



**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología  
Universidad de Granada**

**TESIS DOCTORAL**

**CARACTERIZACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR  
DROGAS INHIBIDORAS DE LA METILACIÓN DEL ADN EN  
CÉLULAS T LEUCÉMICAS**

**Tesis Doctoral presentada por M<sup>a</sup> José Ruiz Magaña para optar al  
título de Doctora por la Universidad de Granada**

**Granada, Abril 2011**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María José Ruiz Magaña  
D.L.: GR 2266-2011  
ISBN: 978-84-694-3609-7



**Dra. M. CARMEN RUIZ RUIZ**, Profesora Titular de Inmunología de la Universidad de Granada

**CERTIFICA:**

Que la presente tesis titulada “**CARACTERIZACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DROGAS INHIBIDORAS DE LA METILACIÓN DEL ADN EN CÉLULAS T LEUCÉMICAS**”, de la que es autora **M<sup>a</sup> JOSÉ RUIZ MAGAÑA**, superó el programa de doctorado “Inmunología” y ha sido dirigida bajo su dirección en la Unidad de Inmunología del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología de la Universidad de Granada.

Revisado el presente trabajo, la directora considera que reúne las condiciones necesarias para ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, expido y firmo el presente certificado en Granada, a 17 de Marzo de 2011.

Fdo. M. Carmen Ruiz Ruiz



**A Juan Jesús,  
María del Valle  
y Lucía Esther**



Por fin ha llegado la hora y estoy sentada para escribir los agradecimientos. Esto significa que ya he terminado de escribir la tesis (hecho que después de todo lo que ha pasado me parece increíble). A la primera persona que voy a nombrar (lo siento si alguien se ofende) es a mi jefa, Mari Carmen. Lo primero es darte las gracias por haber confiado en mí y haberme dado esta oportunidad de trabajar contigo. Eres el equilibrio perfecto entre jefa y amiga, me siento igual de a gusto contigo tratando temas científicos, programando experimentos, que tomando una caña, hecho que para mucha gente resulta increíble. Me has enseñado a ver la importancia de las cosas y a trivializar otras, que lo único que hacen es agobiarme; también me has enseñado a no rendirme, a ser más optimista en los momentos en los que parecía que no salía nada y con tu sonrisa, me he vuelto a poner las pilas. Por si fuera poco todo esto, me has enseñado, como madres que somos, a disfrutar de mis hijos sin agobios. Eres un ejemplo a seguir, trabajadora, comprensiva, exigente contigo misma y en la justa medida con los demás, sabiendo de qué pie cojea cada uno.

En segundo lugar y no por eso menos importante, está Enrique. Eres de las mejores personas que me he cruzado en la vida. Tienes todo lo que se necesita para ser una persona estupenda tanto desde el punto de vista personal como del profesional, inteligente, sencillo, humilde, paciente, divertido (aunque tú siempre digas que eres una persona seria), guapo (?).... Siempre ves la parte buena de la gente, lo de “piensa mal y acertarás” no va contigo, das siempre una oportunidad a quien te lo pide. Y, lo siento (sé que dices que siempre se dice lo mismo), pero tomar contigo una cerveza es siempre gratificante e irse a degustar una buena comida ni te lo digo. Espero seguir compartiendo contigo durante mucho tiempo estos pequeños placeres que nos da la vida.

Ana, contigo todo siempre es fácil. Siempre tienes una palabra de ánimo que te ayuda a seguir tanto en lo personal como en lo profesional, gracias por todo (y tú sabes lo que es todo). Ignacio, tus comentarios en los seminarios siempre son enriquecedores, creo que eres una persona brillante, gracias por tus consejos.

Y ahora viene... MI LABORATORIO. Zule, es una suerte haber coincidido contigo, aunque ya no estés aquí, qué bien lo hemos pasado juntas, las horas de laboratorio han sido más divertidas y las de fuera del laboratorio también. Gracias por



tus consejos, aunque eres más pequeña (o sea, más joven), has sabido decirme y aconsejarme en momentos duros. Tienes un gran corazón. Espero que a pesar de la distancia siempre estés ahí. Ester, qué te voy a decir, GRACIAS, por ser como eres, tu sí que siempre estás ahí para todo, yo creo que sin ti este último año hubiera sido aún más difícil. Si Zule tiene un gran corazón, tú no te quedas atrás. Es una suerte haberte conocido y haber trabajado contigo. Cuando llego al laboratorio y no estás tú, parece que falta algo, sigue así y, por favor, no cambies. Jorge, me has enseñado todo lo que hay que saber para estar en el laboratorio. Eres mi mejor amigo. Hemos reído, llorado, emborrachado y todos los –ados que hay, y que tú y yo sabemos. Te echo de menos, pero sé que algún día volveremos a estar juntos, por lo menos tomando cañas, gracias por todo. Diana, tú y yo hemos compartido muchas cosas, eres divertida, inteligente, gracias a ti muchos experimentos largos y tediosos han sido más llevaderos, espero seguir compartiendo contigo risas, charlas, congresos, cervezas... (o pañales). Raquel, eres la persona que en este último año he conocido mejor, a pesar de que eres la que hace más tiempo que conozco. Eres especial, derrochas dulzura y tienes mucho encanto escondido, que no todo el mundo sabe ver. Gracias por tus consejos y por haberme escuchado en mis momentos de bajón. Compartir laboratorio contigo ha sido un lujo. Gustavo, tus consejos y opiniones siempre me han dado luz y Raúl, gracias por tu interés y tu ayuda en momentos en que no sabía por dónde tirar, eres una persona de ley, cabal y cariñosa.

Por último, Domingo, paciente, cariñoso; Lucía, como tu nombre dice, luz del día, iluminas por donde pasas; Marta, dulce, trabajadora y atenta; Sara, lo que tienes de grande, lo tienes de buenaza; Karina, es una alegría poder haberte conocido y compartir laboratorio contigo.

No me puedo olvidar del laboratorio de Javier Oliver. Javier siempre me has adoptado en tu laboratorio, cuando las cosas se han puesto difíciles. Eres como mi jefe adoptivo. José Manuel, las horas en el microscopio han dado para mucho (que nadie piense mal), eres una gran persona. Gracias también a Andreína, Maribel, Jara y Laura por vuestra paciencia y apoyo.

También tengo que agradecer a Paco Alba y Paco Vives, la oportunidad que me dieron, ya que fuisteis vosotros los que me iniciaron en este trabajo. No me puedo

olvidar de Raquel y Jesús, gracias a los dos por vuestra amistad y confianza, sois buenos en todo, sin vosotros mis principios hubieran sido aburridos, ambos me empujasteis a seguir con todo esto.

Por supuesto tengo que agradecer a mis padres, Paco y Encarna, la educación que me han dado, sin vuestro esfuerzo no habría llegado donde estoy, sois ejemplo de padres que lo han dado todo por sus hijas, incluso cosas que no estaban a vuestro alcance pero que con vuestro esfuerzo y sacrificio las habéis conseguido. A Encarni y Bernardo por vuestro apoyo. Esther, Jesús sin vosotros no lo hubiera conseguido, sois hermanos y también un poco padres, siempre estáis ahí, GRACIAS os quiero un montón. Manolo y Carmen, gracias, sin la ayuda que me prestáis cuidando a mis hijos no hubiera podido escribir esta tesis.

Juan Jesús, te pongo en último lugar porque sabes que tú eres lo más importante que me ha pasado en la vida. Sin ti, el día a día no hubiera tenido sentido. Me has apoyado, me has animado, me has soportado en los momentos que ni yo misma me soportaba. Gracias por tu cariño y creo que puedo decir que este trabajo se ha podido llevar a cabo por tu manera de ver la vida y por supuesto porque has creído en mi. Contigo a mi lado todo es más fácil y divertido.



<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>1. Epigenética</b> .....	5
<i>1.1 Maquinaria de metilación del ADN</i> .....	7
<i>1.2 Maquinaria de acetilación/deacetilación de histonas</i> .....	14
<b>2. Epigenética y cáncer</b> .....	15
<i>2.1 Metilación y cáncer</i> .....	17
<i>2.2 HDAC y cáncer</i> .....	20
<b>3. Drogas epigenéticas y cáncer</b> .....	22
<i>3.1 Inhibidores de la metilación del ADN</i> .....	22
3.1.1 Inhibidores de metilación análogos de nucleósidos.....	23
3.1.2 Inhibidores de metilación no análogos de nucleósidos.....	32
<i>3.2 Inhibidores de HDAC</i> .....	34
<i>3.3 Acción antitumoral de las drogas epigenéticas</i> .....	37
3.3.1 Ciclo celular.....	37
3.3.2 Reparación del ADN.....	38
3.3.3 Apoptosis.....	39
3.3.4 Señalización celular.....	39
3.3.5 Metástasis y angiogénesis.....	41
3.3.6 Inmunomodulación.....	42

<b>4. Apoptosis</b> .....	44
4.1 <i>Maquinaria de muerte celular: caspasas</i> .....	46
4.2 <i>Vías de inducción de apoptosis</i> .....	50
4.2.1 Ruta extrínseca o de los receptores de muerte.....	50
4.2.2 Ruta intrínseca de apoptosis.....	54
4.3 <i>Regulación de la apoptosis</i> .....	61
4.3.1 Inhibidores de caspasas: IAPs y c-FLIP.....	62
4.3.2 Ruta de las Mapas.....	63
4.3.3 Ruta de PI3K.....	66
4.4 <i>Daño al ADN y apoptosis</i> .....	67
4.5 <i>Drogas epigenéticas y apoptosis</i> .....	70
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	73
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	77
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	89
<b>1. Inducción de apoptosis por los inhibidores de metilación del ADN decitabine y zebularine en células T leucémicas</b> .....	91
1.1 <i>Decitabine y zebularine inducen apoptosis de forma selectiva en células T leucémicas</i> .....	91
1.2 <i>Regulación por decitabine y zebularine del ciclo celular y la proliferación en células T leucémicas</i> .....	93
1.3 <i>Decitabine y zebularine inducen apoptosis dependiente de caspasas en células T leucémicas</i> .....	97
<b>2. Caracterización de la ruta de inducción de apoptosis por los inhibidores de las DNMTs decitabine y zebularine en células T leucémicas</b> .....	100

2.1 <i>Decitabine y zebularine activan la vía mitocondrial de inducción de apoptosis.....</i>	100
2.2 <i>La sobre-expresión de Bcl-2 o Bcl-xL inhibe la activación de la ruta mitocondrial y la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine...102</i>	102
2.3 <i>La acumulación de ROS es necesaria para la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en células T leucémicas.....</i>	105
2.4 <i>La caspasa-9 es esencial para la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en células T leucémicas.....</i>	107
<b>3. Decitabine y zebularine inducen daño al ADN en células T leucémicas.....</b>	<b>111</b>
<b>4. Regulación por decitabine y zebularine de la respuesta a TRAIL en células T leucémicas.....</b>	<b>119</b>
4.1 <i>Los inhibidores de DNMTs no facilitan la apoptosis mediada por TRAIL en células T leucémicas.....</i>	119
4.2 <i>El agente desmetilante decitabine no regula la muerte mediada por TRAIL en células de cáncer de mama.....</i>	123
4.3 <i>El tratamiento con decitabine no afecta a la expresión de los receptores de TRAIL en células T leucémicas.....</i>	124
4.4 <i>El ligando de muerte TRAIL no está implicado en la apoptosis inducida por los inhibidores de DNMTs en células T leucémicas.....</i>	126
<b>5. Regulación por decitabine y zebularine de la expresión de proteínas involucradas en la inducción de apoptosis en células T leucémicas....</b>	<b>128</b>
<b>6. Inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en leucemias primarias.....</b>	<b>132</b>
6.1 <i>Respuesta de distintos modelos de neoplasias de células T al tratamiento con decitabine y zebularine.....</i>	133
6.2 <i>Respuesta de distintos modelos de leucemias B al tratamiento con decitabine y zebularine.....</i>	134

<i>6.3 Respuesta de células de leucemia mieloide aguda al tratamiento con el agente desmetilante decitabine.....</i>	<i>140</i>
<b>7. Inducción de apoptosis en células T leucémicas en respuesta al tratamiento combinado con inhibidores de metilación del ADN y otras drogas quimioterapéuticas.....</b>	<b>141</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>149</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>169</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>173</b>
<b>VIII. PUBLICACIONES.....</b>	<b>205</b>

## RESUMEN

Una de las modificaciones epigenéticas más frecuentes asociadas al desarrollo tumoral es la alteración en el patrón de metilación de secuencias CpG en el ADN. La hipermetilación de las regiones promotoras de genes supresores de tumores y genes relacionados con apoptosis origina el silenciamiento de dichos genes favoreciendo así la progresión del tumor. Esto ha despertado un gran interés por el uso de drogas inhibidoras de la metilación en terapia antitumoral.

