understanding the pathogenesis of tumors. Our results in this study demonstrate that: (1) treatment with a DNA damaging agent up-regulates iNOS protein expression in 3T3 cells; (2) this increased iNOS expression parallels with the accumulation of 3-nitrotyrosine modified proteins; (3) both the accumulation and the number of nitrated proteins following MNU treatment depend largely on the status of PARP-1. These data as a whole suggest that the magnitude of cellular injury induced by DNA damage is connected with the NO-dependent pathway of oxidative stress and conversely, the functional status of a key components of the cell's genome surveillance machinery (such as PARP-1) influences the extent of NO-derived oxidative

damage, in such a way that the absence of PARP-1 represents a benefit in order to avoid cellular damage. The nature of the mechanism bridging PARP-1 with NO-derived oxidative damage is not clear yet. There are a number of studies where pharmacological inhibition or genetic deletion of PARP-1 results in a diminished inflammatory response and reduced nitrogen-derived oxidative species (reviewed in [Shall and de Murcia, 2000]). Different mechanisms have been proposed to explain that PARP-1 inactivation improve the outcome of a variety of pathophysiological conditions associated with an exacerbated tissue damage or systemic inflammation in the animal [Szabo and Dawson, 1998]. The most extended model implicates PARP-1 in the following pathway: after an oxidative stress (as MNU treatment induces in our model), different cells activate a massive synthesis of NO, which is in turn converted into a cytotoxic derivative, peroxynitrite. Rapid DNA single-stranded breaks are induced by peroxynitrite, leading to over-activation of PARP-1 and depletion of cellular energy resulting in mitochondrial free radical generation and cell necrosis [Szabo et al., 1997]. On the other hand, PARP-1 may promote cell injury through its effects on NF-κB activation that results in massive iNOS induction during inflammation [Oliver et al., 1999; Conde et al., 2001]. One or both of these mechanisms might also explain the resistance of *parp-1*<sup>-/-</sup> mice to brain ischemia, where synthesis of NO by different isoforms of NOS, TNF-α upregulation and NF-κB activation play a crucial role [Iadecola et al., 1995; Barone et al., 1997; Schneider et al., 1999].

Peroxynitrite is known to initiate oxidative modification of proteins and the evidence for the in vivo formation of peroxynitrite has been derived from immunohistochemical detection of 3-nitrotyrosine in different human tissues. Protein modification by 3-nitrotyrosine is increased in different pathologies and is used as a marker of cellular injury. So far several proteins have been identified to become nitrated both in vivo and in vitro including MnSOD [van der Loo et al., 2000]. Our data show a pattern of protein nitration, corresponding approximately to molecular weights 65, 56, 44, and 31 kDa in *parp-1*<sup>+/+</sup> cells; the only modified bands in *parp-1*<sup>-/-</sup> are the 44 kDa, constitutively modified, and the 56 kDa, with a very faint appearance. In our study, the identity of one of

the nitrated proteins (MnSOD) has been determined by co-immunoprecipitation.

Mammalian mitochondria are one of the most important targets of the cytotoxicity of peroxynitrite. A mechanism for peroxynitrite-mediated dysfunction of mitochondria has been proposed as follows. When mitochondria are exposed to NO, NO diffuses easily through the membranes and reversibly inhibits cytochrome oxidase. This inhibition causes inactivation of the mitochondrial respiratory chain and as a consequence increases mitochondrial O<sub>2</sub><sup>-</sup> formation leading to peroxynitrite formation [Cassina and Radi, 1996; Hsu et al., 1996]. Peroxynitrite then irreversibly inhibits complexes I and II in the mitochondrial respiratory chain [Hsu et al., 1996]. Mitochondrial MnSOD has a function to eliminate O<sub>2</sub><sup>-</sup> from the mitochondrial matrix space and to scavenge ROS. Different groups have shown that nitration and inhibition of this enzyme is linked to increased rates of production of peroxynitrite [Szabo and Dawson, 1998]. In our study we have identified the 31 kDa band of NO<sub>2</sub>-Tyr modified proteins as MnSOD and, more importantly, we have shown that PARP-1 single deficient cells lack this modification.

Nonetheless, the physiological implications of the absence of MnSOD nitration in these cells remain to be elucidated. The mechanism by which PARP-1 single mutant cells are less sensitive to peroxynitrite-induced mitochondrial dysfunction (as shown in Fig. 3 by the decreased coincident (yellow) immunofluorescence signal) is probably related with the higher efficacy of these cells and knockout mice to cope with oxidative damage during inflammation and ischemia-reperfusion injury acting together with the inhibition of NAD<sup>+</sup> depletion [Szabo and Dawson, 1998] and by the inhibition NF-κB dependent acute inflammatory response [Oliver et al., 1999].

In conclusion, the data presented here, as a whole, demonstrate that PARP-1 is involved in the regulation of the NO-induced oxidative stress leading to protein modification by nitration, and indirectly in the cell injury derived from the activation of this pathway by a DNA damaging agent. This finding might help to improve current therapeutic strategies based in chemotherapy trying to minimize adverse inflammatory and cell injury responses of tumors using proper PARP-1 inhibitors [Szabo et al., 1998]. In any case, all the approaches which aim

to eliminate *parp-1* or PARP-1 activity from the cell or the organism should take into account that this enzyme is involved in genomic surveillance, and its long term inhibition might lead to the accumulation of DNA damage, mutations and oncogenic transformation.

## ACKNOWLEDGMENTS

We first want to thank Ana Cañuelo for excellent technical assistance. MTV, JAMG, and DMO were supported by Fellowships from Fondo de Investigaciones Sanitarias.

## REFERENCES

- Alonso D, Serrano J, Rodriguez I, Ruiz-Cabello J, Fernandez AP, Encinas JM, Castro-Blanco S, Bentura ML, Santacana M, Richard A, Fernandez-Vizarra P, Uttenthal LO, Rodrigo J. 2002. Effects of oxygen and glucose deprivation on the expression and distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthases and on protein nitration in rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 443:183–200.
- Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ. 1997. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 28:1233–1244.
- Beal MF. 2002. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 32:797–803.
- Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. 1993. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364:584.
- Bentz BG, Haines GK 3rd, Radosevich JA. 2000. Increased protein nitrosylation in head and neck squamous cell carcinogenesis. *Head Neck* 22:64–70.
- Boczkowski J, Lisdero CL, Lanone S, Carreras MC, Aubier M, Poderoso JJ. 2001. Peroxynitrite-mediated mitochondrial dysfunction. *Biol Signals Recept* 10:66–80.
- Cassina A, Radi R. 1996. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 328:309–316.
- Conde C, Mark M, Oliver FJ, Huber A, de Murcia G, Menissier-de Murcia J. 2001. Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. *EMBO J* 20:3535–3543.
- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. 1999. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342(Pt 2):249–268.
- de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walzinger C, Chambon P, de Murcia G. 1997. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7303–7307.
- Ekmekcioglu S, Ellerhorst J, Smid CM, Prieto VG, Munsell M, Buzaid AC, Grimm EA. 2000. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival. *Clin Cancer Res* 6:4768–4775.
- Grisham MB, Jourd'Heuil D, Wink DA. 1999. Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: Implications in inflammation. *Am J Physiol* 276:G315–G321.

- Hassa PO, Buerki C, Lombardi C, Imhof R, Hottiger MO. 2003. Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. *J Biol Chem* 278: 45145–45153.
- Hsu JL, Hsieh Y, Tu C, O'Connor D, Nick HS, Silverman DN. 1996. Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase. *J Biol Chem* 271:17687–17691.
- Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME. 1995. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:378–384.
- Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL. 2001. Invited review: Manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res* 34:325–336.
- Martin-Oliva D, O'Valle F, Munoz-Gamez JA, Valenzuela MT, Nunez MI, Aguilar M, Almodovar JR, Moral RG, Oliver FJ. 2004. Crosstalk between PARP-1 and NF-kappaB modulates the promotion of skin neoplasia. *Oncogene* 23:5275–5283.
- Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, de Murcia G. 1998. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* 18:3563–3571.
- Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, Muller S, de la Rubia G, Stoclet JC, de Murcia G. 1999. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J* 18: 4446–4454.
- Samper E, Goytisolo FA, Menissier-de Murcia J, Gonzalez-Suarez E, Cigudosa JC, de Murcia G, Blasco MA. 2001. Normal telomere length and chromosomal end capping in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice and primary cells despite increased chromosomal instability. *J Cell Biol* 154:49–60.
- Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T, Schwaninger M. 1999. NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nat Med* 5:554–559.
- Shall S, de Murcia G. 2000. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: What have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 460:1–15.
- Szabo C, Dawson VL. 1998. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 19:287–298.
- Szabo C, O'Connor M, Salzman AL. 1997. Endogenously produced peroxynitrite induces the oxidation of mitochondrial and nuclear proteins in immunostimulated macrophages. *FEBS Lett* 409:147–150.
- van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, Bachschmid M, Kilo J, Powell JM, Palacios-Callender M, Erusalimsky JD, Quaschning T, Malinski T, Gygi D, Ullrich V, Luscher TF. 2000. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med* 192:1731–1744.

## Research article

Open Access

# Early and late skin reactions to radiotherapy for breast cancer and their correlation with radiation-induced DNA damage in lymphocytes

Escarlata López<sup>1</sup>, Rosario Guerrero<sup>1</sup>, María Isabel Núñez<sup>2</sup>, Rosario del Moral<sup>1</sup>, Mercedes Villalobos<sup>2</sup>, Joaquina Martínez-Galán<sup>1</sup>, María Teresa Valenzuela<sup>2</sup>, José Antonio Muñoz-Gámez<sup>2</sup>, Francisco Javier Oliver<sup>3</sup>, David Martín-Oliva<sup>2</sup> and José Mariano Ruiz de Almodóvar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Oncología Radioterápica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain

<sup>2</sup>Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Centro de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Radiología y Medicina Física, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain

<sup>3</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina 'López Neyra' CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Granada, Spain

Corresponding author: José Mariano Ruiz de Almodóvar, jmrdr@ugr.es

Received: 31 Jan 2005 | Revisions requested: 5 May 2005 | Revisions received: 20 May 2005 | Accepted: 29 May 2005 | Published: 1 Jul 2005

Breast Cancer Research 2005, 7:R690-R698 (DOI 10.1186/bcr1277)

This article is online at: <http://breast-cancer-research.com/content/7/5/R690>

© 2005 López et al.; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## Abstract

**Introduction** Radiotherapy outcomes might be further improved by a greater understanding of the individual variations in normal tissue reactions that determine tolerance. Most published studies on radiation toxicity have been performed retrospectively. Our prospective study was launched in 1996 to measure the *in vitro* radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes before treatment with radical radiotherapy in patients with breast cancer, and to assess the early and the late radiation skin side effects in the same group of patients. We prospectively recruited consecutive breast cancer patients receiving radiation therapy after breast surgery. To evaluate whether early and late side effects of radiotherapy can be predicted by the assay, a study was conducted of the association between the results of *in vitro* radiosensitivity tests and acute and late adverse radiation effects.

**Methods** Intrinsic molecular radiosensitivity was measured by using an initial radiation-induced DNA damage assay on lymphocytes obtained from breast cancer patients before radiotherapy. Acute reactions were assessed in 108 of these patients on the last treatment day. Late morbidity was assessed

after 7 years of follow-up in some of these patients. The Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) morbidity score system was used for both assessments.

**Results** Radiosensitivity values obtained using the *in vitro* test showed no relation with the acute or late adverse skin reactions observed. There was no evidence of a relation between acute and late normal tissue reactions assessed in the same patients. A positive relation was found between the treatment volume and both early and late side effects.

**Conclusion** After radiation treatment, a number of cells containing major changes can have a long survival and disappear very slowly, becoming a chronic focus of immunological system stimulation. This stimulation can produce, in a stochastic manner, late radiation-related adverse effects of varying severity. Further research is warranted to identify the major determinants of normal tissue radiation response to make it possible to individualize treatments and improve the outcome of radiotherapy in cancer patients.

## Introduction

Ionizing radiation is widely and successfully applied in oncology. However, because of dose restrictions, a definitive cure cannot be achieved for many tumour entities and localizations. Despite the advanced radiotherapy facilities available, high doses of radiation still induce early and late skin effects. Unacceptable normal tissue reactions remain the limiting factor for

delivering a tumoricidal dose in radiotherapy. Radiation is an unusual toxic agent in that the timing of tissue damage expression can vary widely between one tissue or tumour and another [1]. On the other hand, recent large-scale trials of adjuvant radiotherapy for breast cancer showed that the overall survival benefit of radiotherapy can be considered an inherent characteristic of the treatment and is not influenced by the

duration of follow-up [2]. Data in the literature strongly support a causal relation between better outcomes and improved radiotherapeutic techniques [3]. Changes in radiotherapy practice over the years include recognition of the importance of fraction size, fraction number, total dose, overall time for both tumour and normal tissue reactions, and the introduction of conservative therapy.

Radiotherapy outcomes might be further improved by a greater understanding of the individual variations in normal tissue reactions that determine tolerance [4]. When accurate genetic-based or cell-survival-based predictive assays are available to study tumour and normal tissue radiosensitivity, radiation therapy will become an exact science [5], allowing truly individual optimization and the prediction of adverse reactions [6]. It is of great importance to identify the variations in intrinsic (cellular) radiosensitivity and extrinsic factors that are associated with a change in the risk of morbidity. It has yet to be determined whether intrinsic cell radiosensitivity or extrinsic factors have greater influence on individual differences in damage expression [7-10]. The very high incidence of breast cancer in Western countries, partially attributable to the ageing of their populations, and the increasing use of conservative surgery and postoperative radiotherapy for its treatment make the above type of study of special interest, with the side effects of radiotherapy an increasingly important issue. Indeed, after the sweeping changes in the locoregional treatment of breast cancer during the last part of the 20th century, it appears that only a dwindling minority of patients will undergo mastectomy, at least in urban areas with a high socioeconomic level [11]. The widely varied biological characteristics of patients with breast cancer, evidenced in clinical, pathological, cellular, and molecular studies, are sufficient to explain the diversity of treatments recommended over the past two decades [12]. Recent years have seen the introduction of changes from conventional radiotherapy at  $5 \times 1.8$  to  $2.0$  Gy per week to more aggressive schedules such as unconventional protocols [13] or radiochemotherapy [11]. The gradually increasing success of cancer treatments has led to longer patient survival. This also carries with it the penalty of providing a greater opportunity for late effects to appear, increasing in severity [14] and affecting the patient's quality of life [15].

With regard to radiotherapy complications, the known factors influencing normal tissue responses account for only 30% of interpatient variability in breast cancer patients under well-controlled conditions, leading to the hypothesis that most of the variability in the severity of these complications is due to differences in cellular radiosensitivity determined by genetic or epigenetic mechanisms [7,10]. Identification of the causes of this variability in radiation sensitivity could have important implications for cancer therapy. Evidence of a possible genetic basis for these differences has been provided by reports of increased cellular and tissue radiosensitivity in certain genetic syndromes [16] and of an association among the relative radi-

osensitivities of different normal cell types in the same individual [17]; this evidence also verifies that cellular radiosensitivity may be related to tissue response. Current radiobiological research efforts are aimed at identifying patients with abnormal radiosensitivity at risk for acute and late adverse effects of radiotherapy treatment [18,19] and detecting molecules that increase the antitumour effects of radiotherapy [20].

Most published studies on radiation toxicity were performed retrospectively. This prospective study was launched in 1996 to measure the *in vitro* radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes before treatment with radical radiotherapy in patients with breast cancer, and to assess the early and the late side effects of radiation on skin in the same group of patients. We prospectively recruited consecutive breast cancer patients receiving radiation therapy after breast surgery. To evaluate whether early and late side effects of radiotherapy can be predicted by the assay, a study was conducted of the association between the results of *in vitro* radiosensitivity tests and acute and late adverse effects of radiation.

## Materials and methods

### Patients

The data analysed in this study were derived from 108 consecutive breast cancer patients who received radiotherapy and were followed up for 7 years within our departmental program for the predictive testing of the radiosensitivity of normal tissue. The investigation was approved by the local ethics committee, and written, informed consent was obtained from all patients. Patient recruitment started in March 1996. Late adverse skin effects were measured between December 2003 and June 2004. The study design and patient and treatment characteristics have been published previously [9].

The patients were treated with postoperative radiation therapy after mastectomy (54 patients) or with breast-conserving therapy using a standardized  $^{60}\text{Co}$  technique (54 patients). The dose delivered was 50 Gy over a period of 5 weeks, in daily fractions of 2 Gy (25 fractions at 5 per week). External radiation was delivered by the cobalt unit in almost all of the patients (98%), and only 2% received irradiation from a Linac 6-MV x-ray linear accelerator. The whole breast or chest wall was irradiated by two parallel, opposed tangential fields, with wedges used to correct dose inhomogeneities. The dose was prescribed at the ICRU (International Commission on Radiation Units and Measurements) point at the midline of the central axis. Dose homogeneity was more than 85% in the majority of the cases. Patient treatments were planned using computed tomography images and a conventional simulator. To administer regional nodal radiation, we used a direct anterior field to irradiate internal mammary nodes. Supraclavicular and axillary lymph node areas were treated by irradiation of the axillary-supraclavicular field and the posterior axillary field. The total dose was calculated at 3 cm in the supraclavicular area and at the midplane in the axilla. The conservatively treated

**Table 1****Scoring system used to document cutaneous and subcutaneous reactions in breast cancer patients receiving radiotherapy**

Grade	Early reactions <sup>a</sup>	Late reactions <sup>b</sup>
Grade 0 – Highly radioresistant patients	No toxicity observed: no erythema, desquamation, or pain	Absence of differences between irradiated and nonirradiated skin
Grade 1 – Moderately radioresistant patients	Faint, dull, or bright erythema, psoriasis, dry desquamation, mild oedema	Minimal telangiectasia, slight breast asymmetry, mild hyperpigmentation
Grade 2 – Patients with average radiosensitivity	Severe erythema, at least one moist desquamation of small size, moderate oedema	Marked telangiectasia, moderate hyperpigmentation, increased density and palpable firmness, mild oedema
Grade 3 – Moderately radiosensitive patients	Severe or confluent moist desquamation	Partially confluent telangiectasia, severe hyperpigmentation, severe oedema, subcutaneous fibrosis with fixation
Grade 4 – Highly radiosensitive patients	Ulceration, haemorrhage	Totally confluent telangiectasia, very marked density, retraction and fixation. Major aesthetic sequelae in treated breast

<sup>a</sup>Morbidity assessed at the end of radiotherapy treatment. <sup>b</sup>Morbidity assessed at end of 7-year follow-up period

patients also received a tumour bed boost of 16 to 25 Gy using an iridium implant (<sup>192</sup>Ir), always 15 days after external radiotherapy or electron beam therapy. The <sup>192</sup>Ir implants were done in accordance with the rules of the Paris System of Dosimetry. The dose was calculated at the reference isodose, defined as 85% of the basal dose calculated in the central plane of application. The total dose delivered by 9-to 12-MeV electron beams was 16 Gy at 2 Gy per fraction. The dose was prescribed to the 90% isodose line. A bolus was sometimes used to optimize the homogeneity of dose distribution.