Los análogos de nucleósidos que inhiben a las ADN metiltransferasas (DNMTs), enzimas responsables de la metilación del ADN, pueden reactivar la expresión de genes silenciados por metilación. Además, pueden inducir daño al ADN, fenómeno que va a contribuir al efecto antitumoral de dichas drogas.

En este trabajo hemos analizado la inducción de apoptosis en células T leucémicas por los inhibidores de DNMTs análogos de nucleósidos decitabine y zebularine. Ambos inhibidores inducen apoptosis dependiente de caspasas en las líneas de células T leucémicas Jurkat, MOLT-4 y CEM-6, todas ellas con p53 mutado. Además, son capaces de inducir apoptosis en células primarias procedentes de pacientes con leucemias de células T, especialmente el zebularine. Sin embargo, linfocitos T normales, en reposo o activados, presentan una gran resistencia a estas drogas. Aunque decitabine y zebularine muestran diferente capacidad para inducir apoptosis y parada del ciclo celular entre las distintas líneas celulares y leucemias primarias, ambos activan la ruta mitocondrial de apoptosis, induciendo la activación de Bak, pérdida del potencial de membrana mitocondrial y producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo este último evento necesario para la inducción de apoptosis. En consecuencia, células Jurkat que sobre-expresan Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub>, o que carecen de caspasa-9, son resistentes a la apoptosis inducida por estas drogas. Todos estos eventos apoptóticos se producen de forma paralela a la inducción de daño al



ADN y a la activación de proteínas implicadas en la respuesta y la reparación de dicho daño. Finalmente, hemos estudiado el efecto de la combinación de decitabine y zebularine con otras drogas quimioterapéuticas, como TRAIL, inhibidores de HDAC, de MAPKs ó de PI3K, encontrando que algunas de ellas presentan interesantes efectos aditivos e incluso sinérgicos con los inhibidores de metilación, lo que sugiere su posible uso combinado en el tratamiento de leucemias de células T.

## ***II. INTRODUCCIÓN***



## ***1. EPIGENÉTICA***

El término epigenética se utiliza para definir los cambios heredables que afectan a la expresión de los genes pero que no van asociados a cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN. Los cambios epigenéticos son importantes en todos los aspectos de la biología, incluyendo la impronta genética, la inactivación del cromosoma X y el establecimiento de la expresión de los genes específicos de tejidos. Las modificaciones epigenéticas están también relacionadas con patologías, siendo un fenómeno clave en la carcinogénesis y en la progresión tumoral (*Yoo & Jones, 2006*).

Las dos principales modificaciones epigenéticas son la metilación anormal de citosinas en el ADN y las modificaciones post-transcripcionales de las histonas.

El ADN es metilado por los enzimas denominados ADN metiltransferasas (DNMTs) en la posición 5 (C5) del anillo de citosina. Esto ocurre casi exclusivamente en un contexto de dinucleótidos CpG, los cuales están poco representados en el genoma global debido a la deaminación espontánea de la 5-metilcitosina en tiamina. El patrón de metilación del ADN se establece durante el desarrollo y se mantiene normalmente a lo largo de la vida de cada individuo. Niveles bajos o pérdida de metilación del ADN en las regiones promotoras de los genes, se relacionan con una expresión activa de los mismos. Aproximadamente el 50% de los genes tienen islas CpG en sus regiones promotoras, las cuales no suelen estar metiladas y son activas transcripcionalmente. Las islas CpG situadas en otros sitios, como el cuerpo del gen o regiones no codificantes del genoma, se encuentran a veces metiladas en tejidos somáticos y no bloquean la elongación de la transcripción (*Yoo & Jones, 2006*). La metilación que se produce en regiones no codificantes del ADN, como la heterocromatina centromérica, parece ser crucial para mantener la conformación y la integridad de los cromosomas.

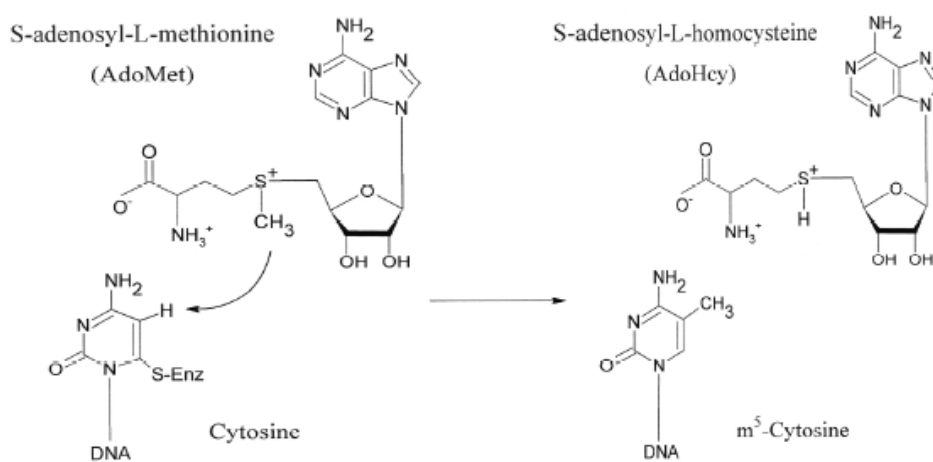
Por el contrario, la metilación situada en puntos cercanos a los sitios de transcripción, va a inhibir la expresión de los genes. Esta inhibición por metilación cercana a los sitios de transcripción, está mediada por el reclutamiento de represores transcripcionales como las proteínas con dominios de unión a metilo (MBDs), las cuales forman parte de un complejo que incluye a las histona deacetilasas (HDACs). La metilación del ADN puede también inhibir directamente la expresión de un gen por bloquear la unión de factores de transcripción.

El ADN está envuelto por un corazón de 8 histonas constituyendo los nucleosomas. Las histonas son proteínas básicas que presentan un núcleo central altamente conservado, de estructura globular (*Luger et al, 1997*) y colas aminoterminales que contienen secuencias variables ricas en lisina y arginina. Estas secuencias actúan como diana de distintas enzimas responsables de modificaciones postraduccionales tales como metilación, fosforilación, ubiquitinación, poli-ADP-ribosilación y acetilación, que van a influir en el grado de compactación de la cromatina (*Luger et al, 1997*) (*Spotswood & Turner, 2002*). De todas estas modificaciones, la de mayor relevancia epigenética es la acetilación, llevada a cabo por las enzimas histona acetil transferasas (**HAT**) que actúan sobre el grupo amino de los residuos de lisina de las histonas (*Johnson & Turner, 1999*). El proceso contrario, la deacetilación, está mediada por las enzimas histona deacetilasas (HDAC). Los grupos acetilo neutralizan las cargas positivas en las colas básicas de las histonas y esto debilita la interacción electrostática entre las histonas y el ADN cargado negativamente. Así, la acetilación de los residuos de lisina en las histonas H3 y H4 se relaciona con una cromatina abierta o “relajada” y activa transcripcionalmente, la cual permite el acceso de los factores de transcripción a los promotores de los genes diana. Por el contrario, la deacetilación de los residuos de lisina, producida por las HDACs, va a dar lugar a una compactación de la cromatina y por tanto a un estado transcripcionalmente inactivo de los genes.

Las modificaciones epigenéticas tienen por tanto efectos diversos, pero van a cooperar e interactuar para establecer y mantener el patrón de expresión de los genes (Razin, 1998; Hashimshony et al, 2003). Los cambios en el patrón epigenético pueden ocasionar inestabilidad genómica.

### 1.1. Maquinaria de metilación del ADN

La metilación de la citosina del anillo de pirimidina en las islas CpG va a regular, como ya se ha dicho, la expresión de genes en vertebrados. La presencia de estas 5-metilcitosinas en el ADN genómico está asociada con procesos de condensación de la cromatina, estabilización de los cromosomas, silenciamiento transcripcional del cromosoma X en hembras, impronta genética y silenciamiento de expresión de genes tejido-específicos. Esta regulación epigenética también está relacionada con la coordinación de la expresión de genes durante la diferenciación celular en la embriogénesis de mamíferos.

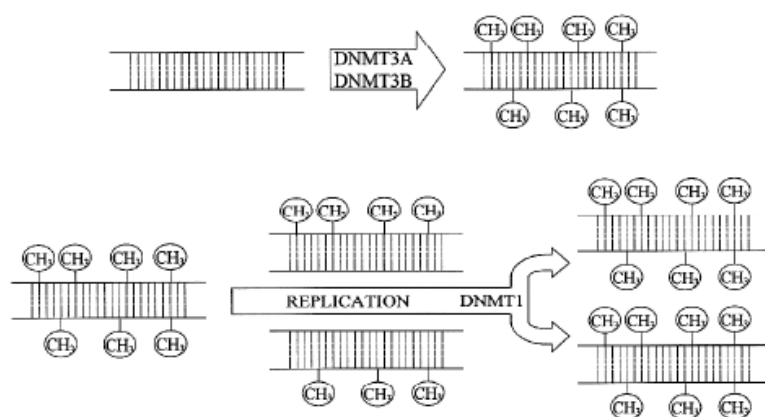


**Figura 1.** Mecanismo por el cual la citosina (C) pasa a 5-metilcitosina (m<sup>5</sup>C) mediante una ADN metiltransferasa que transfiere el grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina. Dibujo obtenido del artículo de J. Turek-Plewa and P. P.Jagodzinski, 2005.

El elemento crítico en la metilación del ADN son las enzimas encargadas de catalizar este proceso, las ADN metiltransferasas (DNMTs). Estas enzimas se encargan de transferir un grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina al carbono 5'

de la citosina para formar una 5'-metilcitosina. La posición 5' de la citosina se dice que es relativamente no reactiva, y su metilación en una solución acuosa neutra es improbable químicamente. El mecanismo de las DNMTs es inusual. *Santi et al, 1983* proponen que la ADN-citosina-metiltransferasa utiliza un mecanismo similar al de la timidilato sintetasa, en el que un enzima cistein tiolato añade covalentemente en la posición 6, empujando un electrón a la posición 5 para dar lugar a un carbanion que atrae un grupo metilo de la molécula donadora (*Bestor, 2000*).

La acción de las ADN metiltransferasas hace que el ADN sea metilado al inicio de la replicación. Sólo la cadena nueva es metilada, y por esta razón los patrones son heredados de una manera semiconservativa y pueden ser perpetuados en la población celular. Se han descrito 5 DNMTs en mamíferos, DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L. De ellas, DNMT1, 3A y 3B parecen ser esenciales para el desarrollo embrionario, ya que se ha comprobado que la pérdida de ellas en ratones es letal (*Luczak & Jagodzinski, 2006*).

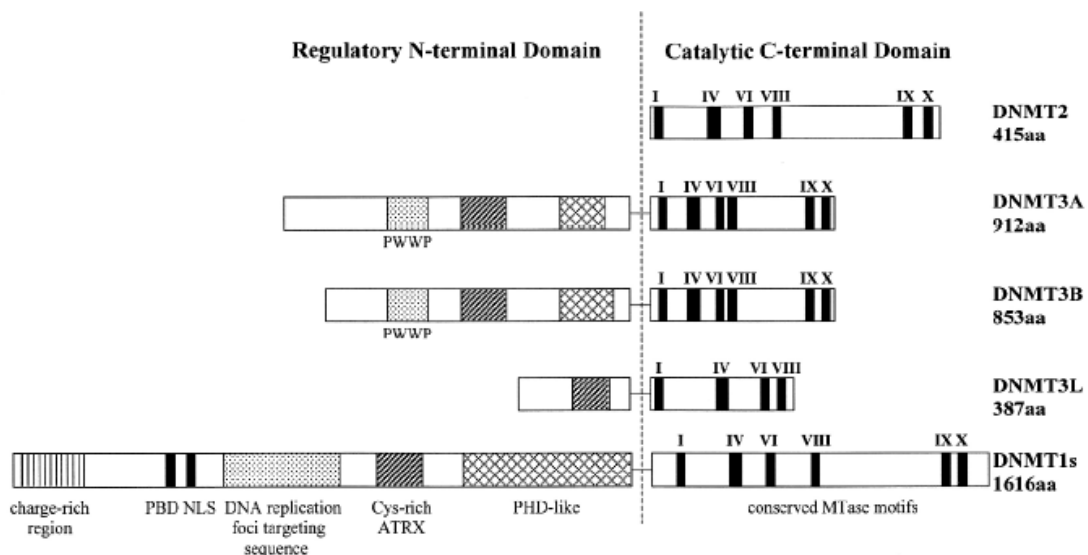


**Figura 2.** Familia de DNMTs. DNMT3A y 3B originan un nuevo patrón de metilación y DNMT1 mantiene el patrón de metilación existente. Figura obtenida del artículo de J. Turek-Plewa and P. P.Jagodzinski, 2005.

DNMT1 es la metiltransferasa más abundante en células somáticas e interactúa con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) (*Villa et al,*

2004); su función principal es metilar preferentemente el ADN hemimetilado durante la replicación y parece ser la responsable del mantenimiento del patrón de metilación existente. Por el contrario, DNMT3A y 3B no parecen mostrar preferencia por el ADN hemimetilado, ya que añaden los grupos metilos a los dinucleótidos CpG de la doble cadena de ADN no metilada, por lo que están implicadas en generar nuevos patrones de metilación.

Las DNMTs en mamíferos contienen, al menos, tres regiones estructurales: un dominio regulador N-terminal que es el responsable de la localización de estos enzimas en el núcleo celular; un dominio catalítico C-terminal, el cual se asemeja al de los enzimas estudiados en procariotas; y una región central que consiste en dipéptidos GK (Araujo *et al*, 2001).



**Figura 3.** Estructura de los miembros de la familia de las DNMTs en mamíferos. Figura extraída del artículo de J. Turek-Plewa and P. P. Jagodzinski, 2005.

El dominio N-terminal tiene un papel regulador y contiene un dominio de unión al antígeno nuclear de proliferación celular (PBD), una señal de localización nuclear (NLS), un motivo de unión al ADN tipo dedo de zinc rico en cisteína (ATRX), un dominio homólogo polibromo (PHD) y un tetrapéptido PWWP de unión a la cromatina (Li, 2002). En la secuencia primaria del dominio catalítico C-terminal de las DNMTs en eucariotas, aparecen diez secuencias



características diferentes, de las cuales seis se encuentran conservadas a lo largo de la evolución y son los motivos I, IV, VI, VIII, IX y X (*Bestor, 2000; Posfai et al, 1989*).

Como ya se ha indicado, **DNMT1** es la principal enzima responsable del mantenimiento del patrón de metilación existente durante la replicación. Este enzima se localiza en la horquilla de replicación y metila la cadena de ADN biosintetizada directamente después de la replicación (*Bird, 2002*). Muestra una actividad *in vitro* de cinco a cuarenta veces mayor frente al ADN hemimetilado que frente al ADN no metilado, por lo que presenta una actividad de metilación *de novo* muy débil, la cual es estimulada por la DNMT3A (*Fatemi et al, 2002; Pradhan et al, 1999*).

La estructura del gen que codifica para la DNMT1 indica que puede provenir de la fusión de un gen de DNMT procariota con un gen de proteína de unión al ADN de mamífero. El dominio N-terminal es esencial para discriminar entre el ADN hemimetilado y el no metilado (*Yoder et al, 1997*) y además puede interactuar con una proteína de unión a DNMT1 reprimiendo la transcripción. Este extremo puede interactuar también con otras proteínas incluyendo PCNA; hSNF2H, miembro de la familia SNF2 relacionado con la remodelación de la cromatina; p21WAF1, inhibidor de kinasas dependientes de ciclina; el factor de transcripción E2F1; HDAC1 y HDAC2 (*Hermann et al, 2004b; Robertson et al, 2004*). Además, el extremo N-terminal puede reconocer MBD1 y MBD3 (proteínas con motivos de unión a metil-CpG), MeCP2 (proteína de unión a metil-CpG) y HP1 (proteína de la heterocromatina) (*Hermann et al, 2004a*). En general, la capacidad y el patrón de interacción de DNMT1 sugieren que esta enzima es un elemento importante en el complejo supresor de la transcripción (*Pradhan & Esteve, 2003*).

La interacción de la DNMT1 con el ADN durante la replicación, a través del dedo de zinc ATRX y el dominio de unión a PCNA, da lugar a una mejor presentación de las secuencias diana (TS) y los dominios PBHD (*Wang & James*

*Shen, 2004*), los cuales estabilizan los focos de replicación e inducen un incremento en la biosíntesis de la nueva cadena (*Easwaran et al, 2004*). Esto indica que DNMT1 forma parte de la maquinaria de replicación del ADN. Se ha relacionado también a la DNMT1 con la integridad genómica y esto se corrobora con el reciente descubrimiento de que es necesaria para una reparación eficiente del ADN. También la inestabilidad que producen los ARN microsatélites se incrementa bajo condiciones en las que hay deficiencia de DNMT1.

La estructura primaria de la DNMT1 humana sugiere que su sitio catalítico está compuesto por 500 aminoácidos y está localizado en el extremo C-terminal, el cual se caracteriza por tener diez motivos conservados de los que los denominados I, IV, VI, VIII y X se relacionan con la unión del enzima a su sustrato. Recientemente se han encontrado distintas isoformas de DNMT1 en células somáticas y en células germinales, tanto masculinas como femeninas (*Mertineit et al, 1998*).

La **DNMT2** es la ADN metiltransferasa de mamíferos más pequeña, compuesta por 391 aminoácidos. Contiene el dominio C-terminal y no posee la región N-terminal reguladora. Su dominio catalítico no tiene actividad metiltransferasa, ni de mantenimiento ni *de novo*, en células precursoras o en células de tejidos somáticos adultos. Estudios realizados con células madre de ratones deficientes en DNMT2 han demostrado que estos ratones parecen normales (*Okano et al, 1998*). Sin embargo, otras investigaciones demuestran que la DNMT2 endógena se puede unir al ADN en células humanas vivas, sugiriendo que podría tener actividad metiltransferasa *in vivo*. Podría decirse que esta enzima tiene una actividad limitada metiltransferasa. Su estructura sugiere que puede estar relacionada con el reconocimiento del ADN dañado, la recombinación del ADN y la reparación de mutaciones. (*Hermann et al, 2004b*).

Las enzimas **DNMT3A** y **DNMT3B** tienen un alto grado de homología aunque son codificadas por distintos genes que están en los cromosomas 2p23 y 20q11.2. Su función, como ya se ha mencionado previamente, es metilar regiones

CpG sin tener preferencia por la hebra hemimetilada, siendo así las responsables de la metilación *de novo* del ADN, particularmente durante la embriogénesis. La actividad de estas enzimas se reduce tras la diferenciación de las células embrionarias y permanece baja en las células de tejidos somáticos adultos (*Bachman et al, 2001*). La expresión de DNMT3A es ubicua en la mayoría de los tejidos, mientras que DNMT3B se expresa en muy bajos niveles en todos los tejidos excepto testículo, tiroides y médula ósea (*Xie et al, 1999*).

Los dominios PWWP de estas enzimas, DNMT3A y DNMT3B, hacen que ambas puedan interactuar con la cromatina, y así la región reguladora tiene la capacidad de unirse a represores transcripcionales. DNMT3A presenta bajos niveles de actividad metiltransferasa comparada con la enzima DNMT1, lo que indica que puede requerir de otras proteínas o cofactores para ejercer una actividad óptima. Además se sabe que tiene preferencia por metilar sitios que están flanqueados por pirimidinas, de modo que aunque induce metilación de regiones CpG, también pueden metilar CpA y CpT pero se desconoce la función de estas metilaciones. Se ha visto que se puede unir al represor RP58, el cual puede estar relacionado con la unión molecular de secuencias específicas de represores transcripcionales y la organización de los cromosomas en el núcleo (*Aoki et al, 1998*); al factor oncogénico PML-RAR, con actividad y unión al ADN aberrantes; o a HP1 $\beta$ , cofactor de receptores androgénicos relacionado con el cáncer de próstata.

DNMT3B está especializada en metilar CpG que están dentro de secuencias repetidas de las regiones satélites pericéntricas de los cromosomas (*Okano et al, 1999*). Las mutaciones dentro del gen que codifica para esta enzima están asociadas a inmunodeficiencias humanas, inestabilidad de los centrómeros y al síndrome de anomalía facial (*Hansen et al, 1999*). Los individuos con este síndrome presentan una mutación en el extremo C-terminal de la enzima y tienen el ADN completamente desmetilado en las regiones pericéntricas de los cromosomas 1, 9 y 16 (*Bestor, 2000*). Esta enzima puede estar asociada a Sin3a, regulador de la transcripción que antagoniza con la actividad oncogénica de

MYC; a condensina, que tiene un papel central en el ensamblaje y segregación de los cromosomas en células eucariotas; a KIF4A, relacionada con el movimiento direccional de los microtúbulos; a hSNF2H, relacionada con la remodelación de la cromatina; y a SUMO-1/Ubc9, relacionada con la progresión del ciclo celular, apoptosis, regulación transcripcional y transporte núcleo-citosol (Geiman et al, 2004; Pradhan & Esteve, 2003). Así, vemos que tanto DNMT3A como DNMT3B están relacionadas con la remodelación de la cromatina y la modulación de la transcripción de genes.

En estudios realizados por Kelly y Trasler se ha observado que DNMT3A es responsable de nuevos patrones de metilación durante el desarrollo prenatal de células germinales masculinas, mientras que DNMT3B se relaciona con el mantenimiento de la metilación *de novo* en las primeras etapas de la mitosis de las células germinales masculinas. Los diferentes papeles de estas enzimas durante la gametogénesis masculina sugieren que ambas son esenciales en este proceso y que no pueden ser sustituidas una por otra.

Un miembro adicional a la familia de DNMT3 es la proteína **DNMT3L** (DNA cytosine-like 5-methyltransferase), que carece de los motivos con actividad metiltransferasa. El gen que codifica para la DNMT3L está localizado en el cromosoma 21q22.3 y es principalmente expresado en la línea germinal femenina post-natal durante la adquisición de los patrones de metilación. La región N-terminal de esta proteína es similar a la de las enzimas DNMT3A y DNMT3B, tiene también una secuencia activa de localización nuclear y un motivo de dedo de zinc ATRX los cuales permiten que esta proteína se transloque al núcleo y se una al ADN, respectivamente (Aapola et al, 2002). En esta enzima se conserva también un motivo tipo PHD a través del cual se asocia con la HDAC1 y la activa. Esto nos indica que la DNMT3L, a pesar de su incapacidad para metilar el ADN, está relacionada con la deacetilación de histonas, la remodelación de la cromatina y la represión transcripcional.

También DNMT3L se puede unir al extremo carboxilo terminal de DNMT3A y DNMT3B aumentando la actividad de estas enzimas y su afinidad de unión al ADN. No se ha visto, sin embargo, que afecte a la actividad de la DNMT1. Se ha postulado que la DNMT3L puede tener un papel en la regulación del establecimiento de la metilación en la impronta genómica, y que la asociación con la HDAC1 podría ser relevante para su funcionamiento. Además se ha visto que participa en la metilación *de novo* en células pluripotenciales pre-meióticas y en el establecimiento de la impronta materna (Yoo & Jones, 2006).

### ***1.2. Maquinaria de acetilación / deacetilación de histonas***

Las **HATs** son complejos multiproteicos de elevado peso molecular en los que además de la subunidad catalítica encontramos una subunidad encargada de controlar la selectividad de sustrato del complejo (Carrozza *et al*, 2003). Así, las HATs van a reclutarse a diferentes regiones de distintos promotores por interacción con proteínas activadoras que determinarán la acetilación de las histonas circundantes. En humanos, podemos clasificar las HATs en tres familias en función de su homología de secuencia y la similitud en sus funciones biológicas: GNAT, MYST y CBP/p300 (Roth *et al*, 2001).