All medical records of these 108 patients were available and were reviewed. Patient files included details of surgery, clinical-pathological stage, adjuvant treatment, and the subsequent follow-up. The records also included full details of the radiotherapy treatment, and a photograph of the irradiated field was always made on the last treatment day to record the intensity of the acute radiation-induced injury on the skin of each patient.

#### Definitions of descriptive terms for skin reactions

The severity of skin reactions was assessed by means of a simple scale (Table 1), using scores based on the absolute side-effect scale proposed by the Radiation Therapy Oncology Group/European Organization for Research and Treatment of Cancer [9], adapted here to the nomenclature proposed by Burnet and colleagues [4] in order to facilitate communication among groups studying normal tissue radiosensitivity. The term 'normal range' refers herein to the range of normal tissue reactions observed in typical radiotherapeutic clinics that treat large numbers of patients without genetic syndromes. All of the skin reactions observed in our study fell within the normal range, and no over-reactors were found.

#### Radiosensitivity assay

Initial radiation-induced DNA damage in peripheral blood lymphocytes was measured as described elsewhere [17,18] and was considered an indicator of the molecular radiosensitivity

of the normal cells studied. Early and late skin side effects were assessed as mentioned above.

#### Early side-effect data

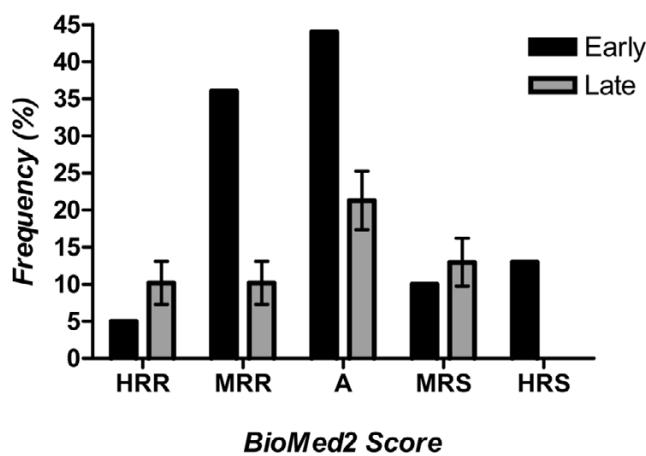
The unit of analysis was a group of 108 patients treated with radiotherapy for curative purposes after breast surgery. The most frequent acute complications found were erythema (91.7%), dry desquamation (29.6%), and moist desquamation (35.2%). According to the score system summarized in Table 1, approximately 13% of patients were classified as highly radiosensitive. Early side effects on the skin might be considered an indicator of clinical radiation sensitivity, and their intensity, score, and distribution have been previously described [9].

#### Late side-effect data

Although a significant proportion of the variation in response of normal tissues could be attributed to treatment-related factors, our results showed that dose effects were not sufficient to explain the differences between patients in their skin response (data not shown). Our team previously reported an adequate correlation between scoring of radiation-induced acute skin effects by direct observation and scoring after examination of photographic images, supporting the accuracy of the direct observation of lesions of normal tissue. Therefore, this direct-observation method was used for the assessment of late normal tissue changes in the 60 patients studied, as follows: on the day programmed for the late follow-up, a single physician (EL) generated a report based on direct clinical observation of the whole treated skin, scoring the degree of reaction on the scale used (Table 1, Fig. 1).

#### Comparison of *in vitro* and *in vivo* results

A two-sided Student's *t*-test was used to compare mean values of initial radiation-induced DNA damage between the patient groups. Contingency tables and the  $\chi^2$  test were used to assess any relation between early and late effects.

**Figure 1**

### **BioMed2 Score**

Frequency distribution of skin reactions in women with breast cancer treated postoperatively with radiotherapy. Reactions were classified as early (if observed at the end of the radiotherapy, 108 women) or late (if observed at the 7-year follow-up, 60 women). X-axis Radiation Therapy Oncology Group scoring system modified using the terminology proposed by Burnet (4): A, average; HRR, highly radioresistant; HRS, highly radiosensitive; MRR, moderately radioresistant; MRS, moderately radiosensitive.

The relations between *in vivo* and *in vitro* results were studied using a nonparametric regression test, and Spearman's  $\rho$  correlation coefficient was calculated. The Statistical Package for Social Sciences (SPSS 11.5) was used for all data processing. Graphics and basic biostatistics were obtained using Graphpad (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

## **Results**

### **Radiosensitivity test**

Initial radiation-induced DNA damage was determined in lymphocytes from 108 breast cancer patients after  $\gamma$ -irradiation. The parameter selected was the estimated number of db per Gy and per DNA unit [21]. It should be noted that the results obtained from the reference sample of patients included in this paper matched the results obtained in lymphocytes from other breast cancer patients analysed at our laboratory in ongoing studies. [6]. The mean value  $\pm$  the standard error of the mean was  $1.83 \pm 0.18$  double-strand breaks per Gy.

### **Early radiation-induced injury**

Assessment of clinical radiation sensitivity was based on the acute skin reactions to the radiotherapy measured [9] on the last day of treatment. Five patients (4.6%) with no adverse side effects were classified as highly radioresistant; 36 (33.3%), 44 (40.7%), and 10 patients (9.3%) with mild to moderate skin reactions were classified as, respectively, moderately radioresistant, average, and moderately radiosensitive; and 13 patients (12%) with pronounced signs of radiation acute sensitivity were considered highly radiosensitive (Fig. 1). The correspondence between the descriptive terms and the radiation sensitivity data is summarized in Table 1. Acute effects on the

skin included in the treatment field, such as erythema or desquamation, normally resolve rapidly in most patients. Individual variation in the level of normal tissue response could be theoretically interpreted by the classical sigmoid dose-response curve. Comparison of collateral effects between the surgical treatment subgroups (mastectomy versus breast-conserving therapy) showed that radiation-induced acute toxicity on the skin of the breast cancer patients has the same frequency and intensity regardless of the surgical approach, even when the use of concurrent chemotherapy was taken into consideration [9].

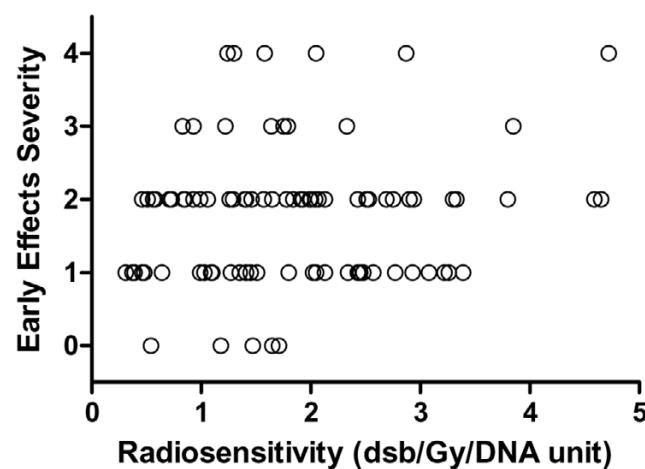
### **Overall survival and actuarial probabilities of normal tissue sequelae**

Data of survival and late morbidity records were obtained for 87 patients who had undergone radiotherapy treatment for  $>7$  years, of whom 51 were free of cancer disease; 9 were living with disease, 22 had died, and 5 who had received reconstructive surgery were not assessed. A total of 21 patients were missing from the follow-up. Seven years after treatment, the actuarial overall survival of the whole series of breast cancer patients was  $48.84 \pm 7.62\%$  (mean  $\pm$  standard error of the mean).

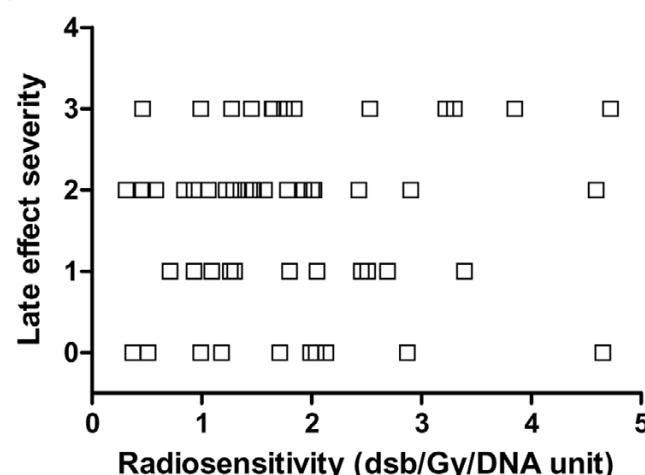
The actuarial probabilities of late radiation side effects, expressed as percentages  $\pm$  standard errors of the mean, were  $10.19 \pm 2.91$  for highly radioresistant;  $10.19 \pm 2.91$  for moderately radioresistant,  $21.30 \pm 3.94$  for average,  $12.96 \pm 3.23$  for moderately radiosensitive, and 0.0 for highly radiosensitive. Fig. 1 depicts the distribution of the frequency of acute and late effects according to the severity. The distributions of the severity of early and late effects differed. Statistical comparison between early and late collateral effects in the same group of patients gave a  $\chi^2$  value of 22.38 ( $P = 0.0002$ ), demonstrating a very different distribution frequency between radiation-induced acute toxicity and radiation-related late morbidity.

### **Correlation between radiobiological test and early radiation skin side effects**

The distribution of early normal tissue reactions observed in this study could be considered approximately normal in shape (Fig. 1). The distribution of the lymphocyte radiosensitivity measured *in vitro* could also be considered approximately Gaussian [6,18]. This similarity prompted us to examine whether the same relation could be found between the number of initial radiation-induced DNA double-strand breaks and the severity of acute adverse skin effects. No relation was found (Fig. 2) between the molecular radiosensitivity values in lymphocytes and the early normal tissue reactions observed *in vivo* (Spearman  $p = 0.076$ ; 95% confidence interval, -0.149 to 0.293; two-tailed  $P = 0.497$ ).

**Figure 2**

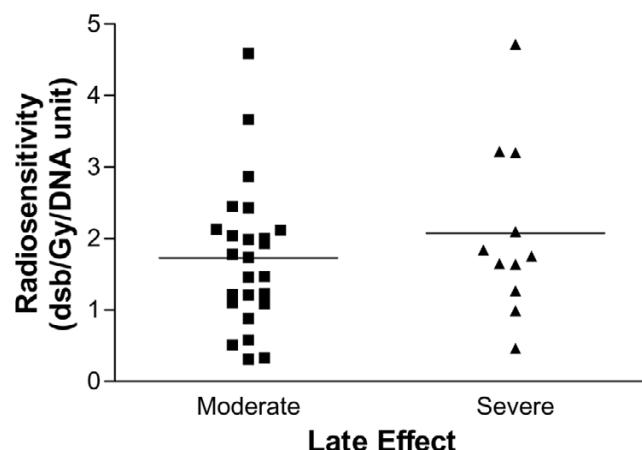
Relation between severity of early radiotherapy-induced skin morbidity and lymphocyte molecular radiosensitivity. Skin morbidity in 108 women was assessed on the treated skin using the scoring system summarized in Table 1. Lymphocyte molecular radiosensitivity was measured as DNA double-strand breaks (dsb) by dose unit (Gy) and DNA unit (200 Mbp). bp, base pairs.

**Figure 3**

Relation between severity of late radiotherapy-induced skin morbidity and lymphocyte molecular radiosensitivity. Skin morbidity in 60 women was assessed on the treated skin using the scoring system summarized in Table 1. Lymphocyte molecular radiosensitivity was measured as DNA double-strand breaks (dsb) by dose unit (Gy) and DNA unit (200 Mbp). bp, base pairs.

#### Correlation between radiobiological test and late radiation skin side effects

The distribution of late adverse effects observed in these patients does not appear to fit a Gaussian distribution (Fig. 1), and no statistical relation was found between the radiosensitivity test results and the late effects assessed (Fig. 3). No significant relation was found between the *in vitro* assay results and the severity of late side effects (Spearman  $p = 0.063$ ;

**Figure 4**

Scatter-plot of quantified late skin reactions of patients and the corresponding *in vitro* radiosensitivity values. Horizontal solid lines are the mean values for each group of patients with breast cancer. Moderate ( $n = 38$ ), women with reactions scored as highly or moderately radioresistant or as having an average response; severe ( $n = 12$ ), patients with reactions scored as highly radiosensitive.

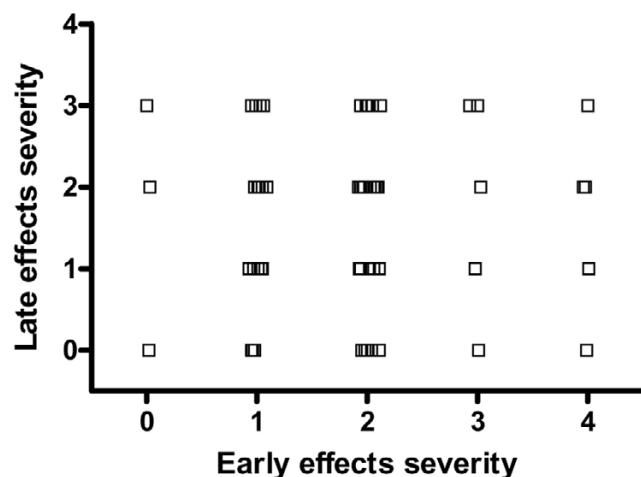
95% confidence interval, -0.219 to 0.335; two-tailed  $P = 0.655$ ). Considering the patients with tolerable late effects (highly or moderately radioresistant or with average radiosensitivity) separately from those with more severe effects (moderately or highly radiosensitive) in a scatter plot, it appears (Fig. 4) that the molecular radiosensitivity assay did not distinguish patients at different levels of risk of developing more severe late skin reactions after radiotherapy treatment.

#### Correlation between early and late skin effects

The data on the severity of early and late adverse effects after radiotherapy for breast cancer showed no relation between these toxic effects (Fig. 5). According to our results, acute and late radiation-related morbidities are independent adverse effects, (Spearman  $p = 0.032$ ; 95% confidence interval, -0.233 to 0.293; two-tailed  $P = 0.809$ ).

#### Correlation between early and late effects and treatment volume

It has classically been reported that patient skin tolerance may be lower with larger breast size. In the present study, this relation was studied in a group of patients treated with breast-conserving surgery, estimating the breast volume from the bra size. When acute adverse effects were considered in 47 patients, a positive relation was found (Spearman  $p = 0.497$ ; 95% confidence interval, 0.236 to 0.691; two-tailed  $P < 0.001$ ) (Fig. 6). However, the relation was weaker when late side effects were considered (Spearman  $p = 0.423$ ; 95% confidence interval, 0.070 to 0.682; two-tailed  $P = 0.018$ ), perhaps because of the smaller number of cases ( $n = 31$ ) analysed (Fig. 7).

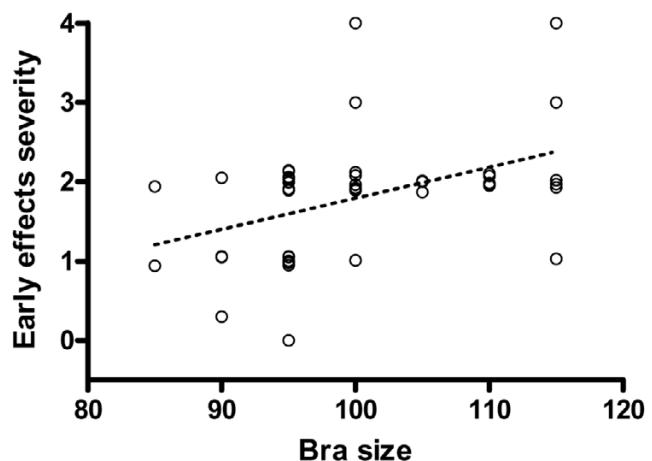
**Figure 5**

Relation between the severity of early and late side effects of radiotherapy for breast cancer. Women with breast cancer ( $n = 60$ ) were treated postoperatively with radiotherapy and assessed using the scoring system summarized in Table 1.

## Discussion

In this study, early and late complications in normal tissue were assessed at an arbitrary single point. In this situation, a relative scale of normal tissue reactions, such as the score system proposed by Burnet [4], has a number of advantages over an absolute one. The main objectives of our study were to identify patients with extreme reactions within the normal range and to compare the results of an *in vitro* radiosensitivity test with the severity of acute and late reactions in the same patients. By using this relative scale, we were able to meet these objectives. The concept of the predictive testing of normal tissue reactions in order to individualize radiotherapy prescriptions is founded on a hypothetical relation between the radiosensitivity of cells and that of normal tissue. Although we are inclined to support this hypothesis, the test applied in the present study, based on the initial radiation-induced DNA damage, proved inadequate for use in the individualization of radiotherapy therapy.

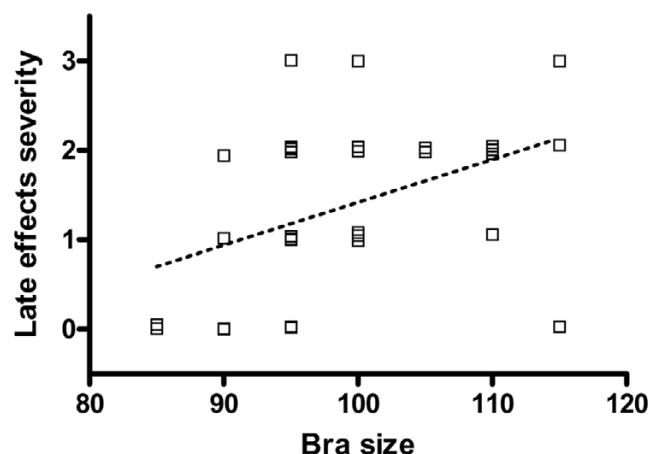
Early effects such as erythema and desquamation usually appear during or immediately after radiotherapy therapy, whereas late effects develop some years afterwards. The acute side effects resolve rapidly without treatment [11]. However, in a substantial group of patients, radiation-induced fibrosis, telangiectasia, and skin pigmentation disorders appear at different times after radiotherapy. Generally, the course of radiation sequelae follows a distinct clinical pattern. An erythematous rash can develop on the skin of treated patients within a few hours of exposure and can persist or slowly worsen until the end of radiotherapy treatment. This situation is transient in nature. In severe cases, subepidermal blisters and ulcers may develop. Most of the injuries heal, although the expression of radiation-induced effects can reappear

**Figure 6**

Relation between estimated irradiation volumes and severity of early effects of radiotherapy for breast cancer. Irradiation volumes were estimated from the women's bra size, and the severity of the early effects were scored in the same women ( $n = 50$ ). Dotted line shows the corresponding regression line ( $P < 0.001$ ).

pear in some individuals after a latency period. Late damage becomes more severe, progresses with time, and usually cannot be halted or reversed [22]. The inability to predict the length of the latency period creates a major problem for the management of these patients. A better understanding of individual variations in normal tissue reactions, which determine tolerance, may allow the individualization of radiotherapeutic prescriptions and improve outcomes. The lag time to the onset of initial late effects might be expected to yield information on the mechanisms underlying the development of late radiation sequelae. Extreme side effects of radiotherapy, including an increased cancer risk after radiation, were observed in patients with inherited disorders such as ataxia-telangiectasia and Nijmegen syndrome [16]. According to the present results, there appears to be no mechanistic relation between the early and late adverse effects of radiation treatment. We speculate that these differences may arise because the healing of acute injuries is a deterministic process whereas late side effects may be stochastic phenomena.

Unconventional, more aggressive irradiation protocols are usually associated with an aggravation of acute reactions that might be related to more severe late effects. Therefore, amelioration of the acute response to radiation has been proposed as a useful approach to minimize late side effects of effective radiation therapy. This proposal assumes a relation between acute and late effects via a non-healing acute response component that directly progresses to a late effect [23]. However, the present results do not support the hypothesis that late effects in normal tissue can be predicted from the acute reactions observed in the same patients.

**Figure 7**

Relation between estimated irradiation volumes and severity of late effects of radiotherapy for breast cancer. Irradiation volumes were estimated from the women's bra size, and the late effects were scored in the same women ( $n = 33$ ). Dotted line shows the corresponding regression line ( $P = 0.018$ ).

It also proved impossible in the present study to predict acute or late effects from the results of an *in vitro* assay to measure initial radiation-induced DNA damage. Until recently, it has been generally accepted that the genotoxic consequences of radiation exposure derive from the damage inflicted directly by radiation, producing irreversible changes during DNA replication or cell division or during the processing of DNA damage by enzymatic repair processes [24]. However, there is now considerable evidence that cells that are the progeny of exposed cells but that are not themselves exposed may divide, express delayed gene mutations, and carry chromosomal aberrations. This effect, known as radiation-induced genomic instability, may be expressed via delayed lethal mutations [25], causing prolonged perturbation of tissue volume within the radiation field [26]. Although the mechanisms of those delayed effects of ionizing radiation are unclear, excessive production of reactive oxygen species has been implicated [27]. Recent experiments showed that macrophage activation and neutrophil infiltration are consequences of the recognition and clearance of radiation-induced apoptotic cells and that increased phagocytic cell activity persists after removal of apoptotic bodies. It was demonstrated, contrary to expectations, that the recognition and clearance of apoptotic cells after exposure to radiation produces persistent macrophage activation and a genotype-dependent inflammatory-type response [28]. These phenomena and radiation-induced genetic changes may be important determinants of the longer-term consequences of radiation exposure [28]. Moreover, new evidence suggests that cytokine-mediated multicellular interactions initiate and sustain the fibrogenic process [29,30] that is a long-term effect of radiotherapy.

Initial DNA damage and post-radiation cell survival after radiation have been directly related in *in vitro* experiments [31]. The present findings indicated that the level of radiation-induced DNA damage in normal cells was not a major determinant of the severity of early skin injury. Moreover, no relation was found between the acute injuries and the late sequelae that, after an undetermined latency period, became a burden, lessening the quality of life of these patients [32].

However, a significant correlation has been demonstrated, using new methodologies, between five single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and the risk of radiation-induced normal tissue reactions in a small group of breast cancer patients [33]. In fact, the completion of the human genome project and the availability of novel and powerful technologies in genomics, proteomics, and functional genomics promise to have a major impact on clinical practice. These developments are likely to change the way in which diseases will be diagnosed, treated, and monitored in the near future. Cancer, as a complex disease that affects a significant proportion of world population, has become a prime target of novel technologies, often referred to as 'omic' platforms, and it is anticipated that progress will be made towards a predictive, individualized approach to cancer care. One area of knowledge where advances are expected is on the complex variability in normal tissue radiation response, which depends on the interaction of multiple gene products. There is a growing shift from the study of single parameters of molecular or cellular radiosensitivity to the analysis of complex biological systems, and one of the main challenges we face is how best to apply the 'omic' technologies to clinically relevant samples in a well-defined clinical and pathological framework. An example of this type of venture is the European GENEPI project [34], which aims to study a large cohort of patients under highly controlled and standardized radiotherapy conditions.

## Conclusion

Our first conclusion is an experimental one. These results do not support the hypothesis that the response of normal tissue to radiation can be predicted by an *in vitro* test. This conclusion was reached by other authors [8,10], although some results in defence of this hypothesis have also been published [35,36]. A possible explanation is that *in vitro* cellular radiosensitivity tests and molecular DNA damage assays do not take account of the variable degree of cytokine response, tissue remodeling, and collagen deposition that may characterize the specific normal-tissue response of each patient [29]. The paradigm that radiotherapy effects are restricted to the direct or indirect effects of radiation-induced DNA damage is challenged by the present results, which indicate that early and late effects can also be induced by unexpected interactions between irradiated and nonirradiated cells (bystander effects). This conclusion is supported by published results that showed a clear relation between the severity of late toxicity in radiotherapy treatment and the volume of normal tissue

included in the field of treatment, although a significant correlation was found between breast size and dose inhomogeneities that may account for the marked changes in breast appearance reported in women with large breasts [37].

Our second conclusion is a theoretical one, and takes the form of a proposal to change the model adopted in radiobiological studies to date. Thus, for teaching and research purposes, 'direct action' could be defined as all physicochemical processes that occur after energy cession from the ionizing radiation to the tissues. Within this concept would be included actions produced by free radicals that result from the interaction of radiation with the water molecules – that is, the effects hitherto designated indirect radiation action on the DNA molecule. The cellular consequences of the direct action of radiation in terms of lethal and potentially lethal damage to DNA can be explained by linear-quadratic radiation cell survival models. However, these models cannot explain the late adverse effects of radiation, and a more general theory appears to be required.

A few days after the end of radiation treatment, cells within the irradiated volume can act in one of three ways: they can grow and divide, the basis for the healing of acute injuries; they can not grow but stay alive; or they may survive for a long time with important immunological changes, disappearing by apoptosis or apoptosis-like cell death very slowly and becoming a chronic focus of immunological system stimulation that could produce the late actions observed. Therefore, indirect action could be considered the whole immunological response of the body to the stress induced by radiation in the target volume. This may produce late side effects of varying severity that in a stochastic fashion, through a time-dependent probability relation, could lead to a lifelong risk of developing late complications [14,32,38]. In this relation, the volume of tissue irradiated may be a multiplicity constant of the frequency and severity of the late side effects. Patients and clinicians should be aware of these aspects of radiotherapy therapy. The study of these immunological changes is complex but could, given the human genome data now available, offer a key to improving radiotherapy outcomes in cancer patients.

Finally, our group supports the view that the risks of radiotherapy can be fully understood only after long-term follow-up studies. An important research aim is to develop a test that can predict late side effects.

### Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

EL was significantly involved in patient recruitment, patient treatment, and assessment of late normal tissue responses; contributed to the correlation of clinical data with experimental findings; and took a role in supervising the final version of article. RG and RdM were significantly involved in patient

recruitment and patient treatment and in the assessment of skin reactions. JMG participated in patient treatment. MIN, MV, and MTV carried out the *in vitro* radiosensitivity test and took a role in the discussion of results. JAMG, DMO, and FJO carried out part of the laboratory work. JMRdA conceived and designed the study, interpreted the data, and revised the paper, giving final approval of the version to be submitted. All the authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología CICYT (SAF 2001-3533) and Ministerio de Educación y Ciencia CICYT (SAF 2004-00889). DMO and JAMG were supported by fellowships (BEFI 01/9331, BEFI 02/9029) from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (ISCIII).

### References

1. Johansson S, Svensson H, Denenkamp J: **Dose response and latency for radiation induced fibrosis, edema and neuropathy in breast cancer patients.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002, **52**:1207-1219.
2. Van de Steene J, Vinh Hung V, Cutuli B, Storme G: **Adjuvant radiotherapy for breast cancer: effects of longer follow-up.** *Radiat Oncol* 2004, **72**:35-43.
3. Van de Steene J, Soete G, Storme G: **Adjuvant radiotherapy for breast cancer significantly improves overall survival: The missing link.** *Radiat Oncol* 2000, **55**:263-272.
4. Burnet NG, Johansen J, Turesson I, Nyman J, Peacock JH: **Describing patients' normal tissue reactions: concerning the possibility of individualising radiotherapy dose prescriptions based on potential predictive assays of normal tissue radiosensitivity.** *Steering Committee of the BioMed 2 European Union Concerted Action Programme on the Development of Predictive Tests of Normal Tissue Response to Radiation Therapy.* *Int J Cancer* 1998, **79**:606-613.
5. Brahme A: **Individualizing cancer treatment: biological optimization models in treatment planning and delivery.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001, **49**:327-337.
6. Guirado D, Ruiz de Almodóvar JM: **Prediction of normal tissue response and individualization of doses in radiotherapy.** *Phys Med Biol* 2003, **48**:3213-3233.
7. Turesson I, Nyman J, Holmberg E, Oden A: **Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996, **36**:1065-1075.
8. Barber JB, Burrill W, Spreadborough AR, Levine E, Warren C, Kiltie AE, Roberts SA, Scott D: **Relationship between *in vitro* chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer.** *Radiat Oncol* 2000, **55**:179-186.
9. López E, Núñez MI, Guerrero MR, del Moral R, de Dios Luna J, del mar Rodríguez MM, Valenzuela MT, Villalobos M, Ruiz de Almodóvar JM: **Breast cancer acute morbidity evaluated by different scoring systems.** *Breast Cancer Res Treat* 2002, **73**:127-134.
10. Peacock JH, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, Owen R, Regan J, Yarnold J: **Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy.** *Radiat Oncol* 2000, **55**:173-178.
11. Kurtz J: **The curative role of radiotherapy in the treatment of operable breast cancer.** *Eur J Cancer* 2002, **38**:1961-1974.
12. del Moral R, López E, Núñez MI, Oliver FJ, Valenzuela MT, Villalobos M, Ruiz de Almodóvar JM: **Interactions between radiotherapy and endocrine therapy in breast cancer.** *Endocr Relat Cancer* 2002, **9**:197-205.
13. Vicini FA, Baglan KL, Kestin LL, Mitchell C, Chen PY, Frazier RC, Edmunson G, Goldstein NS, Benitez P, Huang RR, Martinez A: **Accelerated treatment of breast cancer.** *J Clin Oncol* 2001, **19**:1993-2001.
14. Johansson S, Svensson H, Denenkamp J: **Timescale of evolution of late radiation injury after postoperative radiotherapy of**

- breast cancer patients.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000, **48**:745-750.
15. Amichetti M, Caffo O, Arcicasa M, Roncadin M, Lora D, Rigon A, Zini G, Armaroli L, Coghetto P, Zorat P, et al.: **Quality of life in patients with ductal carcinoma in situ of breast treated with conservative surgery and postoperative irradiation.** *Breast Cancer Res Treat* 1999, **54**:109-115.
  16. Gatti RA: **The inherited basis of human radiosensitivity.** *Acta Oncol* 2001, **40**:702-711.
  17. Núñez MI, Guerrero R, López E, del Moral R, Valenzuela MT, Siles E, Villalobos M, Pedraza V, Peacock JH, Ruiz de Almodóvar JM: **DNA damage and prediction of radiation response in lymphocytes and epidermal skin cells.** *Int J Cancer* 1998, **76**:354-361.
  18. Ruiz de Almodóvar JM, Guirado D, Núñez MI, López E, Guerrero R, Valenzuela MT, Villalobos M, Ruiz de Almodóvar JM: **Individualisation of radiotherapy in breast cancer patients: possible usefulness of a DNA damage assay to measure normal cell radiosensitivity.** *Radiother Oncol* 2002, **62**:327-333.
  19. Carlonagno F, Burnet NG, Turesson I, Nyman J, Peacock JH, Dunning AH, Ponder BA, Jackson SP: **Comparison of DNA repair protein expression and activities between human fibroblast cell lines with different radiosensitivities.** *Int J Cancer* 2000, **85**:845-849.
  20. Krause M, Hessel F, Szips D, Hilberg F, Baumann M: **Adjuvant inhibition of the epidermal growth factor receptor after fractionated irradiation of FaDu human squamous cell carcinoma.** *Radiother Oncol* 2004, **72**:95-101.
  21. Ruiz de Almodóvar JM, Steel GG, Whitaker SJ, McMillan TJ: **A comparison of methods for calculating DNA double-strand break induction frequency in mammalian cells by pulsed-field gel electrophoresis.** *Int J Radiat Biol* 1994, **65**:641-649.
  22. Johansson S, Svensson H, Denenkamp J: **Timescale of evolution of late radiation injury after postoperative radiotherapy of breast cancer patients.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000, **48**:745-750.
  23. Dörr W, Hendry JH: **Consequential late effects in normal tissues.** *Radiother Oncol* 2001, **61**:223-231.
  24. McMillan TJ, Tobi S, Mateos S, Lemon C: **The use of DNA double-strand break quantification in radiotherapy.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001, **49**:373-377.
  25. Gorgojo L, Little J: **Expression of lethal mutations in progeny of irradiated mammalian cells.** *Int J Radiat Biol* 1989, **55**:619-630.
  26. Azzan El, Little JB: **The radiation-induced bystander effects: evidence and significance.** *Hum Exp Toxicol* 2004, **23**:61-65.
  27. Azzan El, de Toledo SM, Little JB: **Oxidative metabolism, gap junctions and the ionizing radiation-induced bystander effect.** *Oncogene* 2003, **22**:7050-7057.
  28. Lorimore SA, Coates PJ, Scobie GE, Milne G, Wright EG: **Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: A mechanism for radiation-induced bystander effects?** *Oncogene* 2001, **20**:7085-7095.
  29. Dickson J, Magee B, Stewart A, West CM: **Relationship between residual radiation-induced DNA double strand breaks in cultured fibroblasts and late radiation reactions: a comparison of training and validation cohorts of breast cancer patients.** *Radiother Oncol* 2002, **62**:321-326.
  30. Herskind C, Johansen J, Bentzen SM, Overgaard M, Overgaard J, Bamberg M, Rodemann HP: **Fibroblast differentiation in subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy.** *Acta Oncol* 2000, **39**:383-388.
  31. Núñez MI, McMillan TJ, Valenzuela MT, Ruiz de Almodóvar JM, Pedraza V: **Relationship between DNA damage, rejoining and cell killing by radiation in mammalian cells.** *Radiother Oncol* 1996, **39**:155-165.
  32. Fehlauer F, Tribius S, Höller U, Rades D, Kuhlmeier A, Bajovic A, Alberti W: **Long-term radiation sequelae after breast conserving therapy in women with early-stage breast cancer: an observational study using the LENT-SOMA scoring system.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003, **55**:651-658.
  33. Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Overgaard J: **Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes.** *Radiother Oncol* 2003, **69**:127-135.
  34. Baumann M, Hölscher T, Begg AC: **Towards genetic prediction of radiation responses: ESTRO's GENEPI project.** *Radiother Oncol* 2003, **69**:121-125.
  35. West CM, Davidson SE, Elyan SA, Valentine H, Roberts SA, Swindell R, Hunter RD: **Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix.** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001, **51**:10-15.
  36. Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M, Kuhlmeier A, Bojovic A, Jung H, Alberti W, Dikomey E: **Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer.** *Radiother Oncol* 2003, **69**:137-144.
  37. Moody AM, Mayles WPM, Bliss JM, A'Hern PP, Owen JR, Regan J, Broad B, Yarnold JR: **The influence of breast size on late radiation effects and association with radiotherapy dose inhomogeneity.** *Radiother Oncol* 1994, **33**:106-112.
  38. Jung H, Beck-Borchert HP, Svoboda V, Alberti W, Herrmann T: **Quantification of late complications after radiation therapy.** *Radiother Oncol* 2001, **61**:233-246.

# Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Modulates Tumor-Related Gene Expression, Including Hypoxia-Inducible Factor-1 Activation, during Skin Carcinogenesis

David Martín-Oliva,<sup>1,2</sup> Rocío Aguilar-Quesada,<sup>1</sup> Francisco O'Valle,<sup>3,4</sup> Jose Antonio Muñoz-Gámez,<sup>1,4</sup> Rubén Martínez-Romero,<sup>1</sup> Raimundo García del Moral,<sup>3,4</sup> José Mariano Ruiz de Almodóvar,<sup>4</sup> Raquel Villuendas,<sup>5</sup> Miguel Angel Piris,<sup>5</sup> and F. Javier Oliver<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Parasitology and Biomedicine, Consejo Superior de Investigaciones Científicas; <sup>2</sup>Department of Cell Biology, Faculty of Sciences, <sup>3</sup>Department of Pathology, and <sup>4</sup>Investigación de Biopatología y Medicina Regenerativa, University of Granada, Granada, Spain; and <sup>5</sup>Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain

## Abstract

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1, an enzyme that catalyzes the attachment of ADP ribose to target proteins, acts as a component of enhancer/promoter regulatory complexes. In the present study, we show that pharmacologic inhibition of PARP-1 with 3,4-dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxyl]-1(2H)-isoquinolinone (DPQ) results in a strong delay in tumor formation and in a dramatic reduction in tumor size and multiplicity during 7,12-dimethylbenz(a)anthracene plus 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin carcinogenesis. This observation was parallel with a reduction in the skin inflammatory infiltrate in DPQ-treated mice and tumor vasculogenesis. Inhibition of PARP also affected activator protein-1 (AP-1) activation but not nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Using cDNA expression array analysis, a substantial difference in key tumor-related gene expression was found between chemically induced mice treated or not with PARP inhibitor and also between wild-type and *parp-1* knockout mice. Most important differences were found in gene expression for *Nfkbia*, *S100a9*, *Hif-1 $\alpha$* , and other genes involved in carcinogenesis and inflammation. These results were corroborated by real-time PCR. Moreover, the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) was compromised by PARP inhibition or in PARP-1-deficient cells, as measured by gene reporter assays and the expression of key target genes for HIF-1 $\alpha$ . Tumor vasculature was also strongly inhibited in PARP-1-deficient mice and by DPQ. In summary, this study shows that inhibition of PARP on itself is able to control tumor growth, and PARP inhibition or genetic deletion of PARP-1 prevents from tumor promotion through their ability to cooperate with the activation AP-1, NF- $\kappa$ B, and HIF-1 $\alpha$ . (Cancer Res 2006; 66(11): 1-13)

Q2

## Introduction

Because of the causal relationship between inflammation and tumor promotion, different proinflammatory cytokines and enzymes have been implicated in the pathophysiology of human

cancer (1), and tumor microenvironment, which is largely orchestrated by inflammatory cells, is an indispensable participant in the neoplastic process, fostering proliferation, survival, and migration. Treatment with potent anti-inflammatory substances is anticipated to exert chemopreventive effect particularly in the promotion stage. Numerous intracellular signaling, including cytokines, mitogens, phorbol esters, growth factors, environmental, and ionizing radiation, converge with the activation of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and activator protein-1 (AP-1), which act independently or coordinately to regulate expression of target genes. These ubiquitous eukaryotic transcription factors mediate pleiotropic effects on cellular transformation and tumor promotion.

A different level of regulation in tumor progression is controlled by the response of tumor to hypoxic condition; hypoxia is a common characteristic of locally advanced solid tumors that have been associated with diminished therapeutic response and malignant progression. The transcription factor hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a major regulator of tumor cell adaptation to hypoxic stress (2). Tumor cells with proteomic and genomic changes favoring survival under hypoxic conditions will proliferate, thereby further aggravating the hypoxia. The selection and expansion of new (and more aggressive) clones, which eventually become the dominant tumor cell type, lead to the establishment of a vicious circle of hypoxia and malignant progression.

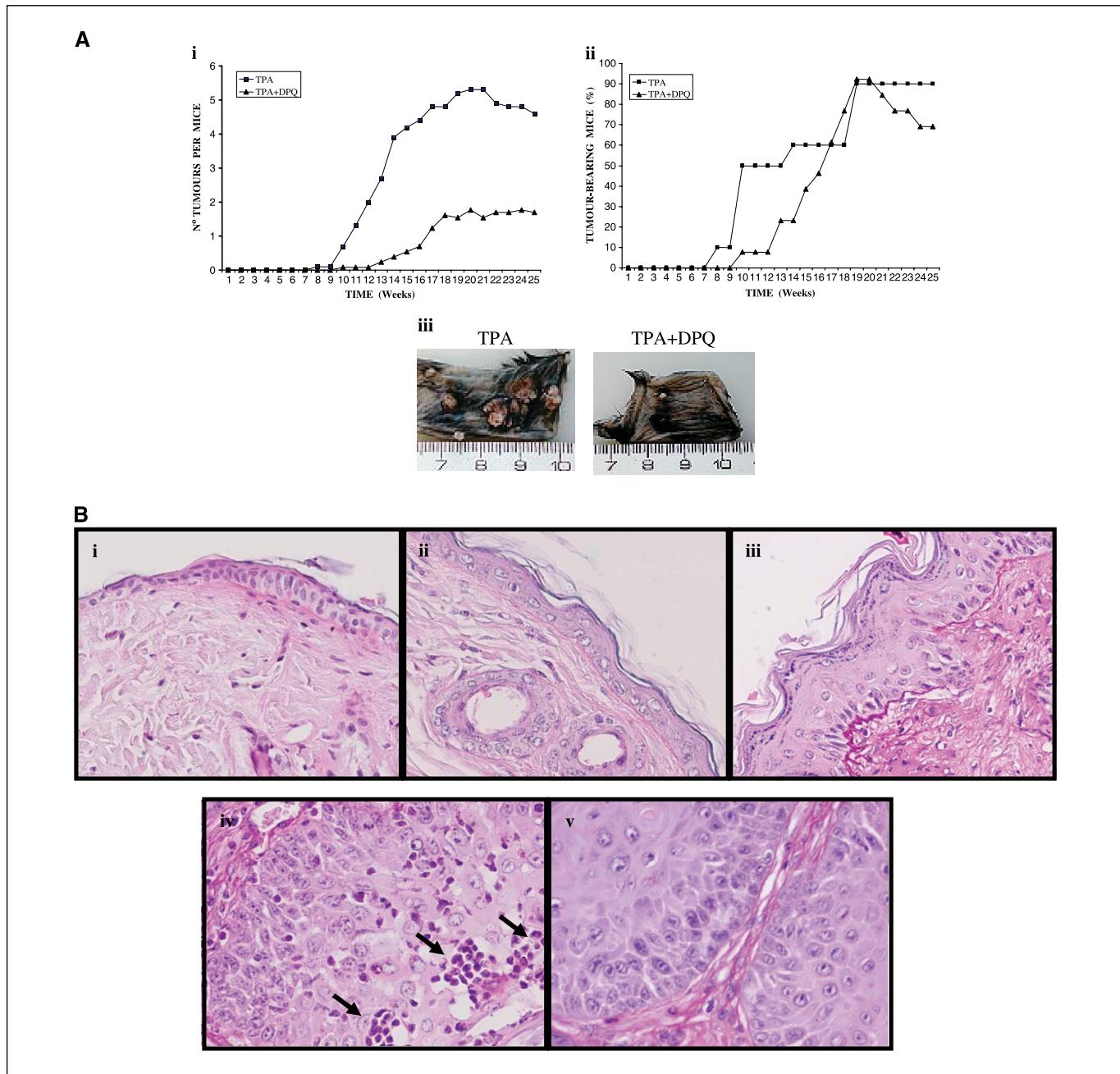
Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 is the principal member of a family of enzymes possessing poly(ADP-ribosylation) catalytic capacity. It is a conserved nuclear protein that binds rapidly and directly to both single-strand and double-strand breaks. Both processes activate the catalytic capacity of the enzyme, which in turn modulates the activity of a wide range of nuclear proteins by covalent attachment of branching chains of ADP-ribose moieties. Organisms and cellular systems deficient in functional PARP-1 display severely impaired base excision repair and genomic instability, suggesting that the enzyme plays a primary role in the cellular response to DNA damage (3).

Increasing interest in potential clinical applications of PARP inhibition has led to the development of a wide range of new compounds, the more recently developed of which display greatly increased potency and specificity compared with the prototype PARP inhibitor, 3-aminobenzamide (3-AB; ref. 4). The understanding of the role and involvement of PARP-1 in many biological mechanisms, health, and diseases as well as its role in carcinogenesis has steadily increased in recent years. (5). In a previous report, we have shown that *parp-1* knockout (KO) mice are protected against chemically induced skin carcinogenesis (6). In the present study, we show that the inhibition of PARP activity

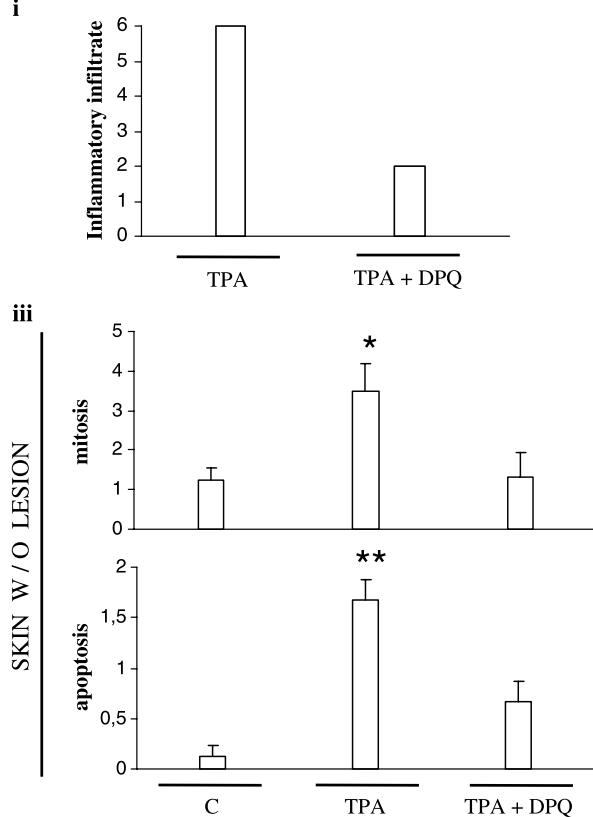
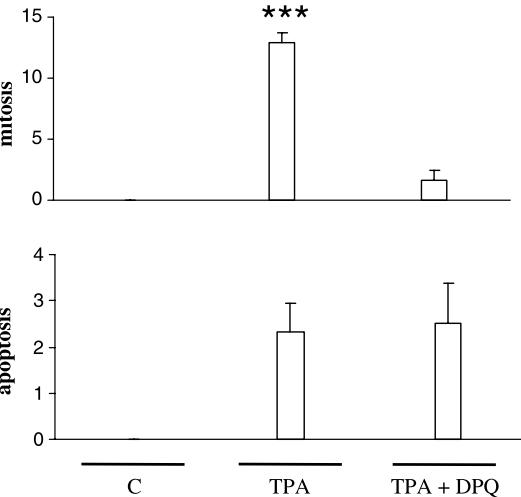
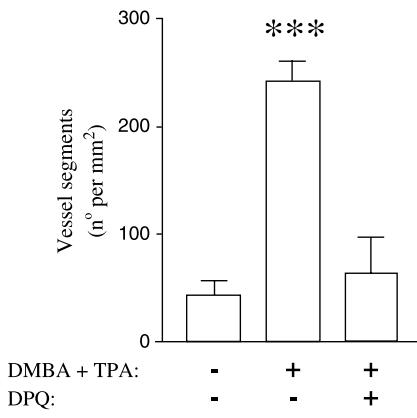
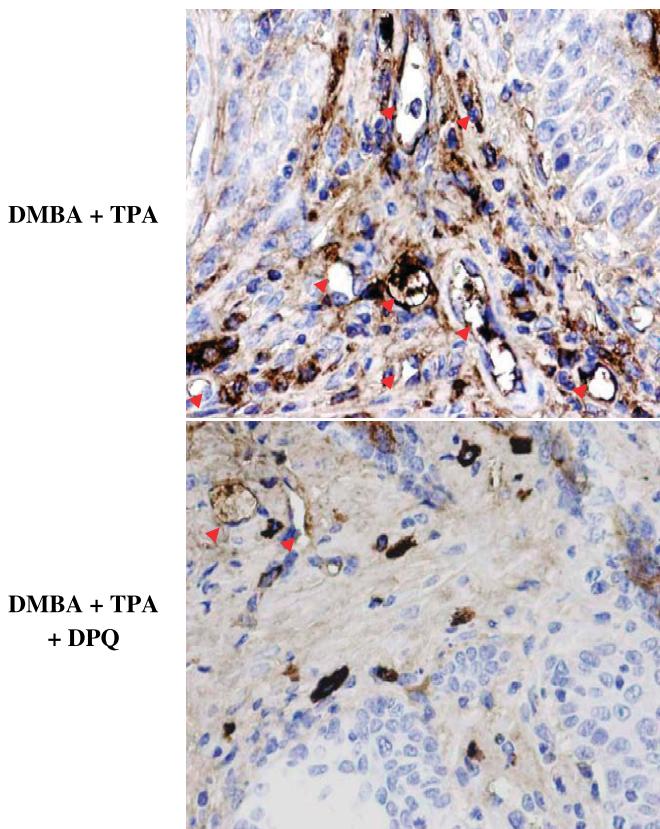
**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

**Requests for reprints:** F. Javier Oliver, Instituto de Parasitología y Biomedicina, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avda del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain. Phone: 34-958-181655; Fax: 34-958-181632; E-mail: joliver@ipb.csic.es.

©2006 American Association for Cancer Research.  
doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3050



**Figure 1.** Skin carcinogenesis in mice treated with the PARP inhibitor DPQ. C57BL/6 mice were treated with one dose of 25 µg DMBA and then with 12 µg TPA with or without 30 µg DPQ twice weekly for 25 weeks. Tumors were counted every week. *A*, *i* to *iii*, tumor multiplicity, incidence, and tumor size at the end of carcinogen treatment. *i*, average number of tumors per mouse by tumor promotion in TPA-treated mice ( $n = 10$ ; ■) and TPA + DPQ-treated mice ( $n = 13$ ; ▲). The differences in tumor multiplicity are significant between these two groups ( $P < 0.05$ ). *ii*, final number of tumor-bearing mice in TPA ( $n = 10$ ; ■) and TPA + DPQ-treated mice ( $n = 13$ ; ▲). *iii*, examples of skin papilloma size in TPA (left) and TPA + DPQ-treated mice (right) at the end of carcinogen treatment. The tumors were measured with a caliper. *B*, *i* to *v*, morphologic evaluation of epithelial hyperplasia and skin inflammation. For quantitative evaluation, skin longitudinal tissue sections of TPA-treated mice ( $n = 6$ ), TPA + DPQ-treated mice ( $n = 6$ ), and untreated control mice ( $n = 2$ ) were stained with procedure periodic acid-Schiff (PAS). *i*, homogeneous thickness of epithelium in untreated control. This epithelium is compounded by two or three layers of cells with very thin granulosum stratum and scant corneum stratum (PAS  $\times 400$ ). *ii*, epithelium of TPA + DPQ-treated mice with morphology similar to nontreated control mice (PAS  $\times 400$ ). *iii*, irregular thickness of epithelium and granulosum stratum in mice treated with DMBA + TPA that show epithelial hyperplasia (PAS  $\times 400$ ). *iv* and *v*, mice treated with DMBA + TPA with evident acute and chronic inflammatory infiltrate in papilloma (PAS  $\times 400$ ; *iv*) or treated with TPA + DPQ (*v*), where no signs of inflammatory infiltrate were found. *C*, *i* to *iii*, histologic examination and diagnosis of inflammation, cell proliferation, and apoptosis in tumors and nonlesional-treated skin. *i*, number of mice with presence of inflammatory infiltrate in the papillomatous lesion. Presence of inflammatory infiltrate in papilloma was assessed by examining their presence in 10 high-power field at  $\times 400$  magnification per mouse in treated skin with a single dose of DMBA and promotion with TPA or with TPA + DPQ during 25 weeks. Mastocytes were counted by examining their number in 10 high-power field at  $\times 400$  magnification per mouse in TPA mice and TPA + DPQ-treated mice during 25 weeks. Mastocytes were counted by examining their number in 10 high-power field at  $\times 400$  magnification per mouse in nonlesional control (C) mice and lesional back skin from treated mice. *ii*, increased cell turnover in skin of TPA-treated mice versus TPA + DPQ-treated and control mice. The average number of mitotic and apoptotic cells was determined by examining their number in 10 high-power field at  $\times 600$  magnification per mouse in nonlesional treated mice (*left*) and lesional back skin from treated mice (*right*). *TPA*, skin treated with DMBA plus TPA; *TPA + DPQ*, skin treated with DMBA plus TPA + DPQ. *D*, decreased angiogenesis in DPQ-treated tumors. *Left*, tumor blood vessels were stained with an antibody against lectin as described in Materials and Methods; *right*, quantitation of blood vessels per  $\text{mm}^2$  in tumors. *Columns*, mean of at least five different mice in each case; *bars*, SE. \*,  $P < 0.05$ , with respect to control and TPA + DPQ-treated mice; \*\*,  $P < 0.01$ , with respect to control and TPA + DPQ-treated mice; \*\*\*,  $P < 0.0001$ , with respect to control and TPA + DPQ-treated mice.

**C****ii****SKIN W / O LESION****D**

prevents from tumor growth during skin carcinogenesis due to its ability to modulate the activity of key transcription factors involved in tumor promotion (such as AP-1 and HIF-1) and also to interfere with the expression of genes involved in both tumor promotion/progression and inflammation.

## Materials and Methods

### Mice/tumor induction experiments and cell culture conditions.

Tumor induction in mice on the C57BL/6 background was done as described previously (6), except that one group was treated with 3,4-dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxyl]-1(2H)-isoquinolinone (DPQ; Alexis Biochemicals, San Diego, CA), inhibitor of PARP, and applied simultaneously with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). Control animals were also treated in parallel with acetone alone. Visible skin tumors were counted weekly, and the experiment was terminated at week 25. The incidence of papilloma, expressed as the percentage of animals with one or more papillomas, and its papilloma, expressed as the number of papillomas per surviving mouse, were calculated each time tumors were counted.

A short initiation/promotion protocol was used to assess for changes in NF- $\kappa$ B and AP-1 activation, HIF-1 $\alpha$ , and genomic expression profiles of skin epithelial cells in the initial steps of carcinogenesis with or without DPQ inhibitor as that by Martin-Oliva et al.(6). This treatment consisted in a single dose of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA; 25  $\mu$ g) and four doses of 12  $\mu$ g TPA with or without 30  $\mu$ g DPQ given >7 days (6) before evaluation of NF- $\kappa$ B and AP-1 activation, HIF-1 $\alpha$ , and differential genes expression.

Immortalized mouse embryonic fibroblasts (3T3) from either *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> mice were cultured at 37°C (5% CO<sub>2</sub>) in DMEM containing 10% fetal bovine serum, 0.5% gentamicin (Sigma), and 4.5% glucose.

**NF- $\kappa$ B, AP-1, and HIF-1 $\alpha$ -binding activity.** Gel shift assays were used to detect NF- $\kappa$ B, AP-1, and HIF-1 $\alpha$ -binding activity as that by Martin-Oliva et al. (6) and Lok et al. (7).

**RNA isolation.** DMBA and TPA or TPA plus DPQ were applied to the skin of the backs of mice as described above for gel shift assays. Total RNA was isolated from the skin of the mice 24 hours after the last TPA or TPA plus DPQ treatment by Trizol (Life Technologies, Inc.) extraction method, then purified with the RNeasy kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA), and digested with RNase-free DNase I following the manufacturer's instructions.