Las **HDACs** actúan formando un complejo con distintas proteínas encargadas del reclutamiento y remodelación de la estructura de la cromatina. La principal señal para la represión de la transcripción mediada por las HDACs se localiza en el propio ADN, a través de los grupos metilo de las citosinas de las islas CpG (Klose & Bird, 2006). A estas regiones se asocian MBPs, que son las responsables directas del anclaje de las HDACs al ADN. En la actualidad, se han descrito hasta 18 HDACs diferentes que pueden clasificarse en tres familias: las HDAC “clásicas” de clase I y II, que difieren en su localización; las HDAC de clase III, que presentan un mecanismo de acción diferente al de las HDAC clásicas; y la HDAC11 que constituye un grupo independiente denominado clase IV.

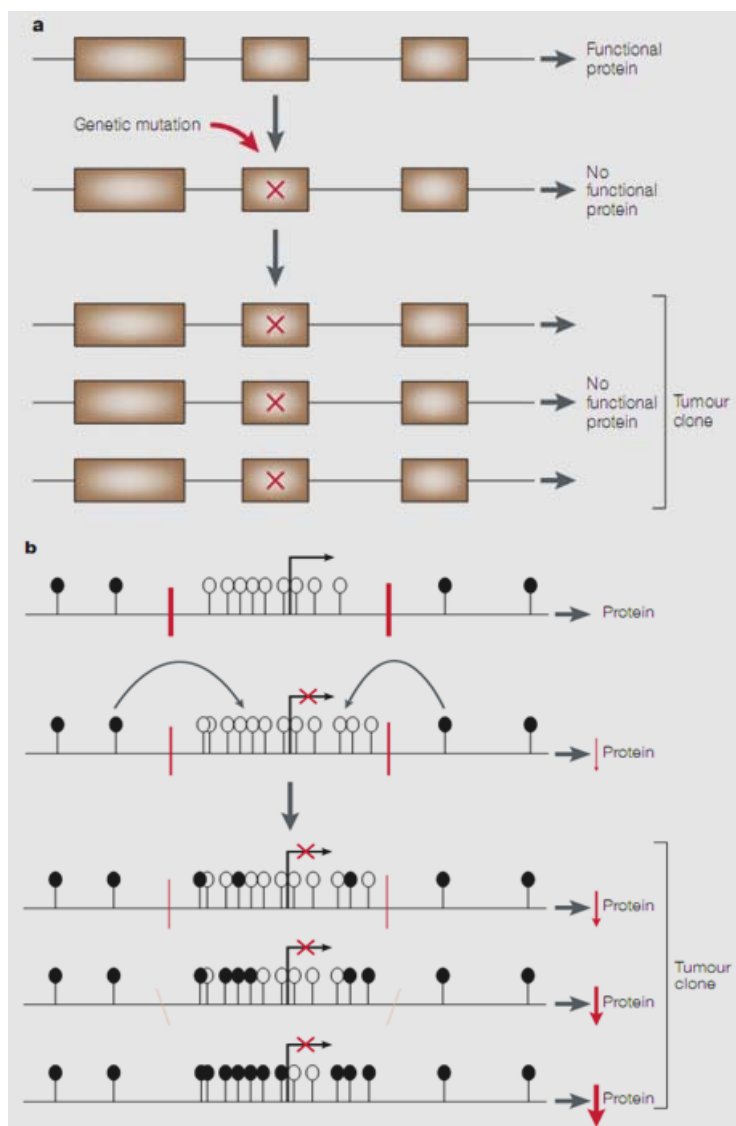
## **2. EPIGENÉTICA Y CÁNCER**

La epigenética del cáncer se refiere a la expresión de un patrón de genes que es estable, se transmite fielmente de las células parentales a las células hijas y no está relacionado con variaciones genéticas y mutaciones. Las alteraciones epigenéticas están vinculadas con estadios tempranos del desarrollo y progresión del tumor; así, se cree que preceden a la transformación neoplásica (*Baylin, 2005*).

El hecho de que se pierda el equilibrio en el balance epigenético va a tener un impacto significativo en la estructura de la cromatina y en la actividad transcripcional. Investigaciones recientes han confirmado que la aparición de algunos cánceres esporádicos, es decir, no heredables, está relacionada con alteraciones epigenéticas, por lo que es importante preguntarse el papel funcional de estos cambios epigenéticos, sabiendo que existe una selección positiva de las células que tienen alterado el epigenoma en los estadios más tempranos del desarrollo del tumor (*Issa, 2004*). Estos cambios moleculares que se observan en la cromatina de las células tumorales son un comienzo para comprender mejor el desequilibrio en el crecimiento de estas células. Por otro lado, estos datos llevan a pensar que el sentido clínico de la epigenética del cáncer sería la prevención, ya que las alteraciones epigenéticas pueden ser utilizadas como futuros biomarcadores de riesgo que nos indican la probabilidad de padecer cáncer y neoplasias de manera temprana (*Sigalotti et al, 2007*).

Pero en general, todos los pasos críticos en el desarrollo del tumor, incluyendo no solo el crecimiento incontrolado de las células sino también la evasión de la apoptosis y la angiogénesis, pueden estar afectados por mecanismos epigenéticos. Algunos genes sufren una pérdida de expresión en células tumorales, de manera que ambos alelos son silenciados, contribuyendo al desarrollo del tumor (*Feinberg et al, 2006*) Las anomalías epigenéticas que se observan en las células tumorales están relacionadas con la inactivación de genes

supresores de tumores, el funcionamiento de factores de transcripción, genes relacionados con la reparación del ADN, con el control del ciclo celular y genes anti-apoptóticos. En conjunto, dichas anomalías impiden una actividad normal de la célula y favorecen el desarrollo del tumor. Un único tumor puede tener varios genes silenciados epigenéticamente (*Ting et al, 2004*).



**Figura 4.** (a) Las mutaciones genéticas ocurren con sólo una vuelta de replicación del ADN y están asociadas a un bloqueo inmediato de la producción de la proteína funcional a partir del alelo mutado. Si además aparece una ventaja selectiva, la mutación se expande clonalmente dando lugar a la formación del tumor. (b) Las mutaciones epigenéticas dan lugar al silenciamiento de un gen de forma gradual. Primero se produce una disminución de la expresión de la proteína; esta disminución en la transcripción da lugar a una disminución en la

*protección de las islas CpG que sufren un incremento en la metilación. De esta modo, se va desarrollando el clon tumoral de una manera progresiva (Jones, 2002).*

Las características de las alteraciones epigenéticas y la necesidad de actividades enzimáticas específicas para mantener los cambios epigenéticos de la célula progenitora, hacen que las alteraciones epigenéticas sean muy diferentes de las alteraciones génicas ya que las epigenéticas pueden ser reversibles mediante el uso de inhibidores de DNMT y HDAC.

Con todos estos datos, es fácil entender que en las últimas décadas los mecanismos genéticos relacionados con el desarrollo y progresión del cáncer hayan dejado de ser la clave en el estudio de la tumorigénesis y numerosas investigaciones se hayan centrado en el conocimiento de las modificaciones epigenéticas como elementos esenciales en la carcinogénesis humana y posibles dianas de la terapia antitumoral.

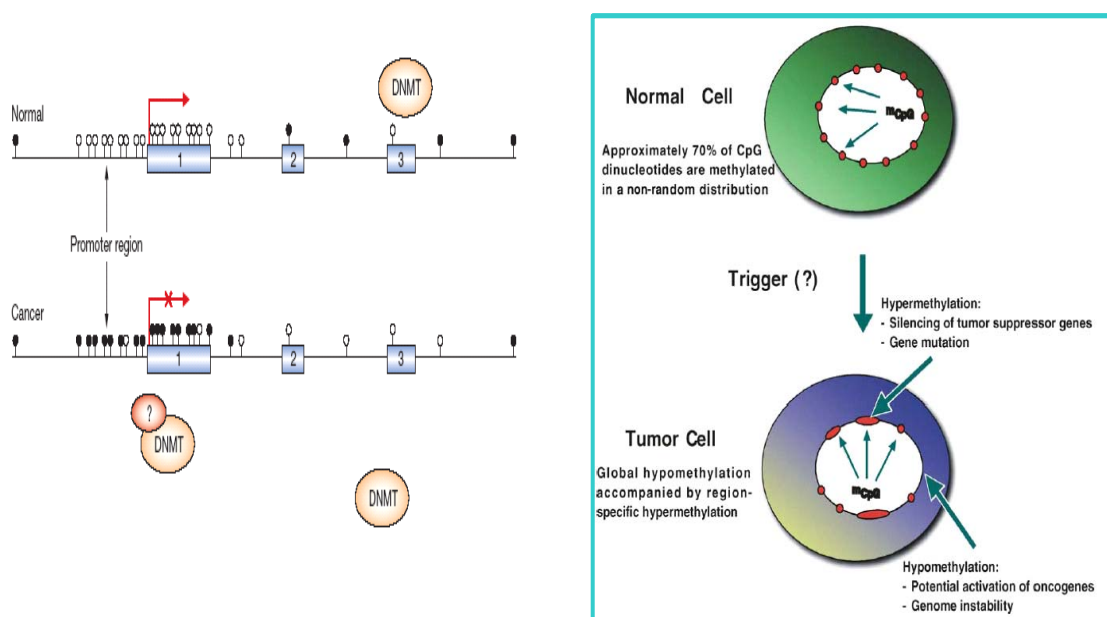
### ***2.1. Metilación y cáncer***

Las células tumorales muestran alteraciones cualitativas y cuantitativas en su perfil de metilación del ADN. El origen de un patrón de metilación alterado, aún no se conoce bien, pero sí se sabe que va a estar relacionado con errores en el reclutamiento de la maquinaria epigenética, expresión de alelos no funcionales, niveles de transcripción de proteínas no adecuados y factores medioambientales. Por otro lado, estudios recientes han revelado que en la tumorigénesis epigenética está implicada una sobreexpresión de DNMT3B. Se han encontrado niveles elevados de este enzima en diversos tipos de tumores, lo que estaría relacionado con un aumento de la metilación del ADN y podría ser clave en el inicio de la tumorigénesis (*Issa, 2004*).

Un prerrequisito para entender la función de la metilación del ADN es conocer su distribución en el genoma. En el reino animal, el nivel y el patrón de



metilación es muy amplio. El nematodo *Caenorhabditis elegans* podría situarse en el extremo más bajo ya que en su genoma se observa la pérdida de 5-metilcitosina y no expresa las DNMTs convencionales (Hung et al, 1999; Tweedie et al, 1997). En otro invertebrado, el insecto *Drosophila melanogaster*, los niveles de 5-metilcitosina observados en su genoma son bajos, comparados con los de vertebrados (Bird, 2002); presenta principalmente dinucleótidos CpT más que CpG, siendo estos últimos la principal diana en la metilación del ADN (Lyko et al, 2000). Sin embargo, en otros genomas de invertebrados se han visto altos niveles de metilación aunque la proporción de ADN metilado es equivalente a la proporción de ADN no metilado y además ambos tipos están perfectamente separados. Esta distribución de la metilación del ADN contrasta con la metilación de vertebrados que está dispersa por todo el genoma. La gran variedad en el patrón de metilación dentro del reino animal nos da información de las diferentes funciones que puede tener esta modificación epigenética.