**Construction and analysis of cDNA microarray.** For all microarray studies, the mouse CNIO OncoChip was used. The mouse CNIO OncoChip is a cDNA microarray that has been designed for looking at genes involved in cancer and contains both the NIA15K and the 7.4K clone sets from the National Institute on Aging (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/cDNA/cDNA.html>) plus additional 600 clones specifically associated to cancer, angiogenesis, apoptosis, signal transduction, and stress processes. Briefly, the mouse cDNA microarray consists of 15,747 unique cDNA clones (rearrayed among 52,374 expressed sequence tags from preimplantation and periimplantation embryos, E12.5 female gonad/mesonephros, and newborn ovary) and 50% novel genes with an average insert size of 1.5 kb (8).

**Target preparation.** T-7-based RNA amplifications and preparations of cDNA probes were done as described previously (9, 10).

**Data analysis.** Fluorescence intensity measurements from each array element were compared with local background, and background subtraction was done as that by Tamames et al. (11).

**Reverse transcription reaction.** Amplified RNA (0.2  $\mu$ g) was used in 20  $\mu$ L reverse transcription reaction to synthesize cDNA using the iScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) according to the manufacturer's protocol. A detailed description is included in Fig. 3.

**Quantitative PCR.** Real-time PCR analysis was done using iQ SYBR Green Supermix and the iCycler iQ detection system (Bio-Rad Laboratories) according to the manufacturer's protocol. The sequences of primers used for these studies are shown in Supplementary Table S1. We used the 18S rRNA (12) as endogenous control gene.

**Hypoxia mimicking treatment, transient transfection, and Western blot analysis.** Hypoxic conditions were mimicked using the iron chelator deferrioxamine (DFO; 200  $\mu$ mol/L; Sigma), a nonselective prolyl 4-

hydroxylase inhibitor. Experimental conditions are explained in Fig. 4. Western blot analysis was done as described previously (13) using an anti-HIF-1 $\alpha$  antibody (Bethyl Laboratories).

**Histologic techniques.** Histologic techniques for conventional morphology and evaluation of blood vessels density were done according to previously published techniques (6).

**Statistical analysis.** For data shown in Fig. 1*A*, *i*, we have fitted the values of the average number of tumors per mouse during carcinogenesis treatment using the Mann-Whitney *U* test. Statistical analysis of other experiments used unpaired Student's *t* test.

## Results

**Inhibition of PARP activity delayed tumor promotion.** To test the effect of the inhibition of the catalytic activity of PARP in skin tumor promotion, we treated mice with a single dose of DMBA plus TPA twice weekly with or without the PARP inhibitor DPQ for 25 weeks (see tumor induction experiments in Materials and Methods). Before analyzing the antitumor effect of DPQ, we confirmed in both skin and fibroblasts the inhibitory effect of DPQ in PARP activity, confirming the high potency and low toxicity of this inhibitor at the dose used (results not shown). Papillomas were first found in the TPA mice 8 weeks after promotion, although TPA plus DPQ mice developed tumors starting at week 10, 2 weeks later than carcinogen-treated mice. Tumor multiplicity, found after papilloma promotion, is similar to previously reported data for *parp-1* KO versus wild-type (WT) mice (6). A total of 4.6 papillomas per mouse ( $n = 10$ ) and 1.7 papillomas per mouse ( $n = 13$ ) in TPA and TPA plus DPQ-treated mice, respectively, developed at the end of the treatment (Fig. 1*A*, *i*). The differences in the number of tumor per mice obtained during the 25 weeks were statistically significant between these two groups of mice ( $P < 0.05$ ). The percentage of tumor-bearing mice at the end of the treatment was 90% for TPA-treated mice ( $n = 10$ ) versus 69.2% for TPA plus DPQ-treated mice ( $n = 13$ ; Fig. 1*A*, *ii*). DPQ-treated mice, however, started to lose papillomas at week 25. This was due to the fact that these papillomas from DPQ-treated mice presented a fragile, tubular-like morphology (Fig. 1*A*, *iii*). The papilloma latent period (number of weeks to obtain at least one papilloma per mice) for TPA-treated mice was ~10.4 weeks, whereas TPA plus DPQ-treated mice was 16.6 weeks, suggesting that the time of tumor latency in TPA plus DPQ-treated mice is delayed with respect to the TPA-treated mice. Figure 1*A* (*iii*) shows the difference in the number of tumor per mice and sizes between these two groups of mice taken at the end of carcinogen treatment. In TPA plus DPQ-treated mice, the number and size of papillomas were reduced compared with TPA-treated mice (Table 1). Therefore, this decrease may be attributed to the absence of PARP activity per se.

Histologic examination shows that the epithelium of all mice treated with TPA (without DPQ) developed epithelial hyperplasia with significant increase and irregular thickness of epithelium (0.096 mm;  $P < 0.0001$ ) and granulosum stratum (Fig. 1*B*, *iii*) versus control (Fig. 1*B*, *i*) and TPA plus DPQ-treated (Fig. 1*B*, *ii*) mice. In TPA plus DPQ-treated mice, epithelium is compounded by two or three layers of cells with very thin granulosum stratum, in some cases absent, and scant corneum stratum and a homogeneous thickness of a maximum of 0.02 mm at the end of treatment in the epidermis without lesion (Fig. 1*B*, *ii*). This homogeneous thickness is similar to control mice treated with acetone alone (0.019 mm; Fig. 1*B*, *i*).

The presence of acute inflammatory infiltrate [TPA-treated skin (Fig. 1*B*, *iv*) and TPA plus DPQ-treated skin (Fig. 1*B*, *v*; see also Fig. 1*C*, *i*] and the number of mastocytes per mm<sup>2</sup> in papilloma

Q6

F1

T1

Q3

Q4

Q5

ST1

**Table 1.** Percentage and total numbers of papillomas of different sizes in diameter at the end of carcinogen treatment

Tumors (mm)	Total no. papillomas		% Papillomas	
	TPA (n=10)	TPA + DPQ (n=13)	TPA	TPA + DPQ
>5	6	2	16.2	8.7
1-5	31	12	83.8	52.2
<1	0	9	0	39.1

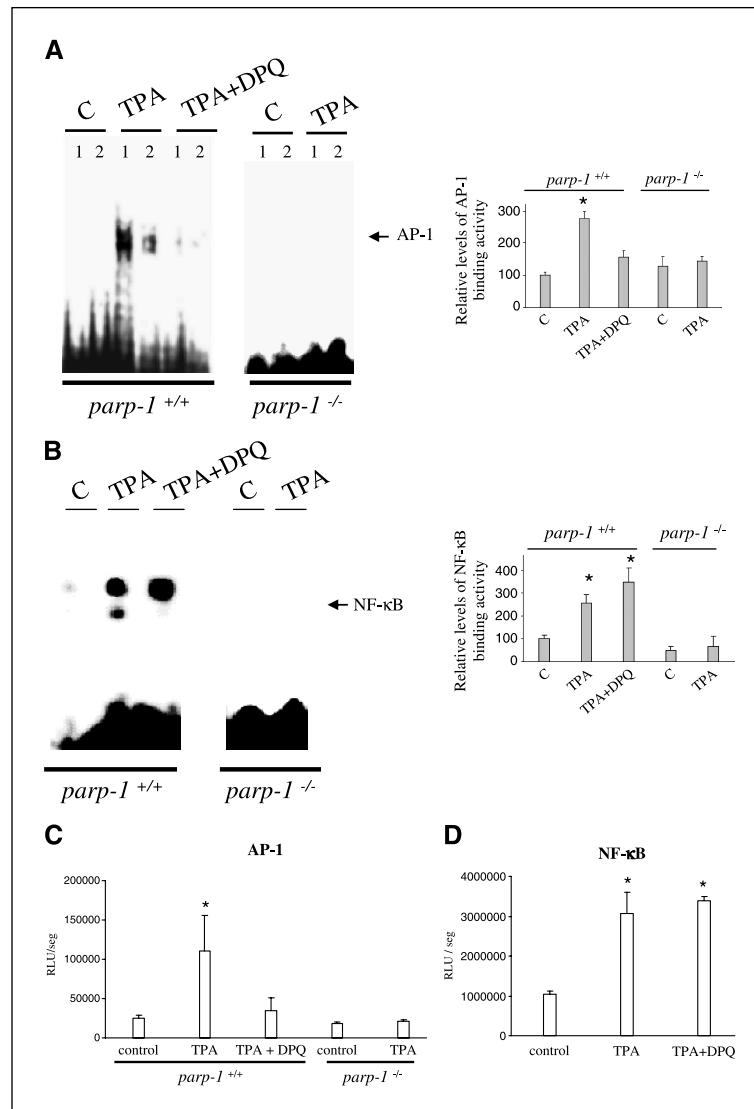
(Fig. 1C, *ii*) are significantly decreased in TPA plus DPQ-treated mice versus TPA-treated mice ( $P < 0.05$ ). The presence of elevated infiltrates of mastocytes has been correlated with increased vascularization. Cell proliferation is also clearly increased in the papillomas and in the skin without lesion of TPA-treated mice versus TPA plus DPQ-treated mice, displaying an important

increased mitosis in tumors (12.2 per high-power field versus 1.7 per high-power field, respectively;  $P < 0.0001$ ; Fig. 1C, *iii*). A striking difference was found in the apoptotic versus mitotic rate between DMBA plus TPA-treated mice and DPQ-treated mice. This accelerated apoptotic activity in DPQ-treated mice may explain why the percentage of mice bearing tumors can increase to ~90% and then decrease to ~70% (Fig. 1A, *ii*).

To analyze tumor-associated vascularization, papillomas of varying sizes were stained with lectin Ulex europaeus biotin conjugated. The “angiogenic switch” from vascular quiescence to up-regulation of angiogenesis was observed in the early stages of skin carcinogenesis (data not shown). Quantitation of vessel density in papilloma showed an important decrease in DPQ-treated mice (Fig. 1D), revealing that differences in tumor vascularity may account for the decreased size and incidence after treatment with the PARP inhibitor.

**Decrease of AP-1 DNA-binding activity but not NF-κB during tumor promotion after inhibition of PARP.** Activation of both AP-1 and NF-κB shows progressive elevation in human and mouse keratinocyte progression models (14). Thus, the observation that targeting AP-1 and NF-κB elevation prevents

**Figure 2.** NF-κB and AP-1 DNA-binding activity in TPA or TPA + DPQ-treated mice during tumor promotion. *A*, band shift analysis of AP-1 activation using AP-1-binding promoter sequence in untreated (C) and treated skin of *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> mice with one dose of 25 μg DMBA and four applications of 12 μg TPA together with 30 μg DPQ (TPA + DPQ) or without PARP inhibitor (TPA) as described in Materials and Methods. 1 and 2, two independent experiments in each condition. *B*, band shift analysis of NF-κB activation using κB INOS promoter sequence in untreated (C) and treated skin of *parp-1*<sup>+/+</sup> mice with one dose of 25 μg DMBA and four applications of 12 μg TPA together with 30 μg DPQ (TPA + DPQ) or without inhibitor (TPA) as described in Materials and Methods. Representative of four independent experiments. *Right*, quantitation of four independent experiments. \*,  $P < 0.01$ . *C* and *D*, AP-1 and NF-κB luciferase reporter assays. Fibroblasts derived from either *parp-1*<sup>+/+</sup> or *parp-1*<sup>-/-</sup> mice were transfected as specified in Materials and Methods and treated with 12 μg TPA or TPA + DPQ (30 μg) in a final volume of 3 mL culture medium for 24 hours. \*,  $P < 0.05$ , with respect to the rest of experimental conditions.



tumor promotion and progression has been extended from the mouse JB6 model to mouse and human keratinocyte progression models (15). *Parp-1* KO fibroblasts and mice deficient in PARP-1 display a decreased activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B (16, 17) and AP-1 (18). To find a mechanistic explanation for the reduced and delayed papilloma formation in mice treated with DPQ, we determined activation of these transcription factors. In nuclear extracts from the epidermis of TPA-treated mice, TPA markedly induced AP-1 and NF- $\kappa$ B activation. However, in the skin of TPA plus DPQ-treated mice and TPA-treated *parp-1* KO mice, there was no activation of AP-1 during skin carcinogenesis (Fig. 2A). In contrast, there was no difference in NF- $\kappa$ B activation in the skin of mice treated with TPA plus PARP inhibitor DPQ (Fig. 2B). Our previous report suggested that *parp-1* KO mice treated with TPA display a decreased activation of the transcription factor NF- $\kappa$ B (6). Figure 2A and B (right) shows a densitometric analysis of AP-1 and NF- $\kappa$ B band shift assays. The effect of pharmacologic inhibition of PARP by DPQ in TPA-treated mice results in a significant reduction of the relative levels of AP-1-binding activity compared with mice treated with TPA only (Fig. 2A). On the other hand, DPQ treatment to TPA-treated skins does not reduce NF- $\kappa$ B-binding activity compared with carcinogen-treated mice (Fig. 2B). Results in Fig. 2C and D show that AP-1 and NF- $\kappa$ B activation using luciferase reporter assay in fibroblasts derived from *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> also show the deficient activation of AP-1 after deletion/inhibition of PARP-1, whereas NF- $\kappa$ B is not affected by the use of PARP inhibitors as has been shown by different groups (19).

**Analysis of differential gene expression.** We used cDNA microarrays to obtain gene expression patterns of treated skins during the first week of tumor promotion. For this purpose, we compared the expression data derived from the skin of mice treated as follows: untreated *parp-1*<sup>+/+</sup> versus *parp-1*<sup>+/+</sup> treated with carcinogens (DMBA plus TPA) with or without DPQ; untreated *parp-1*<sup>-/-</sup> versus *parp-1*<sup>-/-</sup> treated with carcinogens (DMBA plus TPA).

In this way, we were able to monitor mRNA expression of 4,615 known unique murine genes and 11,096 of unknown or hypothetical proteins. Our means of identifying differentially expressed genes were based on consistent fold change and statistical significance assessed by *t* distribution applied to the average and SE to calculate probability values in each tumor/control skin pair. By using the massive screening method, our objective was to select key cancer-related genes that were differentially expressed in mice treated with the PARP inhibitor.

The genes found differentially expressed in skin treated with carcinogens versus in normal skins belong to a variety of different categories. The up-regulated (Table 2A) and the down-regulated genes (Table 2B) include genes encoding for signal molecules, tumor-associated genes, molecules involved in cell adhesion, inflammatory, and immune reaction, red-ox regulation, different metabolic pathways, etc. Analysis of the mRNAs, which are deregulated (up-regulated or down-regulated) at least 2-fold in TPA plus DPQ-treated skin compared with TPA-treated mice, revealed the following results: 40 genes up-regulated and 29 genes down-regulated in the skin of carcinogen-treated mice; 19 genes up-regulated and 21 genes down-regulated in DPQ-treated mice; and 11 genes up-regulated and 20 genes down-regulated in *parp-1* KO mice treated with carcinogens. These results are summarized in Fig. 3A. Cluster analysis of all tumor samples revealed 91 genes that match the arbitrary criterion of 2-fold change in either direction

with a statistical significance of  $P < 0.01$  (Table 2). Of considerable interest is that, depending on the presence of the PARP inhibitor or in *parp-1* KO mice, each promoted skin sample revealed a somewhat unique expression pattern together with an impressive reduction in both the number of altered genes as well as in the up-regulation of significant genes involved in different cellular functions (Table 2).

**Real-time PCR gene expression and HIF-1 $\alpha$  protein expression.** We confirmed by real-time PCR the up-regulation of some of the known genes involved in inflammation and angiogenesis (*S100a9*, *Hif-1 $\alpha$* , and *Nfkbia*; Fig. 3B, left) as well as other crucial genes known to have a role in transformation of preneoplastic cells that were not reproducibly up-regulated in the microarray. We have analyzed the expression of *osteopontin* (*OPN*), *cathepsin B* (*CtsB*), *cathepsin L* (*CtsL*), *Pecam-1*, and *Igfbp3* by RT-PCR (Fig. 3C). The results show that expression of these genes was greatly influenced by either inhibition or genetic deletion of PARP-1 during carcinogenesis. HIF-1 transcriptional activity is dependent on increased levels of HIF-1 $\alpha$  protein and on its heterodimerization with HIF-1 $\beta$  (20). To investigate whether carcinogenesis treatment influences HIF-1 activity by altering expression of HIF-1 $\alpha$ , the levels of HIF-1 $\alpha$  protein were determined in *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> mice exposed to the inhibitor DPQ as described in Materials and Methods. HIF-1 $\alpha$  expression was clearly absent in DPQ-treated and *parp-1*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3B, right).

The RT-PCR results confirmed the array prediction (Fig. 3B, left), but more obvious differences were found in the expression levels of the previously described genes (Table 2B). Rest of the selected genes matched the prediction of the array, and the enormous increase in the expression of *S100a9* (calgranulin B), whose overexpression has been related with progression of skin carcinogenesis, is particularly striking (21). Induction of the expression of this chemokine has been also related with the migration of neutrophils to inflammatory sites (22) that constitute a remarkable pathologic event during the process of skin carcinogenesis (Fig. 1B).

**Regulation of HIF-1 $\alpha$  activation by PARP-1.** In view of the pivotal role of HIF-1 $\alpha$  in carcinogenesis, we have focused particular attention to the regulation of HIF-1 $\alpha$  by PARP inhibitors and in PARP-1-deficient cells. Cells were treated with de Fe-chelator DFO (which is an iron chelator and activator of this transcription factor) for the time indicated in Fig. 4 and in Materials and Methods. Reporter gene assays were done using a reporter plasmid containing the luciferase gene under the control of nine hypoxia-responsive elements (HRE; ref. 23). HIF-1 activation was clearly attenuated by DPQ and completely absent in *parp-1*<sup>-/-</sup> cells (Fig. 4A, left). Importantly, treatment of PARP-1-deficient cells with DPQ did not have further effect on the transcriptional activation of HIF-1, suggesting that DPQ was inhibiting specifically PARP-1 but not other PARPs. We confirmed this finding by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) in nuclear extracts from PARP-1 WT and PARP-1-deficient cells. We determined that DFO induced HIF-1 activation in *parp-1*<sup>+/+</sup> cells. Interestingly, WT cells, treated with DFO plus DPQ, and PARP-1-deficient cells showed no activation of HIF-1 during hypoxic treatment as in Fig. 4A (right).