**Figura 5. Distribución de dinucleótidos CpG en el genoma humano y diferencia de los patrones de metilación entre una célula tumoral y una célula normal. Figura obtenida de J. G. Herman and S. B. Baylin, MD, 2003.**

En la mayoría de los genomas de mamíferos, regiones pequeñas del ADN de aproximadamente 0.5 a 4.0 kb de tamaño son los sitios esperados donde podemos encontrar las islas CpG (Fig. 5) (*Bird, 2002*). Muchos de estos sitios están asociados a las regiones promotoras de aproximadamente la mitad de los genes en el genoma. En una célula normal, la mayoría de los sitios CpG que hay dentro de los genes están metilados, mientras que las islas CpG situadas en las regiones promotoras de los genes no se encuentran metiladas (*Antequera & Bird, 1993*). Este estado de metilación en el grueso del genoma puede ayudar a suprimir transcripciones no deseadas, mientras que el estado no metilado de las regiones promotoras de los genes permite la correcta unión de los factores de transcripción a la cromatina, que dichos genes sea activos transcripcionalmente y se expresen. En una célula tumoral, el patrón de metilación del ADN es diferente (*Esteller et al, 2001*). Muchos sitios CpG del genoma y las regiones codificantes de algunos genes que deberían estar metiladas no lo están y, por el contrario, las que no deberían estar metiladas sí lo están. Estos sucesos en las células tumorales se podrían explicar diciendo que los enzimas encargados de la metilación del ADN están fallando en su función (*Herman & Baylin, 2003*).

El patrón de metilación anormal que se observa en las células tumorales se conoce desde hace ya 20 años. Mientras que en una célula normal aproximadamente el 70% de los dinucleótidos CpG se encuentran metilados con una distribución, como hemos explicado, no aleatoria, en una célula tumoral lo que se observa es una hipometilación generalizada, la cual va a producir una inestabilidad cromosómica que puede reactivar secuencias víricas endógenas y activar ciertos genes, acompañada por hipermetilación de regiones específicas que coinciden normalmente con las regiones promotoras de genes supresores de tumores. Esto conlleva a un silenciamiento transcripcional aberrante. Es por ello de particular importancia la identificación de los genes cuyos promotores aparecen hipermetilados en células tumorales, ya que su silenciamiento le confiere el beneficio de supervivencia a estas células, además de contribuir al fenotipo neoplásico y de facilitar la progresión del tumor por acumulación de cambios epigenéticos y/o genéticos.

Junto al silenciamiento de genes por hipermetilación, la hipometilación generalizada del ADN también influye de forma significativa en la biología de las células cancerígenas, no solo por el incremento en la inestabilidad genómica, sino también porque da lugar a la expresión aberrante de genes relacionados con el desarrollo tumoral. Entre los genes activados por esta hipometilación se ha descrito la reexpresión de antígenos tumorales, la expresión del oncogén gamma-sinucleína y de otros genes relacionados con las metástasis, así como del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (*Gupta et al, 2003; Nakamura & Takenaga, 1998 ; Pakneshan et al, 2003*).

La metilación aberrante de los genes, en definitiva, va a afectar a numerosas funciones celulares que hacen que la célula tenga un crecimiento potencialmente invasivo. Estos genes estarían relacionados con el ciclo celular, reparación del ADN, señalización celular, apoptosis, angiogénesis e invasión y adhesión de las células tumorales. La frecuencia de las modificaciones epigenéticas parece ser similar a la de las mutaciones genéticas y estar relacionada con el estado más temprano de la lesión y la futura transformación de la célula normal en célula tumoral (*Belinsky, 1998; Liang et al, 2002*).

## **2.2. HDAC y cáncer**

Se ha descrito la asociación entre el desarrollo tumoral y alteraciones en la expresión y mutaciones en los genes que codifican las HDAC, ya que dichas alteraciones/mutaciones van a dar lugar a una expresión aberrante de genes que regulan importantes funciones celulares, pudiendo contribuir así al inicio y la progresión del tumor. De entre los procesos en los que intervienen las HDAC podemos destacar los siguientes:

- Proliferación celular: La proteína p21, inhibidora de CDKs, es una de las dianas de la acción de HDACs con mayor relevancia para la progresión del ciclo celular. Su expresión durante el desarrollo se asocia a una hiperacetilación

de las histonas H3 y H4 a nivel del promotor (*Richon et al, 2000*), de forma que la acción de las HDACs, en especial la HDAC1, determina un descenso en la expresión de este inhibidor de la proliferación que puede desembocar en una división celular incontrolada, como se ha observado en distintos modelos tumorales (*Ocker & Schneider-Stock, 2007*).

- **Diferenciación hematopoyética:** La progresión desde células precursoras pluripotenciales hasta células hematopoyéticas maduras requiere de la interrelación de una compleja gama de moléculas. El bloqueo o desregulación de alguno de los pasos de este proceso de diferenciación puede determinar la proliferación de células leucémicas y aquí pueden jugar un papel importante las HDAC. Un ejemplo son los casos de leucemia mieloide aguda (AML) asociados a la formación de la proteína de fusión AML-ETO, como consecuencia de la translocación cromosómica t (8;21). Esta proteína de fusión se une a diferentes HDACs con afinidad variable (*Hiebert et al, 2003*) y así se asocia al ADN provocando un descenso, por deacetilación, en los niveles expresión de ciertos genes como el c-FMS, factor de diferenciación fundamental para macrófagos (*Follows et al, 2003*).

- **Angiogénesis y metástasis:** Entre los genes implicados en la progresión tumoral que son regulados por acetilación y deacetilación de histonas, encontramos algunos relacionados con el proceso de angiogénesis y con el control de la adhesión, migración e invasión celular. Se ha demostrado que la situación de hipoxia localizada en el centro del tumor induce la expresión de HDAC1, y con ello, la represión de p53 así como la inducción del factor inducible por hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) y el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). De este modo HDAC1 regula la angiogénesis (*Kim et al, 2006*). Además, las HDACs de clase I regulan directamente la expresión de la E-cadherina, proteína fundamental en el proceso de adhesión y cuya pérdida determina la invasión epitelial, primera fase de la metástasis (*Peinado et al, 2004*).

- Regulación de factores de transcripción: Existen diversas proteínas no histonas que son susceptibles de modificación por acetilación y deacetilación por las HATs y HDACs, respectivamente, alterando su función, capacidad de interacción proteína-proteína, estabilidad y localización (*Glozak et al, 2005*). Entre ellas se encuentran factores de transcripción, cuya acetilación parece jugar un importante papel en la oncogénesis. Por ejemplo, en respuesta a diferentes tipos de daño en el ADN se produce la acetilación de p53 por el complejo p300/CBP, incrementándose así la capacidad de unión de este gen supresor de tumores a secuencias específicas situadas en ciertos genes, y por tanto su acción como factor de transcripción. La actividad y estabilidad de NF- $\kappa$ B, factor de transcripción que interviene en el desarrollo de una gran diversidad de procesos oncológicos en humanos, también se encuentra regulada por procesos de acetilación y deacetilación a distintos niveles (*Basseres & Baldwin, 2006*).

### **3. DROGAS EPIGENÉTICAS Y CÁNCER**

Estudios recientes han demostrado que, al contrario de lo que ocurre con los cambios genéticos, las alteraciones epigenéticas pueden ser revertidas mediante el uso de agentes farmacológicos que inhiben a las enzimas implicadas en dichas alteraciones, como son las DNMTs o las HDACs. La posibilidad de revertir el estado de metilación del ADN o la deacetilación de histonas en células tumorales sugiere el uso de las llamadas drogas epigenéticas, bien solas o en estrategias combinadas, como terapia antitumoral (*Brueckner et al, 2005*)

#### **3.1. Inhibidores de metilación del ADN**

La terapia epigenética puede restaurar el patrón normal de metilación del ADN y prevenir que las células tumorales silencien genes cruciales para el buen funcionamiento celular. Así, el tratamiento de células tumorales con agentes

desmetilantes puede reactivar genes que controlan la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y otros mecanismos homeostáticos.

Existen dos grupos de inhibidores de las DNMTs: los análogos y los no análogos de nucleósidos.

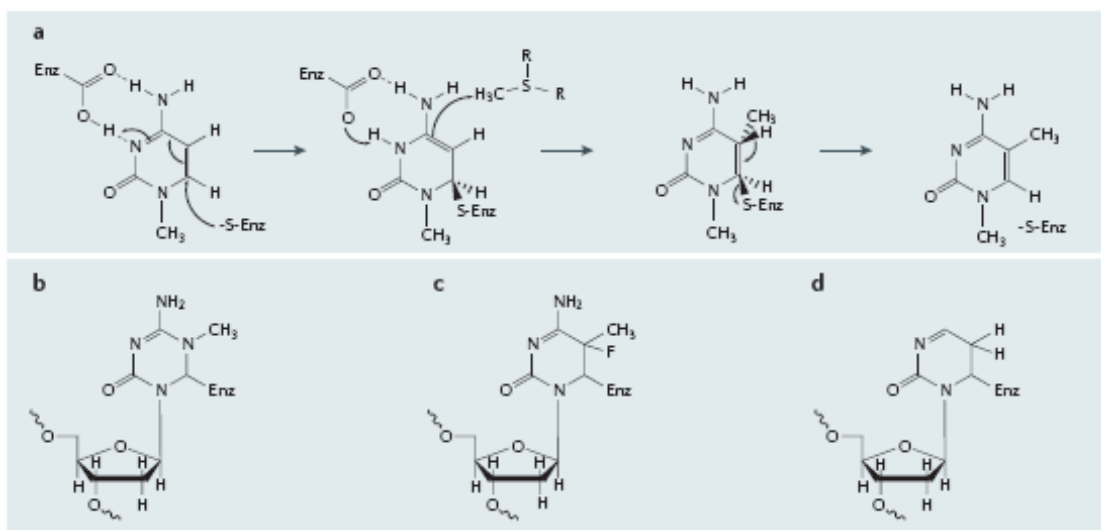
### ***3.1.1. Inhibidores de metilación análogos de nucleósidos***

Los análogos de nucleósidos con función inhibidora de la metilación del ADN se caracterizan porque tienen un anillo de citosina modificado unido a una ribosa o una desoxiribosa. Son metabolizados por proteínas quinasas que convierten los nucleósidos en nucleótidos para su incorporación en el ADN o en el ARN. La metilación del ADN se inhibe cuando estos compuestos son incorporados en el ADN.

Los análogos de ribonucleósidos, como la 5-azacitidina (5-Aza-CR) y el zebularine, son fosforilados principalmente por la uridin/citidin quinasa y otras quinasas para que puedan finalmente incorporarse en el ARN. Los efectos de la incorporación de estos compuestos en el ARN no se han estudiado en profundidad. Sin embargo, los ribonucleótidos difosfato pueden ser reducidos por una ribonucleótido reductasa a desoxi-difosfato, los cuales, de esta forma, pueden ser incorporados en el ADN (*Yoo & Jones, 2006*). Los análogos de desoxiribonucleósidos como la 5-Aza-2'-deoxicitidina (5-Aza-CdR, decitabine) y la 5-fluoro-deoxicitidina (5-F-CdR) son fosforilados por una deoxicitidin quinasa y otras quinasas para que puedan ser incorporados en el ADN.

La manera en la que los análogos de citosinas impiden la metilación del ADN es la siguiente: durante la replicación del ADN, la DNMT tira del anillo de citosina en la doble hélice para formar un complejo intermediario en el cual la S-adenosil-L-metionina (Ado-Met) es incorporada (*Wu & Santi, 1987*). En un anillo de citosina normal, el grupo metilo es transferido desde la Ado-Met al carbono 5 de la base, el enzima es liberado del sustrato por una reacción de  $\beta$ -eliminación y se mueve hasta el próximo sitio CpG. En el caso de los análogos

de nucleósidos como el decitabine, con modificación del carbono 5 del anillo, la ausencia del átomo de hidrógeno da lugar a la formación de un complejo covalente que impide la liberación del enzima, reduciéndose así los niveles disponibles de la misma (*Santi et al, 1984*).



**Figura 6. Mecanismo por el cual los análogos de citosinas impiden la metilación del ADN.** a) Transferencia normal del grupo metilo al ADN. b) Estructura de la azacitidina y el decitabine, que inhibe a la DNMT impidiendo que el enzima transfiera su grupo metilo al ADN. c) Estructura del 5- fluoro-2'- deoxicitidina. d) Estructura del zebularine. Figura obtenida de C. B. Yoo and P. A. Jones, 2006.