Protein levels for HIF-1 $\alpha$  were also determined (Fig. 4B) after activation with DFO. Again, after PARP inactivation and in *parp-1*<sup>-/-</sup> cells, a down-regulation of HIF-1 $\alpha$  protein expression was observed. The expression of HIF-1 $\alpha$  target genes was determined by real-time

F2

T2

F3

F4

**Table 2.** Gene names in skin of DPQ untreated WT mice (WT TPA), DPQ-treated WT mice (WT TPA + DPQ), and PARP-1 KO mice (KO TPA) versus control mice during tumor promotion in two independent experiments using microarray analysis

Symbol	2-Fold up-regulated gene names	Mean			Gene Ontology Biological Process ( <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )
		WT TPA	WT TPA + DPQ	KO TPA	
(A) 2-Fold up-regulated genes*					
<i>Alb1</i>	<i>Albumin 1</i>	2			Transport
<i>Cntn4</i>	<i>Contactin 4</i>	2			Cell adhesion, transport
<i>Axl</i>	<i>AXL receptor tyrosine kinase</i>	2.46	2.14		Cell growth, protein amino acid phosphorylation, regulation of cell cycle
<i>Bmp15</i>	<i>Bone morphogenetic protein 15</i>	3.48	3.03	2.3	Cell growth
<i>Ckmt1</i>	<i>Creatine kinase mitochondrial 1</i>	2.83	2.3		Unknown
<i>Ctla2b</i>	<i>Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2β</i>	3.25			Unknown
<i>Dbnl</i>	<i>Drebrin-like</i>	2.14			Rac protein signal transduction, endocytosis, immune response
<i>Degs</i>	<i>Degenerative spermatocyte homolog</i>	2.64			Unknown
<i>Eno1</i>	<i>Enolase 1, α nonneuron</i>	2.14	2.14		Glucolysis
<i>Expi</i>	<i>Extracellular proteinase inhibitor</i>	3.25			Unknown
<i>Ly6g6c</i>	<i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C</i>		2.14		Unknown
<i>Glx1</i>	<i>Glutaredoxin 1 (thioltransferase)</i>	7.46	5.28	3.25	Electron transport
<i>Gltip</i>	<i>Glycolipid transfer protein</i>	2.14			Lipid transport, transport
<i>Gm2a</i>	<i>GM2 ganglioside activator protein</i>	2.3			Sphingolipid metabolism
<i>Gp49a</i>	<i>Glycoprotein 49 A</i>	3.25		2.14	Unknown
<i>Gpx1</i>	<i>Glutathione peroxidase</i>	3.48			Induction of apoptosis by oxidative stress, response to oxidative stress, response to ROS
<i>Gpx2</i>	<i>Glutathione peroxidase 2</i>		6.96	5.28	Response to reactive oxygen species
<i>Gsta4</i>	<i>Glutathione S-transferase α4</i>	3.25			Unknown
<i>Gsto1</i>	<i>Glutathione S-transferase ω1</i>	2.64			Metabolism
<i>Hdc</i>	<i>Histidine decarboxylase</i>	3.25	2.64		Unknown
<i>Hif-1α<sup>†</sup></i>	<i>Hypoxia inducible factor 1α sub unit</i>	2.46			Transduction
<i>Hsd3b4</i>	<i>Hydroxysteroid dehydrogenase-4, δ5-3-β</i>	2.14			Steroid biosynthesis, C21-steroid hormone biosynthesis
<i>Ier3</i>	<i>Immediate early response 3</i>	2.64		2.46	Unknown
<i>Il18</i>	<i>Interleukin-18</i>	3.73		3.03	Immune response
<i>Itgb4bp</i>	<i>Integrin β<sub>4</sub> binding protein</i>		2.14		Integrin-mediated signaling pathway, protein biosynthesis, translational initiation
<i>Klf5</i>	<i>Kruppel-like factor 5</i>	2.64			Regulation of transcription
<i>Krt1-18</i>	<i>Keratin complex 1, acidic, gene 18</i>		2.14		Cytoskeleton organization and biogenesis
<i>Krt2-8</i>	<i>Keratin complex 2, basic, gene 18</i>		2.46		C biogenesis, protein amino acid phosphorylation, response to pathogen...
<i>Lcn2</i>	<i>Lipocalin 2</i>	2.83	3.48	4.29	Transport
<i>Lgals7</i>	<i>Lectin, galactose binding, soluble 7</i>	4.29	2.46	2.3	Apoptosis
<i>Ly6e</i>	<i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus E</i>	2.3			Defense response
<i>Lyzs</i>	<i>Lysozyme</i>	3.03			Carbohydrate metabolism, cell wall catabolism, cytolsis, defense response
<i>Nfkbia<sup>†</sup></i>	<i>Nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, ζ</i>	3.03			Immune response, regulation of transcription
<i>Map17</i>	<i>Membrane-associated protein 17</i>	3.48	2.14	2.46	Unknown
<i>Mglap</i>	<i>Matrix γ-carboxyglutamate (gla) protein</i>		2.3		Regulation of bone mineralization
<i>Npc1</i>	<i>Niemann Pick type C1</i>	2.3			Cholesterol transport
<i>Pold2</i>	<i>Polymerase (DNA directed), δ2, regulatory subunit</i>	2.3			DNA replication
<i>Ppgb</i>	<i>Protective protein for β-galactosidase</i>	2.14			Proteolysis and peptidolysis
<i>S100a9<sup>†</sup></i>	<i>S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)</i>	36.76	13	10.56	Unknown
<i>Skp</i>	<i>Serum/glucocorticoid-regulated kinase</i>	2.64	2.83		Apoptosis, protein amino acid phosphorylation

(Continued on the following page)

**Table 2.** Gene names in skin of DPQ untreated WT mice (WT TPA), DPQ-treated WT mice (WT TPA + DPQ), and PARP-1 KO mice (KO TPA) versus control mice during tumor promotion in two independent experiments using microarray analysis (Cont'd)

Symbol	2-Fold up-regulated gene names	Mean			Gene Ontology Biological Process ( <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )
		WT TPA	WT TPA + DPQ	KO TPA	
<i>Slc34a2</i>	<i>Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2</i>	2.64			Phosphate transport, transport
<i>Soat1</i>	<i>Sterol O-acyltransferase 1</i>	2.14			Cholesterol transport
<i>Tagln2</i>	<i>Transgelin 2</i>		2.3		Muscle development
<i>Tnc</i>	<i>Tenascin C</i>	3.73			Unknown
<i>Tfrc</i>	<i>Transferrin receptor</i>	2.46			Endocytosis, iron ion homeostasis, proteolysis, and peptidolysis
<i>Trps1</i>	<i>Trichorhinophalangeal syndrome I (human)</i>	2			Regulation of transcription
<i>Ucp2</i>	<i>Uncoupling protein 2, mitochondrial</i>		2.64		Mitochondrial transport, transport
<i>Ugcg</i>	<i>UDP-glucose ceramide glucosyltransferase</i>	2.46			Epidermis development, glucosylceramide and glycosphingolipid biosynthesis
(B) 2-Fold down-regulated genes <sup>†</sup>					
<i>Anapc7</i>	<i>Anaphase promoting complex subunit 7</i>			-2.64	Cell cycle, mitosis, cytokinesis, ubiquitin cycle
<i>Arl6ip</i>	<i>ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 1</i>	-2.14			Cotranslational membrane targeting
<i>Bcl2l</i>	<i>Bcl2-like 1</i>	-2.3			Regulation negative of apoptosis, regulation of apoptosis, response to radiation
<i>Calmbp1</i>	<i>Calmodulin binding protein</i>			-2.3	Mitosis
<i>Calm2</i>	<i>Calmodulin 2</i>	-2			G-protein coupled receptor protein signaling pathway, cell cycle
<i>Catns</i>	<i>Catenin src</i>			-3.03	Cell adhesion
<i>Cla3</i>	<i>Cerebellar ataxia 3</i>	-2.46		-2.14	Unknown
<i>Col1a1</i>	<i>Procollagen, type I, <math>\alpha 1</math></i>			-2.83	Cell adhesion, phosphate transport
<i>Col1a2</i>	<i>Procollagen, type I, <math>\alpha 2</math></i>	-3.73		-2.83	Cell adhesion, phosphate transport
<i>Col3a1</i>	<i>Procollagen, type III, <math>\alpha 1</math></i>			-2.83	Cell adhesion, phosphate transport
<i>Epb4.1l4b</i>	<i>Erythrocyte protein band 4.1-like 4b</i>	-2.3			Transport
<i>Fasn</i>	<i>Fatty acid synthase</i>			-2.3	Biosynthesis, fatty acid biosynthesis
<i>Fgfr2</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>	-2.46			Protein amino acid phosphorylation, regulation of cell proliferation, signal transduction
<i>Gclc</i>	<i>Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit</i>	-2.46			Glutathione biosynthesis
<i>Hbb-b1</i>	<i>Hemoglobin, <math>\beta</math> adult major chain</i>	-2.64			Hemopoiesis, transport, oxygen transport
<i>Hbb-y</i>	<i>Hemoglobin Y, <math>\beta</math>-like embryonic c</i>	-2.14			Transport, oxygen transport
<i>Hmgb1</i>	<i>High mobility group box 1</i>	-2.46			DNA packaging, nitric oxide biosynthesis, transport
<i>Hmgb2</i>	<i>High mobility group box 2</i>	-2.3	-2.3		DNA packaging, regulation of transcription
<i>Idb3</i>	<i>Inhibitor of DNA binding 3</i>	-2.46	-2.46		Negative regulation of transcription from Pol II promoter
<i>Igfbp5</i>	<i>Insulin-like growth factor binding protein 5</i>		-2.14	-2.46	Regulation of cell growth, cell growth and/or maintenance
<i>Itm2a</i>	<i>Integral membrane protein 2A</i>			-2.83	Unknown
<i>Stmn1</i>	<i>Stathmin 1</i>	-4	-3.25		Intracellular signaling cascade, microtubule depolymerization, mitotic spindle assembly
<i>Mt2</i>	<i>Metallothionein 2</i>	-2.3	-2.3	-3.25	Nitric oxide mediated signal transduction, zinc ion homeostasis
<i>Myef2</i>	<i>Myelin basic protein expression factor 2, repressor</i>	-2.64			Unknown
<i>Mylpf</i>	<i>Myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle</i>			-2.46	Cytoskeleton organization and biogenesis, muscle development

(Continued on the following page)

**Table 2.** Gene names in skin of DPQ untreated WT mice (WT TPA), DPQ-treated WT mice (WT TPA + DPQ), and PARP-1 KO mice (KO TPA) versus control mice during tumor promotion in two independent experiments using microarray analysis (Cont'd)

Symbol	2-Fold up-regulated gene names	Mean			Gene Ontology Biological Process ( <a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA/">http://www.ebi.ac.uk/GOA/</a> )
		WT TPA	WT TPA + DPQ	KO TPA	
<i>Nap1l1</i>	<i>Nucleosome assembly protein 1-like 1</i>	-2.46	-2.14		Nucleosome assembly
<i>Psmb5</i>	<i>Proteasome (prosome, macropain) subunit, β type 5</i>			-2.46	Ubiquitin-dependent protein catabolism
<i>Purb</i>	<i>Purine-rich element binding protein B</i>	-2.14	-3.25	-3.25	Unknown
<i>Pvr13</i>	<i>Poliovirus receptor-related 3</i>	-3.48	-3.25	-3.73	Cell adhesion, cell-cell adhesion
<i>Slc4a2</i>	<i>Solute carrier family 4 (anion exchanger) member 2</i>	-3.03			Ion transport, anion transport, transport
<i>Smarca5</i>	<i>SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin</i>	-2.14	-2.14		Chromatin assembly or disassembly, chromatin remodeling
<i>Sox4</i>	<i>SRY-box containing gene 4</i>	-2.83			Regulation of transcription
<i>Spr</i>	<i>Sepiapterin reductase</i>	-2.83	-2.46	-3.03	Metabolism, tetrahydrobiopterin biosynthesis
<i>Sp1</i>	<i>Trans-acting transcription factor 1</i>		-2.14	-2.3	Regulation of transcription, positive regulation of transcription
<i>Tera</i>	<i>Teratocarcinoma expressed, serine rich</i>	-2.64	-2.64	-2	Unknown
<i>Tia1</i>	<i>Cytotoxic granule-associated RNA-binding protein 1</i>	-2.46			Apoptosis
<i>Tm4sf6</i>	<i>Transmembrane 4 superfamily member 6</i>	-2.83			Unknown
<i>Tnfrsf19</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19</i>	-2.46	-2.83	-2.83	Unknown
<i>Ttc3</i>	<i>Tetratricopeptide repeat domain 3</i>	-2.14	-2.14	-2.14	Unknown
<i>Tubb5</i>	<i>Tubulin, β5</i>	-2.14			Microtubule-based process
<i>Ube2s</i>	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2S</i>			-2.64	Protein modification, ubiquitin cycle
<i>Utrn</i>	<i>Utrophin</i>			-2.46	Signal transduction, muscle development, muscle contraction, chemotaxis
5830426I05Rik	<i>RIKEN cDNA 5830426I05 gene</i>	-2.14	-2.46	-2.3	Inner cell mass cell proliferation

\*Mean gene names with fold <2 between control and treated mice are not indicated.

†Real-time PCR analysis gene expression.

‡Mean gene names with fold greater than -2 between control and treated mice are not indicated.

RT-PCR. The expression of *Igfbp3*, *Bnip3*, and *Vegf-A* genes was all strongly up-regulated by this drug in WT fibroblasts (Fig. 4C and D). However, after inhibition of PARP and in cells deficient in PARP-1, there was a deficient activation in the expression of these genes (Fig. 4C and D).

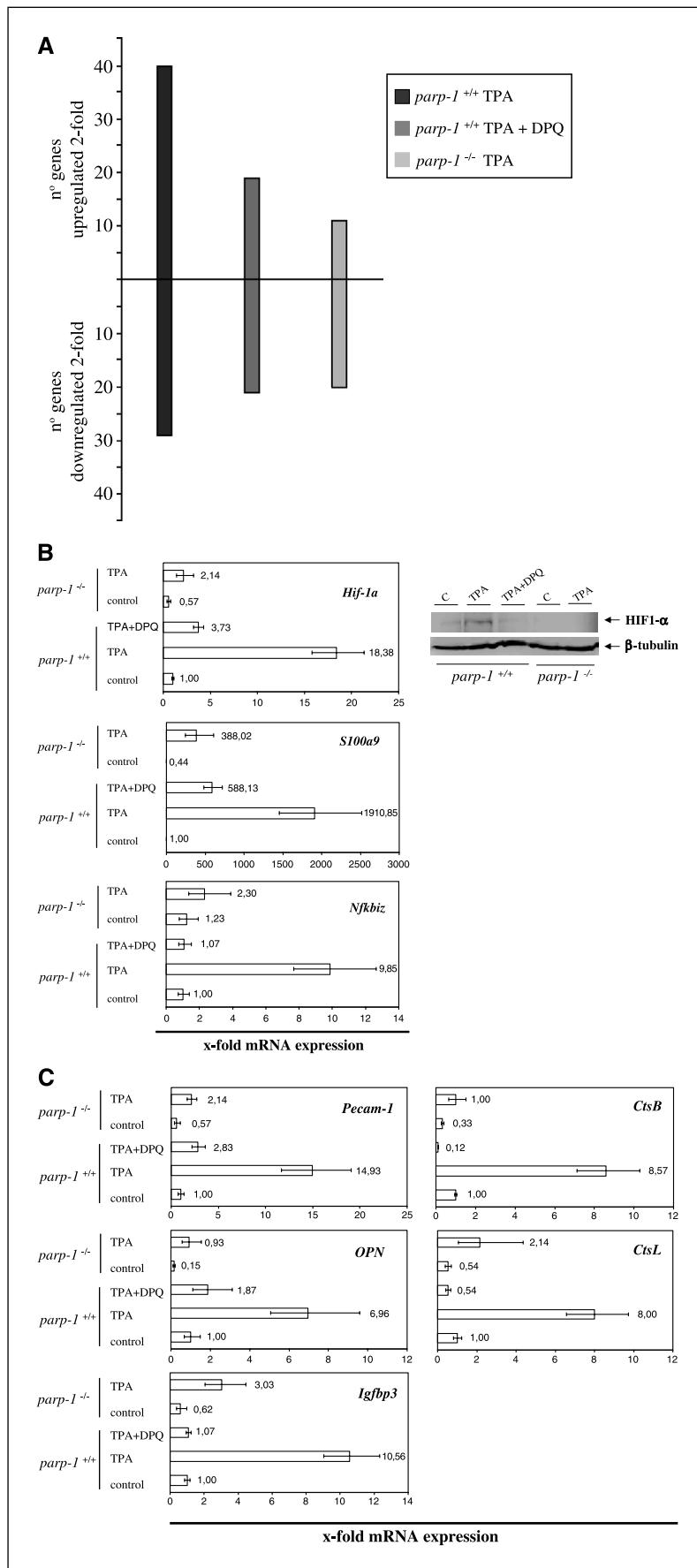
## Discussion

Tumorigenesis is a complex multistage process, in which a series of genetic changes is thought to deregulate the cellular processes that control cell proliferation, differentiation, genome integrity, DNA repair, and induction of apoptosis. The murine model of chemically induced skin carcinogenesis is one of the best defined experimental *in vivo* models of epithelial carcinogenesis, representing an important tool for the understanding of current concepts about human neoplasia, including the multi-stage nature of tumor development. In this model, the development of squamous cell malignancy of the skin can be subdivided into three phases: initiation, promotion, and progression (24). Although genetic events are crucial to initiation and progression, the rate-limiting step in this model, the tumor promotion, is predominantly characterized by epigenetic events. In this context, changes in the RNA expression level, which are closely related to

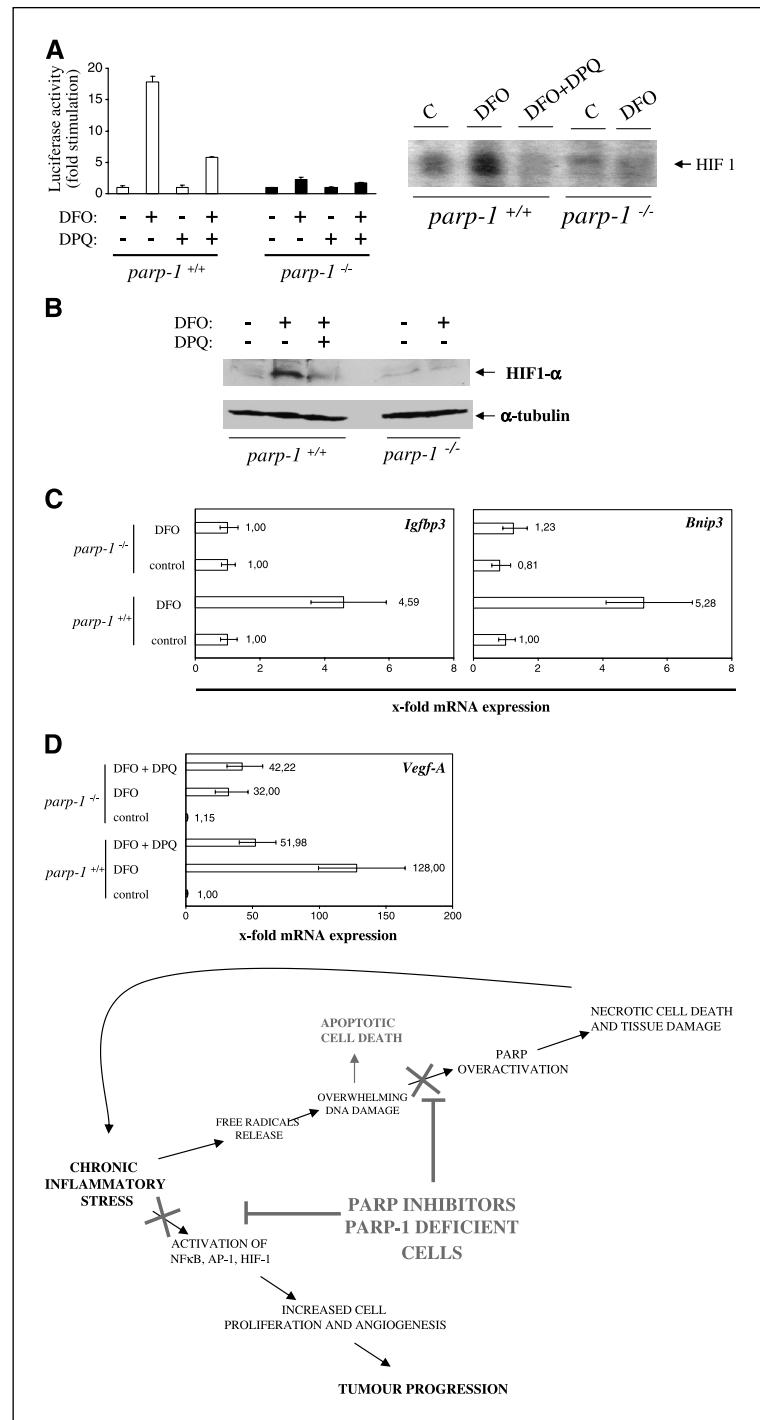
the amount of protein product and thus the biochemical activity, may be considered as first evidence for a gene with oncogenic potential.

PARP-1 may influence the stress/inflammation response through regulation of transcription factors and associated gene transcription. PARP-1 has been reported to either activate or repress transcription activity (25). PARP-1 influences on transcription activity may involve direct protein-protein interaction with PARP-1 or the catalytic activity of the PARP-1 enzyme, which can poly(ADP-ribosyl)ate transcription factors. Transcription factors, such as AP-2 (26), B-MYB (27), Oct-1 (28), YY-1 (29), and TEF-1 (30), have been shown to bind directly to PARP-1. On the other hand, transcription factors, such as p53 (31), fos (32), and RNA polymerases I and II (25), are poly(ADP-ribosyl)ated. NF-κB transcription activation after stress/inflammatory stimuli is reduced in *parp-1*<sup>-/-</sup> cells (16, 19).

The global analysis of gene expression during carcinogenesis as function of either PARP inhibition or in the skin of PARP-1-null mice revealed striking differences between the three groups analyzed (Fig. 3A; Table 2). Genes up-regulated in carcinogen-treated skin from WT mice (without DPQ treatment) include several tumor-associated genes in mouse and human [i.e., *AXL* receptor tyrosine kinase (*Axl*), *Enolase 1* (*Eno1*), *Hif-1α*, immediate



**Figure 3.** Numbers of genes that are deregulated (up-regulated or down-regulated) by at least 2-fold in carcinogen-treated skin versus normal skin by using cDNA microarray analysis. Twenty-four hours after the short initiation/promotion protocol, RNA was obtained from control, TPA, or TPA + DPQ-treated mice, and amplified RNA was used for hybridization of microarray slide as described in Materials and Methods. For data analysis, fluorescence intensity measurements from each array element were compared with local background, and background subtraction was done. To normalize the data, the Cy3/Cy5 ratio was adjusted using the diagnosis and normalization array data tool. In addition, spots with background-subtracted signal intensities <500 fluorescence units (sum of the two channels) were excluded from the analysis. Furthermore, bad spots or areas of the array with obvious defects were manually flagged. The Cy3/Cy5 ratios of the duplicated spots of the array were averaged. Genes were deemed to be up-regulated or down-regulated if the difference ratio was at least 2-fold. A global gene expression differences between the three groups of mice used in the study: *parp-1*<sup>+/+</sup> TPA, *parp-1*<sup>+/+</sup> TPA + DPQ, and *parp-1*<sup>-/-</sup> TPA. *B* and *C*, differential gene expression measured by quantitative real-time PCR. DMBA and TPA or TPA + DPQ were applied to the skin of the backs of *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> mice with the short protocol as described in Materials and Methods. Total RNA was isolated from the skin of the mice 24 hours after the last TPA or TPA + DPQ treatment, and 0.2 µg RNA was used in 20 µL RT reaction to synthesize cDNA. *B*, real-time PCR of genes recently identified as possibly NF-κB regulated (*Nfkbiaz* or *Mail*), AP-1 regulated (*S100a9* or *calgranulin B*), and *Hif-1α*. Right, expression of HIF-1α protein. *C*, real-time PCR of some of the known genes involved in inflammation and tumor progression: *Pecam-1*, *OPN*, *CtsB*, *CtsL*, and *Igfbp3*. The results were normalized to the expression of 18S rRNA for all of the samples. Real-time PCR analysis was done using iQ SYBR Green Supermix and the iCycler iQ detection system according to the manufacturer's protocol. The sequences of primers used for these studies are shown in Supplementary Table S1. In all cases, a standard curve containing at least four concentrations (represented in triplicate) of a control cDNA was constructed for both the endogenous control gene (18S rRNA) and the gene of interest. In all cases, standard curves had a coefficient of correlation >0.98. For data analysis, the cycle threshold value ( $C_T$ ; arbitrary number of PCR cycles, in which all of the PCR amplification graphs is comparing, is in the linear range) was calculated in each case. A lower  $C_T$  value means more transcript, and a higher  $C_T$  value means less transcript. To normalize the endogenous control gene, the gene of interest  $C_T$  value was divided by the endogenous control gene  $C_T$  value. We used the 18S rRNA endogenous control gene because its level of expression is very stable and so high that small fluctuations will not result in detectable fluctuations in the normalized fluorescence signal of the target gene. In each case, all samples were represented in triplicate for relative quantitative fold calculations with respect to untreated sample mice.



**Figure 4.** Defective HIF-1-dependent transcriptional activation in DPQ-treated and *parp-1*<sup>-/-</sup> cells. Cells were transiently cotransfected with 0.25 μg β-galactosidase reporter vector (as control of transfection) together with 1 μg of the HIF/luciferase plasmid (kind gift from Dr. Del Peso, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, Spain) or 1 μg of the NF-κB/luciferase plasmid or 1 μg of the AP-1/luciferase plasmid (both are kind gifts from Dr. López-Rivas, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo-CSIC, Sevilla, Spain) using jetPEI cationic polymer transfection reagent (Polytransfection, Illkirch, France) according to the manufacturer's instructions. *A*, 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> were transfected with a reporter luciferase plasmid containing 9× HRE as described in Materials and Methods. Luciferase activity was measured 36 hours after DFO treatment. EMSA for HIF-1α activation. Conditions for EMSA are explained in Materials and Methods. *B*, protein levels of HIF-1α 24 hours after DFO treatment in 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> [with or without DPQ (20 μmol/L)] and *parp-1*<sup>-/-</sup> cells treated with 200 μmol/L DFO. *C* to *D*, real-time RT-PCR of HIF-1-dependent genes (*Igfbp3*, *Bnip3*, and *Vegf-A*). mRNA levels were determined 36 hours after DFO treatment. Columns, mean of at least three independent experiments done in duplicate and HIF-1α protein levels are representative experiments of three. *D*, bottom, proposed model of action of PARP inhibitor in tumors, in which the inflammatory component is key for their development.

early response 3 (*Ier3*; *Iex-1*), Kruppel-like factor 5 (*Klf5*), calgranulin B (*S100a9*), tenascin C (*Tnc*), UDP-glucose ceramide glucosyltransferase (*Ugcg*), lectin galactose binding soluble 7 (*Lgals7*), transferrin receptor (*Tfrf*), membrane-associated protein 17 (*Map17*), lysozyme (*Lyzs*), extracellular proteinase inhibitor (*Expi*), trichorhinophalangeal syndrome I (*Trps1*), Niemann Pick type C1 (*Npc1*), and serum/glucocorticoid-regulated kinase (*Sgk*); genes involved in oxidative stress, inflammation, and immune response include glutathione peroxidase 1 (*Gpx1*), glutathione S-transferase α4 (*Gsta4*) and glutathione S-transferase ω1 (*Gstο1*),

interleukin-18 (*Il18*), *Nfkbia* (also called *Mail*), glutaredoxin 1 (*Glxr1*), sterol O-acyltransferase (*Soat-1*), CTL-associated protein 2b (*Ctla2b*), glycoprotein marker of natural killer cells (*Gp49a*), lymphocyte antigen 6 complex (*Ly6e*), and drebrin-like (*Dbnl*). All the above genes were either not up-regulated, or the expression significantly decreased with DPQ treatment or in *parp-1*<sup>-/-</sup> mice (Table 2). Some of the above genes are targets of NF-κB [*Nfkbia*, *Iex-1*, *Tnc*, *Lyzs*, and *procollagen type I α2* (*Col1a2*); ref. 33] and AP-1 (*Tnc*, *procollagen type I*, *S100* family members, and *Pold2*; ref. 34), supporting our previous results that defective activation

of these two key transcription factors by either PARP inhibition or genetic deletion of PARP-1 results in an effective blockage of gene expression. During the promotion of skin carcinogenesis, the expression of several genes is also down-regulated. Of note are some genes that have been reported to be involved in the progression of different human and mouse tumors, which were only down-regulated or the expression significantly decreased with DPQ treatment or in *parp-1*<sup>-/-</sup> mice (Table 2): dermatofibrosarcoma and skin neoplasms (procollagens type I and III), *Igfbp5b*, *metallothionein 2* (*Mt2*), *purine-rich element binding protein B* (*Purb*), *trans-acting transcription factor-1* (*Sp1*), and *fatty acid synthase* (*Fasn*). Other gene 2-fold down-regulated only in carcinogen-treated mice (without DPQ treatment) was the *fibroblast growth factor 2* (*Fgf2*), whose loss of expression accompanies malignant progression of both animal and human prostate tumors (35).

One of the more important outcome in the current study is the ability of PARP-1/PAR to modulate the expression of genes involved in angiogenesis, particularly *Hif-1 $\alpha$* , *Pecam-1*, and probably *OPN*. Of particular interest is the absence of induction of *Hif-1 $\alpha$*  after treatment with DPQ and in *parp-1*-deficient mice. This transcription factor has been largely involved in tumor progression by promoting global response to hypoxia, including new vessels formation (36). Hypoxia is an almost universal hallmark of solid tumors. Adaptation to hypoxia is critical for tumor survival and growth and is mediated in large part by transcriptional activation of genes that facilitate short-term adaptive mechanisms (e.g., increased vascular permeability, vasodilation, glucose transport, and switch to anaerobic metabolism) as well as long-term adaptive mechanisms. This coordinated homeostatic response is mediated, in large part, through the activation of the heterodimeric transcription factor HIF-1. Tumor hypoxia and overexpression of HIF-1 have been associated with resistance to certain therapies, increased risk of invasion and metastasis, and poor outcome in certain malignancies. The near universality of hypoxia in human tumors and centrality of the HIF pathway may have therapeutic utility as an antitumor strategy. Inhibition of HIF function in tumors may attenuate and contribute directly to tumor cell death through metabolic derangement. This role seems to be accomplished by the PARP inhibitor DPQ because HIF-1 $\alpha$  is unable to accumulate after treatment with DPQ (Fig. 4B), and increased rates of apoptotic cells are present in the incipient tumors of DPQ-treated mice. Thus, inhibition of PARP could be of great potential interest in the design of new antiangiogenic therapies. Targeting PARP is not only a way to prevent efficient DNA repair during treatment with classic chemotherapy and radiotherapy as has been classically envisaged but also its effective targeting has more general effects on transcription of key genes involved in tumor progression. Up to date, the molecular link between the HIF-1 and PARP-1 has not been identified. What is clear from our results is that stabilization of HIF-1 $\alpha$  differs drastically between *wt* and *parp-1*-deficient cells and also in the presence of the PARP inhibitor DPQ. PARP-1 has been reported repeatedly as a transcriptional cofactor of several transcription factor, including NF- $\kappa$ B and AP-1. As a hypothesis, we are working in the possible involvement of CBP/p300 protein as a link between PARP-1 and HIF-1 $\alpha$ . CBP binding to HIF-1 $\alpha$  is a key step for HIF-1-dependent transcriptional activation, and PARP-1 is a substrate for CBP (CBP-dependent PARP-1 acetylation is necessary for PARP-1 acting as a cofactor of NF- $\kappa$ B activation).

Different groups have proven the benefits of inhibiting PARP-1 in the potentiation of classic antineoplastic treatments, either radiotherapy or chemotherapy (4, 37, 38). In this study, we show that the PARP inhibitor DPQ on itself has antitumor activity. The effect of DPQ on tumor multiplicity, tumor incidence, and tumor size (Fig. 1A) clearly indicates that the sole inhibition of PARP is able to slow down tumor growth.

As we have previously shown, genetic deletion of PARP-1 completely prevented TPA-induced cell proliferation, with a clear effect in tumor latency, incidence, and multiplicity (6). Although it is now clear that proliferation of cells alone does not cause cancer, sustained cell proliferation in an environment rich in inflammatory cells and DNA damage-promoting agents (as free radicals derived reactive oxygen and nitrogen species during the inflammatory response do) potentiates and/or promotes neoplastic risk. Our hypothesis is that inhibition or genetic elimination of PARP-1 interferes with the promotion of tumors of epithelial origin, in which inflammatory processes play a critical role in this step (39). The implications of DNA repair inhibitors for anticancer therapy are well recognized (40), and the role of PARP-1 in DNA damage repair has been extensively characterized. First-generation PARP-1 inhibitors, such as 3-AB, lacked the potency, specificity, and pharmacologic properties required for detailed preclinical evaluation of their ability to increase the sensitivity of tumors to anticancer chemotherapy and radiotherapy. New highly potent PARP inhibitors have shown their specificity and *in vivo* activity to enhance chemotherapy and radiotherapy of human cancer (40). More recently, two different groups provided strong evidences in the sense that monotherapy with PARP inhibitors was effective in eliminating BRCA-1 and BRCA-2 cancer cells and tumors due to the inability of these cells to repair by homologous recombination the stalled replication fork damages induced by PARP inhibitors (41, 42).

It is now evident that inflammation has powerful effect on tumor development. As summarized in the proposed model (Fig. 4D, bottom), PARP inhibitors may affect tumor progression by interfering with the activation of key transcription factors involved in cell proliferation, angiogenesis, and inflammation. Early in the neoplastic process, proinflammatory factors and cells are powerful tumor promoters, producing an attractive environment for tumor growth, facilitating sustained DNA damage, and promoting angiogenesis. Thus, effective inhibition of PARP might have a clear benefit in antitumor therapy by facilitating a reduced oxidative status (thus minimizing reactive oxygen and nitrogen species release and the DNA damage) and minimizing the activation of proinflammatory and proangiogenic factors.

## Acknowledgments

Received 9/7/2005; revised 2/17/2006; accepted 3/23/2006.

**Grant support:** Grants SAF 2003-01217, RNIHG c03/02, PI050972, and FIS G03/152 (F.J. Oliver), grant PI021505 (R. García del Moral), and grants CICYT SAF 2001-3533 and SAF 2004-00889 (J.M. Ruiz de Almodóvar). D. Martín-Oliva and J.A. Muñoz-Gámez have fellowships from Instituto de Salud Carlos III. R. Aguilar-Quesada is a recipient of Formación de Profesorado Universitario fellowship from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia. R. Martínez-Romero is a recipient of a fellowship I3P from Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We thank Francisco Ferrer Gamarra and Dolores Beriso Herranz from the animal house of Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra" (CSIC, Granada, Spain), Paloma la Cueva from Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (Madrid, Spain) for technical assistance in the hybridization of cDNA arrays, and Dr. Gilbert de Murcia (Centre National de la Recherche Scientifique, Strasbourg, France) for the PARP-1-null mice.