En el caso del 5-F-CdR, la inhibición es mediada por la presencia de un átomo de fluor en el carbono 5, el cual previene la liberación del enzima. Y con el zebularine, los complejos covalentes persisten debido a la ausencia de un grupo amino en el carbono 4. Se ha comprobado que los complejos covalentes pueden formarse en ausencia o presencia de la Ado-Met, por lo que esta molécula no es esencial en el mecanismo de inhibición de la DNMT (*Jones & Taylor, 1980*). Trabajos recientes sugieren que las DNMTs inhibidas se convierten en diana y pueden ser degradadas por el proteosoma tras el

tratamiento con los análogos de nucleósidos (*Patel et al,2010; Yoo & Jones, 2006*).

Estos mecanismos impiden por tanto que el genoma de la célula sufra más metilaciones y en la progenie celular el ADN no estará metilado. Es interesante resaltar que los agentes desmetilantes no ejercen sus efectos en la célula de manera inmediata como los agentes quimioterapéuticos sino que necesitan que la célula prolifere para así reactivar genes que han sido silenciados por metilación. La limitación que existe para estas drogas es precisamente este requerimiento de que el ADN esté en proceso de replicación para ejercer su acción. Esto hace que no sean eficaces en células que no están proliferando, como células pluripotenciales que pueden ser potencialmente tumorales.

Estos inhibidores de metilación son efectivos a dosis bajas y tienen baja toxicidad, pero sus efectos son pasajeros porque el patrón aberrante de metilación vuelve y así la población de células tumorales reaparece (*Issa et al, 2005*).

La azacitidina y el decitabine son los dos principales análogos de nucleósidos que se utilizan como drogas antitumorales y pueden inducir diferenciación celular e inhibición de la metilación del ADN. Estos agentes son extremadamente potentes para inhibir la metilación del ADN a concentraciones micromolares, sin embargo su baja estabilidad en soluciones acuosas y su citotoxicidad complican la efectividad de estas drogas (*Stresemann et al, 2006*).

La **azacitidina** se diferencia de los citidin nucleósidos por tener un átomo de nitrógeno en el carbono 5. Esta droga es muy poco estable ya que se hidroliza rápidamente en soluciones neutras y medio básicas. Se incorpora principalmente al ARN y es muy citotóxica. En modelos de tumores sólidos y hematopoyéticos este inhibidor es eficaz ya que se ha demostrado que mejora la vida de ratones con leucemia. También se ha comprobado que induce desmetilación y diferenciación celular en líneas celulares leucémicas. Por otro lado, se ha comprobado que causa hipometilación del gen de la  $\gamma$ -globina e induce la producción de hemoglobina fetal en humanos y babuinos. En la fase I de estudio



se comprobó que originaba mielosupresión dependiendo de la dosis a la que se usase, produciendo principalmente granulocitopenia. Otros efectos que se observaron en los pacientes eran náuseas y vómitos. La excreción de la droga se produce principalmente por vía renal (*Goffin & Eisenhauer, 2002*).

La **5-Aza-2'-deoxicitidina (decitabine)**, fue por primera vez sintetizada en 1964 y su potente actividad antileucémica fue analizada en 1968. Se diferencia de los deoxicitidin nucleósidos naturales por la presencia de un átomo de nitrógeno en la posición 5 del anillo de citosina. Estudios preclínicos demostraron que esta droga es un agente antileucémico más potente que el arabinósido de citosina (*Jones & Taylor, 1980; Momparler & Bovenzi, 2000*); así se iniciaron las primeras pruebas clínicas en leucemias agudas. Se comprobó que tras la administración intravenosa de decitabine, la unión a proteínas plasmáticas era despreciable, pero su distribución por los fluidos corporales había sido muy buena. Debido al sistema de transporte de nucleósidos se va a producir un equilibrio rápido entre los compartimentos extra e intracelulares. La vida media del decitabine en plasma, tras su administración intravenosa, es aproximadamente de 35 minutos debido a la rápida deaminación producida por los altos niveles de citidin deaminasa. Se comprobó también que el decitabine puede atravesar la barrera hematoencefálica tras una administración continuada (*Jabbour et al, 2008*).

Los estudios realizados con esta droga demuestran que, a altas dosis, la citotoxicidad observada es debida a su unión al ADN y a su capacidad para inducir daño al ADN. Inhibe el crecimiento celular en los estudios realizados en líneas celulares tumorales y puede inducir diferenciación morfológica y funcional en células leucémicas humanas (*Pinto et al, 1984*). Sin embargo, a dosis más bajas es cuando se observa su efecto antitumoral debido a su capacidad para inhibir la hipermetilación del ADN y reactivar genes supresores de tumores.

El estudio original identificó que la dosis máxima tolerada estaba entre 1500-2250 mg/m<sup>2</sup> por periodo de tratamiento. Esta dosis estaba limitada por la

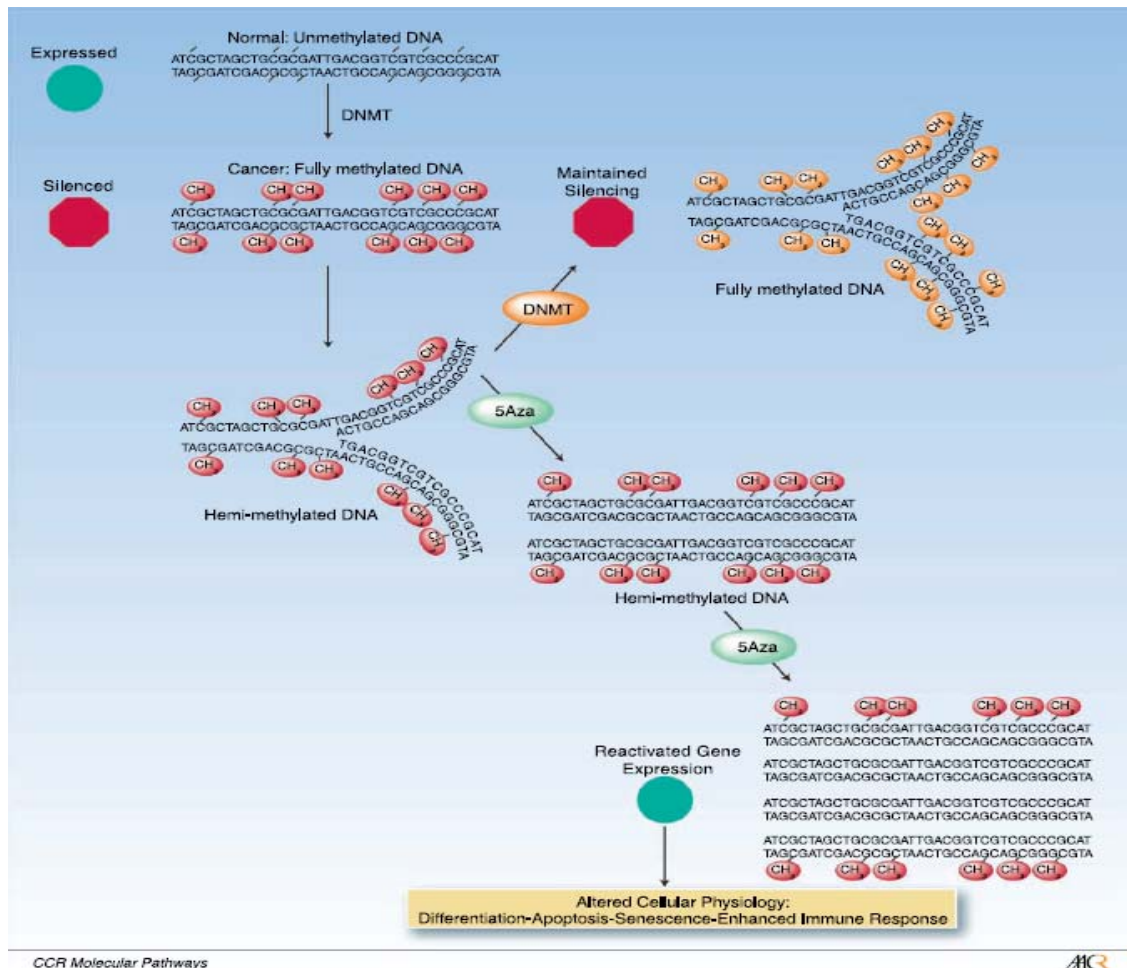
toxicidad, produciendo mielosupresión. Además, estos estudios iniciales fueron decepcionantes en tumores sólidos. Los primeros estudios clínicos que han utilizado el decitabine a dosis altas, han demostrado que como terapia única no es muy eficaz en tumores sólidos. Los estudios realizados en cánceres colorectales, adenocarcinomas, cánceres de cuello, melanomas, carcinomas renales, etc, han demostrado que el decitabine induce toxicidad en los pacientes produciendo mielosupresión, náuseas y vómitos. Y a pesar de utilizarse dosis elevadas, no se produce remisión del tumor en los pacientes (*Abele et al, 1987*).

Actualmente se están llevando a cabo estudios para ajustar las dosis y el tiempo de administración, de forma que no produzcan efectos secundarios tan fuertes, así se están consiguiendo pautas de administración bien toleradas, aunque producen neutropenia (*Abele et al, 1987; Aparicio et al, 2003*). Para algunos tumores, como es el caso del melanoma o del carcinoma renal, también se está utilizando decitabine previo a la administración de interleuquina-2 (IL-2), que induce apoptosis por estimulación de los linfocitos, ya que presentan resistencia dicha inducción de apoptosis, quizá debido a una baja expresión de proteínas apoptóticas. La administración de decitabine anterior a la de IL-2 hace que aumente la expresión, en algunos casos, de estas proteínas pro-apoptóticas (*Abele et al, 1987; Gollob et al, 2006*).

El hecho de la baja actividad del decitabine en tumores sólidos, ha llevado a seguir investigando en la combinación con otros fármacos que puedan mejorar el efecto sobre este tipo de tumores.

Donde sí son prometedores los resultados es en el modelo de leucemia mieloide aguda, síndromes mielodisplásicos y leucemia mieloide crónica (*Santini et al, 2001*) (*Issa & Byrd, 2005*). Tras un mejor conocimiento de los efectos hipometilantes y un uso óptimo de la posología se pasó a ensayos de fase III en el año 2000, y así finalmente fue aprobado su uso por la FDA para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y de síndromes mielodisplásicos en el 2006 (*Jabbour et al, 2008*). Actualmente se están llevando a cabo estudios clínicos con

dosis bajas de este inhibidor de DNMTs en tumores sólidos, incluyendo melanoma, cáncer de mama, renal, de colon y de vejiga.



**Figura 7. Mecanismo de acción de los inhibidores de las DNMTs propuesto en la terapia del cáncer.** Se propone un gen supresor de tumores hipotético que aparece silenciado en el tejido tumoral y se expresa en el tejido normal. La DNMT se encarga de mantener el estado hipermetilado del gen, después de cada ciclo de replicación. El inhibidor de la DNMT va a producir un fallo en la metilación del gen después del ciclo de replicación, lo que da lugar a la desmetilación completa de los alelos y así a la reactivación de la expresión del gen. Figura obtenida de J.P. Issa, 2007.

Para evitar los problemas de estabilidad de la 5-azacitina, Beisler y colaboradores propusieron el uso de la **dihidro-5-azacitidina** (DHAC) que es hidrolíticamente más estable y además menos tóxica que la 5-azacitidina (Beisler

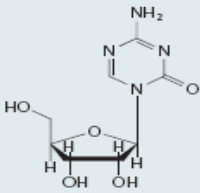
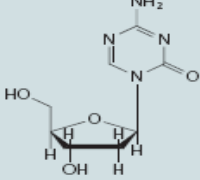
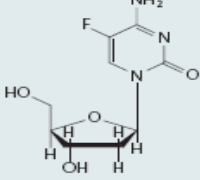
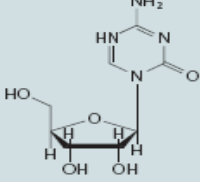
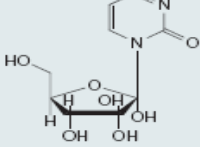
*et al, 1979*). Se ha demostrado que es un inhibidor de la metilación del ADN en linfomas humanos y en líneas celulares leucémicas así como en modelos animales de ratones. También se ha comprobado, en líneas celulares de leucemia y cáncer de ovario, que tiene la capacidad de afectar a la progresión del ciclo celular desacelerándolo. Al comparar sus efectos desmetilantes con los de azacitidina y decitabine se observa que es un compuesto menos potente. La eficacia de la DHAC se demostró en estudios de fase I y II, pero no ha habido una continuidad en la investigación de sus efectos en estudios clínicos y actualmente las investigaciones con este compuesto se han paralizado.