## References

1. Aggarwal BB. Nuclear factor- $\kappa$ B: the enemy within. *Cancer Cell* 2004;6:203–8.
2. Vaupel P. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 2004;9 Suppl 5:10–7.
3. Shall S, de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 2000;460:1–15.
4. Miknyoczki SJ, Jones-Bolin S, Pritchard S, et al. Chemopotentiation of temozolamide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2003;2:371–82.
5. Masutani M, Nakagama H, Sugimura T. Poly(ADP-ribose) and carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:339–48.
6. Martin-Oliva D, O'Valle F, Munoz-Gamez JA, et al. Crosstalk between PARP-1 and NF- $\kappa$ B modulates the promotion of skin neoplasia. *Oncogene* 2004;23:5275–83.
7. Lok CN, Ponka P. Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem* 1999;274:24147–52.
8. Fraga MF, Herranz M, Espada J, et al. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res* 2004;64:5527–34.
9. Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, et al. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1663–7.
10. Eberwine J. Amplification of mRNA populations using aRNA generated from immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA. *BioTechniques* 1996;20:584–91.
11. Tamames J, Clark D, Herrero J, et al. Bioinformatics methods for the analysis of expression arrays: data clustering and information extraction. *J Biotechnol* 2002;98:269–83.
12. Burbach GJ, Dehn D, Del Turco D, Deller T. Quantification of layer-specific gene expression in the hippocampus: effective use of laser microdissection in combination with quantitative RT-PCR. *J Neurosci Methods* 2003;131:83–91.
13. Munoz-Gamez JA, Martin-Oliva D, Aguilar-Quesada R, et al. PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis. *Biochem J* 2005;386:119–25.
14. Li JJ, Dong Z, Dawson MI, Colburn NH. Inhibition of tumor promoter-induced transformation by retinoids that transrepress AP-1 without transactivating retinoic acid response element. *Cancer Res* 1996;56:483–9.
15. Bernstein LR, Colburn NH. AP1/jun function is differentially induced in promotion-sensitive and resistant JB6 cells. *Science* 1989;244:566–9.
16. Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, Nacci C, et al. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF- $\kappa$ B activation in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *EMBO J* 1999;18:4446–54.
17. Hassa PO, Buerki C, Lombardi C, Imhof R, Hottiger MO. Transcriptional coactivation of nuclear factor- $\kappa$ B-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Biol Chem* 2003;278:45145–53.
18. Andreone TL, O'Connor M, Denenberg A, Hake PW, Zingarelli B. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates activation of activator protein-1 in murine fibroblasts. *J Immunol* 2003;170:2113–20.
19. Hassa PO, Covic M, Hasan S, Imhof R, Hottiger MO. The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF- $\kappa$ B coactivator function. *J Biol Chem* 2001;276:45588–97.
20. Wang GL, Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 1993;268:21513–8.
21. Gebhardt C, Breitenbach U, Tuckermann JP, et al. Calgranulins S100A8 and S100A9 are negatively regulated by glucocorticoids in a c-Fos-dependent manner and overexpressed throughout skin carcinogenesis. *Oncogene* 2002;21:4266–76.
22. Vandal K, Rouleau P, Boivin A, et al. Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 2003;171:2602–9.
23. Alvarez-Tejado M, Alfranca A, Aragones J, et al. Lack of evidence for the involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxia-inducible factors by low oxygen tension. *J Biol Chem* 2002;277:13508–17.
24. Marks F, Furstenberger G. The conversion stage of skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990;11:2085–92.
25. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 1999;342:249–68.
26. Kannan P, Yu Y, Wankhade S, Tainsky MA. PolyADP-ribose polymerase is a coactivator for AP-2-mediated transcriptional activation. *Nucleic Acids Res* 1999;27:866–74.
27. Cervellera MN, Sala A. Poly(ADP-ribose) polymerase is a B-MYB coactivator. *J Biol Chem* 2000;275:10692–6.
28. Nie J, Sakamoto S, Song D, Qu Z, Ota K, Taniguchi T. Interaction of Oct-1 and automodification domain of poly(ADP-ribose) synthetase. *FEBS Lett* 1998;424:27–32.
29. Oei SL, Griesenbeck J, Schweiger M, et al. Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240:108–11.
30. Butler AJ, Ordahl CP. Poly(ADP-ribose) polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol* 1999;19:296–306.
31. Wesierska-Gadek J, Schmid G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the stability of the wild-type p53 protein. *Cell Mol Biol Lett* 2001;6:117–40.
32. Amstad PA, Krupitza G, Cerutti PA. Mechanism of c-fos induction by active oxygen. *Cancer Res* 1992;52:3952–60.
33. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853–66.
34. Schlingemann J, Hess J, Wrobel G, et al. Profile of gene expression induced by the tumour promotor TPA in murine epithelial cells. *Int J Cancer* 2003;104:699–708.
35. Yasumoto H, Matsubara A, Mutaguchi K, Usui T, McKeehan WL. Restoration of fibroblast growth factor receptor2 suppresses growth and tumorigenicity of malignant human prostate carcinoma PC-3 cells. *Prostate* 2004;61:236–42.
36. Yeo Ej, Chun YS, Park JW. New anticancer strategies targeting HIF-1. *Biochem Pharmacol* 2004;68:1061–9.
37. Bowman KJ, White A, Golding BT, Griffin RJ, Curtin NJ. Potentiation of anti-cancer agent cytotoxicity by the potent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors NU1025 and NU1064. *Br J Cancer* 1998;78:1269–77.
38. Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, et al. Combined treatment with temozolamide and poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor enhances survival of mice bearing hematologic malignancy at the central nervous system site. *Blood* 2002;99:2241–4.
39. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860–7.
40. Calabrese CR, Almassy R, Barton S, et al. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:56–67.
41. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005;434:917–21.
42. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 2005;434:913–7.

## **COMUNICACIONES A CONGRESOS**



**Autores:** MUÑOZ GÁMEZ J.A.; NUÑEZ TORRES M.I.; VALENZUELA M.T.; MARTIN D.; VILLALOBOS M.; RUIZ DE ALMODOVAR J.M.; OLIVER F.J.  
**Título:** ESTUDIO DE LOS INHIBIDORES DE LA PARP EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER  
**Tipo de participación:** POSTER.  
**Congreso:** PRIMERA CONFERENCIA ATLANTICA DEL CÁNCER  
**Publicación:** INSTITUTO CANARIO DE INVESTIGACIÓN DEL CANCER/ONCOLOGÍA MOLECULAR 2002.  
Pág. 272- 273

**Lugar celebración:** FUERTEVENTURA      **Fecha:** 9-13/02/ 2002

Fecha: 9-13/02/ 2002

**Autores:** MUÑOZ-GÁMEZ JA, NUÑEZ MI, VALENZUELA MT, MARTÍN D, VILLALOBOS M, OLIVER FJ, RUIZ DE ALMODÓVAR JM.  
**Título:** POTENTIATION OF DOXORUBICIN EFFECT WITH PARP INHIBITOR.  
**Tipo de participación:** POSTER.  
**Congreso:** 17 MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH / IX CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE INVESTIGACIÓN SOBRE EL CÁNCER.  
**Publicación:** REV ONCOLOGÍA 2002; 4 SUPPL 1:1-179. PAG 167.  
**Lugar celebración:** GRANADA Fecha: ESPAÑA 2002

**Autores:** NUÑEZ MI, MUÑOZ-GÁMEZ JA, VALENZUELA MT, MARTÍN D, VILLALOBOS M, OLIVER FJ,  
RUIZ DE ALMODÓVAR JM.  
**Título:** DNA RADIATION DAMAGE AFTER TREATMENT WITH 5-AZA-2-DEOXYCYTIDINE.  
**Tipo de participación:** POSTER.  
**Congreso:** 17 MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH / IX CONGRESO  
DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE INVESTIGACIÓN SOBRE EL CÁNCER.  
**Publicación:** Rev Oncol 202; 4 suppl 1:1-179. Pag 196.  
**Lugar celebración:** GRANADA Fecha: ESPAÑA 2002

**Autores:** VALENZUELA MT, MARTÍN D, MUÑOZ-GÁMEZ JA, NUÑEZ MI, VILLALOBOS M, RUIZ DE ALMODÓVAR  
JM, OLIVER FJ.  
**Título:** ASSOCIATION BETWEEN ATM Y PARP-1 AFTER DNA DAMAGE USING g-IRRADIATION AND MNU.  
**Tipo de participación:** POSTER.  
**Congreso:** 17 MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH / IX CONGRESO DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE INVESTIGACIÓN SOBRE EL CÁNCER.  
**Publicación:** Rev Oncol 202; 4 suppl 1:1-179. Pag 111.  
**Lugar celebración:** GRANADA **Fecha:** ESPAÑA 2002

**Autores:** MUÑOZ-GÁMEZ JA, NUÑEZ MI , VALENZUELA MT, MARTÍN D, VILLALOBOS M, , RUIZ DE ALMODÓVAR JM, OLIVER FJ.  
**Título:** POTENCIACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DE DOXORUBICINA CON INHIBIDORES DE PARP.  
**Tipo de participación:** PONENCIA ORAL.  
**Congreso:** 5<sup>a</sup> APOREUNIÓN.  
**Publicación:**  
**Lugar celebración:** TORDESILLAS **Fecha:** ESPAÑA 2002

**Autores:** MARTÍN-OLIVA D, O'VALLE F, VALENZUELA MT, MUÑOZ-GÁMEZ JA, NUÑEZ MI , RUIZ DE ALMODÓVAR JM, GARCIA DEL MORAL R, OLIVER FJ.  
**Título:** RESISTANCE TO SKIN CARCINOGENESIS IN PARP-1 KNOCKOUT MICE DUE TO A DEFECTIVE INFLAMATORY RESPONSE.  
**Tipo de participación:** PONENCIA ORAL.  
**Congreso:** POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASES AS NOVEL THERAPEUTIC TARGETS. PARP-2003.  
**Publicación:** MEDICAL SCIENCE, VOLUME 9 SUPPLEMENT 1; ABSTRACTS 39, PAG 22.  
**Lugar celebración:** LISBOA **Fecha:** PORTUGAL 2003

**Autores:** MARTÍN-OLIVA D, O'VALLE F, VALENZUELA MT, MUÑOZ-GÁMEZ JA, NUÑEZ MI , RUIZ DE ALMODÓVAR JM, GARCIA DEL MORAL R, OLIVER FJ.  
**Título:** MODULACIÓN DE LA CARCINOGENÉSIS DÉRMICA POR LA INTERACCIÓN PARP-1/NF-KB".  
**Tipo de participación:** PONENCIA ORAL.  
**Congreso:** VI APOREUNIÓN  
**Lugar celebración:** VALLS DE NURIA (GIRONA) **Fecha:** JULIO, 2003

**Autores:** MUÑOZ-GÁMEZ JA, MARTÍN-OLIVA D, VALENZUELA MT, NUÑEZ MI , RUIZ DE ALMODÓVAR JM, OLIVER FJ.  
**Título:** PAPEL DE PARP-1 EN EL MECANISMO DE MUERTE CELULAR POR DOXORUBICINA  
**Tipo de participación:** PONENCIA ORAL.  
**Congreso:** VI APOREUNIÓN  
**Lugar celebración:** VALLS DE NURIA (GIRONA) **Fecha:** JULIO, 2003

**Autores:** MARTÍN-OLIVA D, O'VALLE F, VALENZUELA MT, MUÑOZ-GÁMEZ JA, NUÑEZ MI , RUIZ DE ALMODÓVAR JM, GARCIA DEL MORAL R, OLIVER FJ.  
**Título:** CROSSTALK BETWEEN PARP-1 AND NF-KB MODULATES THE PROMOTION OF SKIN NEOPLASIA.  
**Tipo de participación:** POSTERS.  
**Congreso:** FEBS Advanced Course "Poly-ADP-ribosylation in health and disease "

**Lugar celebración:** DEBRECEN (HUNGRÍA)      **Fecha:** 27-30 AGOSTO 2003

**Autores:** MUÑOZ-GÁMEZ JA, MARTÍN-OLIVA D, VALENZUELA MT, NUÑEZ MI , RUIZ DE ALMODÓVAR JM, OLIVER FJ.  
**Título:** ROLE OF PARP-1 IN THE MECHANISM OF CELL DEATH BY DOXORUBICIN".  
**Tipo de participación:** POSTERS  
**Congreso:** FEBS Advanced Course "Poly-ADP-ribosylation in health and disease "

**Lugar celebración:** DEBRECEN (HUNGRÍA)      **Fecha:** 27-30 AGOSTO 2003

**Autores:** Siles,E., Núñez,M.I., Martínez-Lara,E., Valenzuela,M.T., Muñoz-Gámez, J.A., Martín-Oliva,D, Ménissier-de Murcia,J., Ruiz de Almodóvar,J.M, Oliver,F.J.  
**Título:** Implicación de las proteínas PARP-1 y p53 en la nitración de la MnSOD  
**Tipo de participación:** Poster  
**Congreso:** [XXVI Congreso de la SEBBM](#)

**Lugar celebración:** La Coruña      **Fecha:** 15 -18 Septiembre 2003

**Autores:** Martín-Oliva D, O'Valle F, Muñoz-Gamez JA, Aguilar-Quesada R, Ruiz de Almodóvar M, Garcia del Moral R, Oliver FJ.  
**Título:** Papel de PARP-1 en la regulación de la transcripción en la carcinogénesis dérmica  
**Tipo de participación:** Ponencia oral  
**Congreso:** III Jornadas Oncológicas del Centro de Investigación del Cáncer, I Reunión Temática ASEICA

**Lugar celebración:** Salamanca, del 22 al 24 de Septiembre de 2004

**Autores:** Muñoz-Gamez JA, Martín-Oliva D, Aguilar-Quesada R, Cañuelo A, Nuñez MI, Valenzuela MT, Ruiz de Almodóvar M, de Murcia G, Oliver FJ.  
**Título:** La inhibición de PARP sensibiliza la muerte celular inducida por doxorrubicina en células de cáncer de mama deficientes en p53  
**Tipo de participación:** Ponencia oral  
**Congreso:** III Jornadas Oncológicas del Centro de Investigación del Cáncer, I Reunión Temática ASEICA

**Lugar celebración:** Salamanca, del 22 al 24 de Septiembre de 2004

**Autores:** Aguilar-Quesada R, Muñoz-Gamez JA, Martín-Oliva D, Valenzuela MT, Ruiz de Almodóvar M, de Murcia G, Oliver FJ.  
**Título:** Interacción entre ATM y PARP-1 durante la respuesta a daños en el DNA  
**Tipo de participación:** Ponencia oral  
**Congreso:** III Jornadas Oncológicas del Centro de Investigación del Cáncer, I Reunión Temática ASEICA

**Lugar celebración:** Salamanca, del 22 al 24 de Septiembre de 2004

**Autores:** Nuñez MI, Muñoz-Gamez JA, Villalobos M, Valenzuela MT, Martín-Oliva D, Oliver FJ, Ruiz de Almodóvar M.  
**Título:** Modificación de la radiosensibilidad en líneas celulares tumorales humanas tras tratamiento con 5-aza-CdR.  
**Tipo de participación:** Poster  
**Congreso:** V Congreso Nacional de la Federación de Sociedades Españolas de oncología.

**Lugar celebración:** Valencia, 19 de Noviembre de 2004

**Autores:** Nuñez MI, Muñoz-Gamez JA, Villalobos M, Valenzuela MT, Martín-Oliva D, Oliver FJ, Ruiz de Almodóvar M.

**Título:** Differences in radiosensitivity after 5-aza-2'-deoxycytidine treatment in human tumour cells

**Tipo de participación:** Poster

**Congreso:** ESTRO 23

**Lugar celebración:** Ámsterdam (Holanda), 24-28 de Octubre de 2004

**Autores:** José A. Muñoz-Gámez, David Martín-Oliva, Rocío Aguilar-Quesada, Carmen Ruiz de Almodóvar, Francisco J. Oliver.

**Título:** Regulación de la muerte celular por autofagia a través de PARP-1.

**Tipo de participación:** Poster

**Congreso:** VII APOREUNIÓN

**Lugar celebración:** Miraflores de la Sierra, 29-01 de Junio de 2005

**Autores:** Rocío Aguilar-Quesada , David Martín-Oliva, José A. Muñoz-Gámez, Carmen Ruiz de Almodóvar, Francisco J. Oliver.

**Título:** Interacción entre PARP-1 y ATM en la respuesta a radiación ionizante.

**Tipo de participación:** Poster

**Congreso:** VII APOREUNIÓN

**Lugar celebración:** Miraflores de la Sierra, 29-01 de Junio de 2005

**Autores:** David Martín-Oliva, José A. Muñoz-Gámez, Rocío Aguilar-Quesada, Francisco J. Oliver.

**Título:** Blockade of poly (adp-ribose) polymerase decreases susceptibility to skin carcinogenesis and modulates the expression of tumor-related genes.

**Tipo de participación:** Comunicación Oral.

**Congreso:** PARP 2005: Bench to Beside

**Lugar celebración:** Newcastle, UK, Octubre 2005.

**Autores:** José Antonio Muñoz Gámez; David Martín Oliva; F. Ravassa O'velle; Rocío Aguilar Quesada; Rubén Martínez Romero; Rosa Quiles Pérez; José Mariano Ruiz De Almodovar Rivera; Raimundo García Del Moral Garrido; Francisco Javier Oliver Pozo.

**Título:** PARP-1 AS REGULATOR OF HYPOXIC RESPONSE AND AUTOPHAGIC CELL DEATH

**Tipo de participación:** Comunicación Oral.

**Congreso:** FEBS ADVANCED COURSE, BIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY OF POLY(ADP-RIBOSYLATION)

**Lugar celebración:** Granada, 2006.

**Autores:** José Antonio Muñoz Gámez; David Martín Oliva; Rocío Aguilar Quesada; Rosa Quiles Pérez; Rubén Martínez Romero; María Isabel Nuñez Torres; José Mariano Ruiz De Almodovar Rivera; Francisco Javier Oliver Pozo

**Título:** ROLE OF PARP-1 IN AUTOPHAGIC-LIKE CELL DEATH INDUCED BY DOXORUBICIN

**Tipo de participación:** Póster.

**Congreso:** FEBS ADVANCED COURSE, BIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY OF POLY(ADP-RIBOSYLATION)

**Lugar celebración:** Granada, 2006.

**Autores:** Rosa Quiles Pérez; José Antonio Muñoz Gámez; David Martín Oliva; Rocio Aguilar Quesada; Rubén Martínez Romero; J. Casado; Francisco Javier Oliver Pozo; J. Salmeron ; Angela Ruiz Extremera

**Título:** ROLE OF POLY(ADP-RIBOSE) POLIMERASE-1 (PARP-1) IN THE DEVELOPMENT AND TREATMENT OF THE HEPATOCELLULAR CARCINOMA

**Tipo de participación:** Póster.

**Congreso:** FEBS ADVANCED COURSE, BIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY OF POLY (ADP-RIBOSYLATION)

**Lugar celebración:** Granada, 2006.

**Autores:** Rocio Aguilar Quesada; David Martín Oliva; José Antonio Muñoz Gámez; Rosa Quiles Pérez; Rubén Martínez Romero; José Mariano Ruiz De Almodovar Rivera; Francisco Javier Oliver Pozo

**Título:** SENSIBILITY OF ATM-DEFICIENT CELLS TO PARP INHIBITORS

**Tipo de participación:** Póster.

**Congreso:** FEBS ADVANCED COURSE, BIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY OF POLY (ADP-RIBOSYLATION)

**Lugar celebración:** Granada, 2006.