La **5-F-CdR** es otro análogo de citosina con propiedades desmetilantes y antitumorales. Aunque está en fase I de estudio, su complicada actividad metabólica en mamíferos parece ser un problema para su uso en clínica.

El **zebularine** o 1- $\beta$ -D-ribofuranosil-2(1H)-pyrimidinone es la incorporación más reciente a la lista de agentes desmetilantes. Se sintetizó en 1961 y se caracterizó como un potente inhibidor de la citidin deaminasa con propiedades antitumorales. Pero su actividad desmetilante no fue reconocida hasta el año 2003. Es estable en medios con pH neutro y ácido y en soluciones acuosas. Tiene una vida media de 44 h a 37°C en PBS a pH 1.0 y aproximadamente de 508 horas a pH 7.0, haciendo posible su administración oral. De hecho, administrado por vía oral, se ha demostrado que el zebularine causa desmetilación y reactivación del gen p16 silenciado por hipermetilación en células humanas que proceden de tumor de vejiga en ensayos *in vivo* con ratones nude. Se ha comprobado también que el zebularine tiene una mínima citotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se puede dar de forma continuada a bajas dosis y así mantener el estado de desmetilación por un periodo prolongado, hecho que sólo es posible dada su baja toxicidad (*Yoo et al, 2004*).

La azacitidina y el decitabine están sujetos a deaminaciones por la citidin deaminasa y deoxicitidin deaminasa respectivamente quedando así inactivados. Por el contrario el zebularine, al actuar como un inhibidor de la enzima citidin

deaminasa, no está sujeto a su inactivación por este enzima (*Herranz et al, 2006*). Con todos estos datos se piensa que un tratamiento combinado, administrando de forma transitoria decitabine y de manera continua zebularine, puede dar una mejor respuesta en la inhibición de la metilación del ADN y puede ser por tanto una estrategia interesante en la terapia antitumoral (*Billam et al*).

Inhibitor	Structure	Dose range
5-Azacytidine		$\mu\text{M}$
5-Aza-2'-deoxycytidine		$\mu\text{M}$
5-Fluoro-2'-deoxycytidine		$\mu\text{M}$
5,6-Dihydro-5-azacytidine		$\mu\text{M}$
Zebularine		$\mu\text{M}$ –mM

*En fase I,II,III de estudio clínico para enfermedades hematológicas*

*En fase I,II,III de estudio clínico para enfermedades hematológicas y cáncer de pulmón y cervical.*

*En fase I de estudio clínico.*

*En fase I,II de estudio clínico en cáncer de ovario y linfomas.*

*En estudios preclínicos*

**Figura 8. Inhibidores de DNMTs análogos de nucleósidos en estudios clínicos.** Figura obtenida de C. B. Yoo and P. A. Jones, 2006.

La preferencia del zebularine por células tumorales se ha demostrado en un estudio comparativo con fibroblastos normales. En dicho estudio se comprueba que el zebularine se incorpora al ADN de forma lineal en el tiempo, y lo hace con

una tasa de incorporación mucho más rápida en líneas celulares de cáncer que en células normales. Es posible que este hecho se deba a que el zebularine, para activarse e incorporarse al ADN, necesita la acción de la enzima uridin-citidin kinasa y se ha demostrado que la expresión de esta enzima es mucho mayor en células tumorales que en células normales (*Cheng et al, 2004*).

En relación con los efectos de zebularine sobre células tumorales, se sabe que su incorporación al ADN da lugar a una inhibición del crecimiento, acompañada de un incremento en la expresión de genes relacionados con el ciclo celular, efecto que no se observa en las células normales (*Cheng et al, 2003*). Se ha descrito además que tiene capacidad para inducir la expresión de genes relacionados con antígenos tumorales y con apoptosis, por lo que puede ejercer un efecto antitumoral, sólo o combinado con inmunoterapia, induciendo la muerte por apoptosis, entre otros mecanismos moleculares (*Cheng et al, 2004*).

Estudios realizados por Yoo y colaboradores, muestran, mediante ensayos con un modelo de tumorigénesis en ratón, que la administración oral de zebularine tiene una gran poder en la prevención del tumor (*Yoo et al, 2004*). Además, encuentran que los ratones tratados con zebularine tienen menos esplenomegalia o anemia que los ratones control, sugiriendo que esta droga puede tener otros efectos beneficiosos, además de la inducción de hipometilación en este modelo de ratón.

A pesar de todos estos trabajos, los efectos del zebularine y su mecanismo de acción como agente antitumoral no están del todo claros. Por ejemplo, se sabe que para obtener niveles semejantes de desmetilación a los que se obtienen con decitabine, se necesitan concentraciones más elevadas de zebularine. Esto puede ser debido a que al inhibir la citidin deaminasa, la mayor parte del zebularine es secuestrado por esta enzima y esto puede reducir la concentración efectiva del fármaco para ejercer su función como inhibidor de DNMTs (*Yoo et al, 2004*).

### ***3.1.2. Inhibidores de metilación no análogos de nucleósidos***

Se han descrito una gran variedad de compuestos inhibidores de la metilación que no son análogos de nucleósidos, pero sólo con unos pocos se han realizado estudios clínicos. Actualmente se está investigando activamente en dichos compuestos ya que al ser moléculas pequeñas que inhiben la metilación por unión directa a la región catalítica de las enzimas DNMTs o por otros mecanismos, pero que en cualquier caso no requieren incorporarse al ADN, evitan el daño producido por las drogas que sí se incorporan al ADN y los efectos colaterales de dicho daño.

**RG108** es una molécula inhibidora diseñada específicamente para unirse al sitio catalítico de la enzima DNMT1 inactivándola. Se ha descrito su capacidad para reactivar genes silenciados epigenéticamente en líneas celulares de cáncer de colon y, al mismo tiempo, parece no alterar el estado de metilación de las zonas centroméricas. De esta manera se puede asegurar la estabilidad cromosómica y la desmetilación del ADN (*Brueckner et al, 2005*).

Las **psammapiinas**, derivados de la bromotirosina que se extraen de la esponja marina *Pseudoceratina purpurea*, pueden inhibir tanto a las ADN metiltransferasas como a las histonas deacetilasas, aunque su mecanismo de acción no se conoce con exactitud.

El galato de epigallocatequina (**EGCG**), un polifenol procedente del extracto de té verde, se ha comprobado que tiene actividad preventiva del desarrollo de tumores, y la capacidad para inhibir directamente a las ADN metiltransferasas, uniéndose al sitio catalítico del enzima y reactivando así el silenciamiento de genes supresores de tumores como p16 (*Chuang et al, 2005*). También **polifenoles del café**, como el ácido cafeico y el ácido clorogénico, pueden funcionar como agentes desmetilantes al inducir un incremento en la producción de S-adenosil-L-homocisteína, inhibidor potente de la metilación del

ADN. Pero estos compuestos aún no se utilizan en estudios clínicos (*Moyers & Kumar, 2004; Park & Surh, 2004*).

La **hidralazina** es otro compuesto que pertenece a este tipo de drogas. Su actividad desmetilante se analizó por primera vez en 1988. Es un vasodilatador que se utiliza en clínica como fármaco contra la hipertensión. Los estudios realizados han demostrado que además disminuye la expresión de las ADN metiltransferasas, concretamente de la DNMT1 y DNMT3A, e induce autoinmunidad (*Chuang et al, 2005*). Parece ser que su mecanismo de acción consiste en formar complejos con la doble hélice del ADN, favoreciendo de esta manera la transición de la estructura B del ADN a la Z y evitando así que las DNMTs accedan a sus sustratos. La hidralazina está en fase I de ensayos clínicos para el tratamiento del carcinoma cervical.

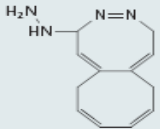
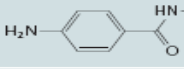
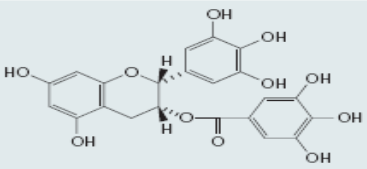
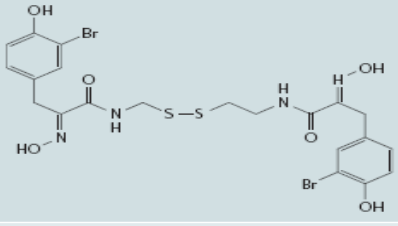
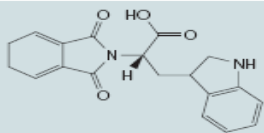
La **procainamida**, aprobada por la FDA para el tratamiento de arritmias cardíacas, y la **procaina**, anestésico local, han demostrado un efecto inhibitor de la actividad de las ADN metiltransferasas, induciendo la recuperación de la expresión de genes supresores de tumores a concentraciones a las que casi no se altera la metilación global del ADN, lo que podría dar lugar a una parada de crecimiento y/o muerte de las células tumorales con un bajo riesgo de inducir inestabilidad cromosómica en células sanas. La procaina es un compuesto menos tóxico que el decitabine, además de ser estable en soluciones acuosas (*Chuang et al, 2005*).

**MG98** es un oligonucleótido antisentido que se une al ARNm de la DNMT1 humana impidiendo la traducción. Se ha demostrado que tiene actividad antitumoral en varios tipos de tumores sólidos, reactivando la expresión de genes supresores de tumores y genes relacionados con el control del ciclo celular, que están silenciados epigenéticamente. Su uso diario y continuo parece ser más activo y menos tóxico que cuando se utiliza a dosis intermitentes, ya que su mecanismo de acción parece ser más citostático que citotóxico. Los efectos debidos a la dosis han sido observados en estudios de fase I. Actualmente se



están desarrollando los estudios de fase II. Su combinación con IFN- $\alpha$  en ensayos clínicos está dando muy buenos resultados en células de carcinoma renal, además de ser clínicamente segura (Amato, 2007).

En general, el principal inconveniente de todas estas drogas es que no parecen ser inhibidores tan potentes de la metilación del ADN como lo son los análogos de nucleósidos.

Inhibitor	Structure	Dose rang	
Hydralazine		$\mu\text{M}$	<i>En fase I de estudio clínico utilizado en cáncer cervical</i>
Procainamide		$\mu\text{M}$	<i>En fase preclínica de estudio</i>
EGCG		$\mu\text{M}$	<i>En fase preclínica de estudio</i>
Psammaplin A		nM- $\mu\text{M}$	<i>En fase preclínica de estudio</i>
MG98	N/A	N/A	<i>En fase II de ensayo clínico</i>
RG108		$\mu\text{M}$	<i>En fase preclínica de estudio</i>

**Figura 9. Inhibidores de DNMTs no análogos de nucleósidos en estudios clínicos.** Figura obtenida de C. B. Yoo and P.A. Jones, 2006.

### 3.2. Inhibidores de HDAC

Se han descrito un gran número de inhibidores de la actividad enzimática de las distintas HDACs (HDACi), tanto de origen natural como derivados sintéticos,

que inducen parada de ciclo celular, diferenciación o apoptosis en células tumorales en cultivo y en modelos animales (*Johnstone, 2002*). Dichos inhibidores presentan diferentes tipos de estructuras por lo que podemos distinguir los siguientes grupos:

### ***Ácidos Hidroxámicos***

La tricostatina A o **TSA** fue el primer hidroxamato descrito con capacidad de inhibición de una amplia gama de HDACs (*Yoshida et al, 1990*). Pero es el vorinostat o **SAHA**, inhibidor de HDACs de clases I y II, el único ácido hidroxámico aprobado actualmente por la FDA para ser utilizado en el tratamiento del linfoma T cutáneo, habiendo superado los ensayos de fase II en los que ha demostrado su seguridad y eficacia, presentando una respuesta positiva en el 25% de los casos (*Duvic et al, 2007*).

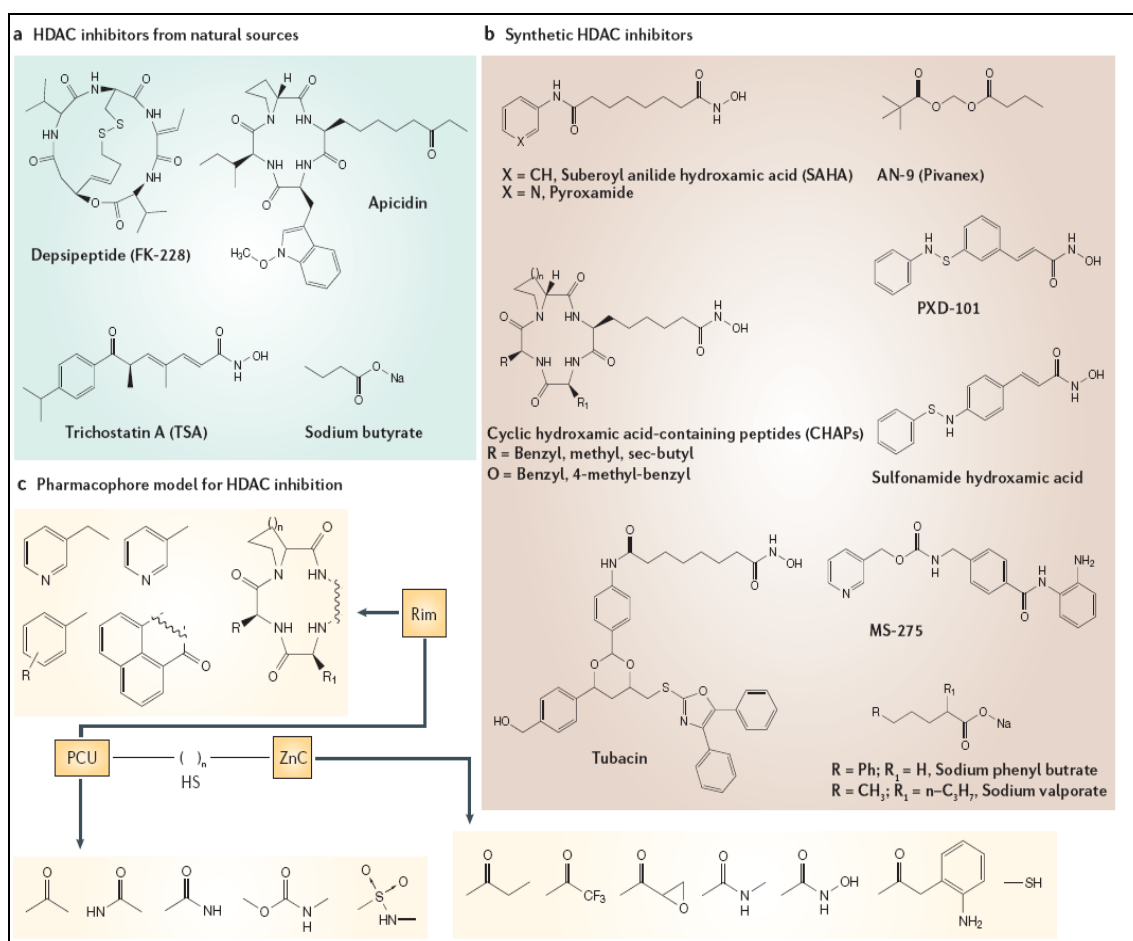
Otros miembros de esta familia de estructura similar al Vorinostat y que se encuentran en fase I de ensayos clínicos son el **LBH-589** o panobinostat en el tratamiento de diferentes tipos de leucemias (*Giles et al, 2006*), el **ITF2357** para el tratamiento del mieloma múltiple y leucemia mieloide aguda (*Golay et al, 2007*) y el **PXD-101** o bellinostat, que presenta una buena tolerancia y una eficacia antitumoral considerable en pacientes con un avanzado estado de oncogénesis (*Marson et al, 2007*).

### ***Péptidos Cíclicos***

A esta familia estructural pertenecen los HDACi **apicidina** y **depsipéptido**. Este último se caracteriza por inhibir eficazmente a las HDAC1 y 2, al tiempo que presenta un efecto muy leve sobre las HDAC4 y 6 (*Santini et al, 2007*). Actualmente se encuentra en fase II de ensayos clínicos en pacientes con linfoma T cutáneo, así como para el tratamiento de linfomas T periféricos y distintos tumores sólidos o hematológicos en combinación con otros agentes antitumorales (*Piekarz et al, 2007*).

## Benzamidas

A este grupo pertenecen compuestos como N-acetildinalina (**CI-994**), **MGCD-0103** y **MS-275**, inhibidor específico de las HDACs de clase I, especialmente de las HDAC1 y 3 (*Hu et al, 2003*). Actualmente en fase I de ensayos clínicos, este compuesto de actividad comparable al TSA ha demostrado actividad antitumoral en neonatos y adultos con cáncer de mama y riñón.



**Figura 10. Estructura de diferentes inhibidores de HDAC.** Adaptado de Minucci and Pelicci, *Nature Reviews*, 2006.

---

## *Ácidos Alifáticos*

El ácido valproico (**VPA**) y el butirato sódico (**NaB**) son los representantes más destacados de esta familia estructural, habiéndose probado sus efectos terapéuticos en síndromes mielodisplásicos (*Kuendgen et al, 2004*). En el caso del VPA, junto con su capacidad de inhibición enzimática, se ha demostrado también su implicación en la degradación de la HDAC2 (*Kramer et al, 2003*).

### *3.3. Acción antitumoral de las drogas epigenéticas*

Como ya hemos visto en los apartados anteriores, las drogas epigenéticas tienen un gran potencial en terapia antitumoral. Muchos investigadores están analizando los efectos de los inhibidores de metilación del ADN, solos y en combinación con los inhibidores de HDAC, especialmente en tumores sólidos donde el tratamiento solo con los inhibidores de DNMTs no parece ser muy eficaz. La actividad antitumoral de estas drogas deriva principalmente de su capacidad para regular la expresión de genes implicados en diversos procesos relacionados con el desarrollo y progresión tumoral.

#### *3.3.1. Ciclo celular*

Diferentes estudios han demostrado la eficacia de las drogas epigenéticas en la reactivación de genes que inhiben la progresión del ciclo celular. Un claro ejemplo de ello es la activación de CDKN2A/p16<sup>INK4A</sup>, inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas. Se sabe que su expresión está disminuida frecuentemente en tumores por hipermetilación de su promotor. El inhibidor de metilación decitabine ha demostrado ser altamente efectivo en restablecer la expresión de p16 en diferentes líneas tumorales (*Auerkari, 2006*).

También se ha observado la reactivación de la expresión de otros inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, como CDKN2B/p15<sup>INK4B</sup> y CDKN1C/p57<sup>KIP2</sup>, mediante el uso de agentes hipometilantes del ADN y/o inhibidores de HDAC, lo que indica que diversas alteraciones epigenéticas pueden estar implicadas en el silenciamiento de estos genes (*Merlo et al, 1995*).

Tras el tratamiento con el inhibidor SAHA, en líneas tumorales linfoides se ha observado una activación de p21, p27 y p53 y una disminución en la expresión de las ciclinas D1 y D2, produciendo una parada de ciclo en las fases G1 o G2 y entrada de estas células en apoptosis (*Sakajiri et al, 2005*).

Por otro lado, la regulación de la expresión de p21 y del ciclo celular en respuesta al tratamiento con decitabine también puede ser debida a la activación de p53 que se origina como consecuencia del daño al ADN producido tras la incorporación de la droga (*Karpf et al, 2001; Zhu et al, 2004; Pulukuri & Rao, 2005*).

En definitiva, la acción de las drogas epigenéticas puede estar dirigida a las regiones promotoras de los genes que regulan el ciclo celular o puede estar relacionada con mecanismos alternativos, como inducción de daño al ADN que conlleva parada del ciclo celular y/o apoptosis. La idea de un mecanismo independiente de la acción hipometilante del decitabine, por ejemplo, viene apoyada por el hecho de que células con elevados niveles de expresión de DNMTs son más susceptibles a la acción de esta droga, lo cual puede deberse a la unión covalente de la DNMT al ADN modificado por el decitabine. Si los efectos citotóxicos del decitabine son principalmente debidos a la reactivación de genes o al hecho de atrapar a las DNMTs formando aductos en el ADN es algo que está aún sin resolver. Ambos mecanismos parecen jugar un papel importante y la prevalencia de uno u otro podría depender de la célula diana.

### ***3.3.2. Reparación del ADN***

La inactivación epigenética también afecta frecuentemente a genes relacionados con la reparación del ADN y esto va a dar lugar a células neoplásicas con una elevada inestabilidad génica. La inactivación por hipermetilación de su promotor del gen MLH1, implicado en reparación, se observa con frecuencia en distintos cánceres humanos y se ha relacionado con inestabilidad de microsatélites (*Esteller et al, 1998*). La restauración de la expresión de este gen en células tumorales se ha logrado mediante tratamiento

con decitabine, sólo o en combinación con HDACi, recuperándose así su función de reparación (*Cameron et al, 1999*). También la administración de dosis no tóxicas de decitabine en modelos de ratones con tumores de ovario y colon trasplantados dió lugar a la restauración de la expresión de MLH1 en las células tumorales, haciéndose así sensibles a la actividad de distintas drogas quimioterapéuticas (*Plumb et al, 2000*).

MGMT es otro gen implicado en la reparación del ADN que aparece frecuentemente inactivado en tumores humanos por hipermetilación de su promotor. Su función consiste en proteger al genoma de los cambios de guanina por adenina inducidos por la acción de agentes alquilantes. Se ha demostrado la re-expresión de este gen en respuesta al tratamiento combinado con inhibidores de metilación y HDACi. También la expresión del gen BRCA1, que aparece silenciado por hipermetilación de su promotor en cánceres esporádicos de mama y de ovario, puede recuperarse mediante inhibidores de metilación y de su efector, GADD45, que participa en la detención del crecimiento provocado por daño en el ADN (*Esteller, 2000; Wang et al, 2005; Wei et al, 2005*).

### ***3.3.3. Apoptosis***

Las drogas epigenéticas pueden regular el proceso de muerte celular por apoptosis en células tumorales al ser capaces de restablecer y modular la expresión de proteínas efectoras y de proteínas mediadoras o implicadas en la señalización de este tipo de muerte celular. Dado el interés de este aspecto dentro del objetivo global de esta tesis doctoral, este apartado se desarrollará dentro del siguiente capítulo y tras haber introducido las características generales, las vías de señalización y las moléculas implicadas en este tipo de muerte celular.

### ***3.3.4. Señalización celular***

A menudo las células tumorales presentan inactivación epigenética de genes relacionados con la señalización celular. Esto puede dar lugar a una falta de respuesta frente señales inhibitoras del crecimiento celular, o a un

mantenimiento aberrante de la señalización celular debido a una disminución o pérdida de señales inhibitoras.

La ruta de señalización de las hormonas esteroideas parece ser una diana frecuente de la inactivación epigenética, la cual actúa principalmente reduciendo la transcripción de los genes de receptores de estas hormonas, de manera que las células neoplásicas no son sensibles a las hormonas o a sus antagonistas. En esta situación, las drogas epigenéticas pueden restaurar la expresión de los distintos receptores de las hormonas esteroideas en células tumorales, incluyendo el receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor de andrógenos (AR) (*Ferguson et al, 1995; Sasaki et al, 2001*).

La combinación de inductores de hipometilación e inhibidores de HDAC parece ser muy efectiva a la hora de restaurar la expresión de estos genes (*Yang et al, 2001b*). Los receptores inducidos mediante drogas epigenéticas mantienen su función nativa, siendo capaces de activar la expresión de genes de respuesta a hormonas. Este resultado es muy interesante desde la perspectiva clínica, ya que sugiere la posibilidad de poder aplicar terapias hormonales muy efectivas para pacientes con tumores que tienen un crecimiento independiente de la hormona. Esta hipótesis ha ganado fuerza tras haberse demostrado la re-expresión del receptor de estrógenos en células tumorales de mama, en las cuales no había expresión de este receptor, mediante tratamiento combinado con decitabine y TSA; así, estas células responden al tratamiento con tamoxifeno cuyo efecto va a resultar en una inhibición del crecimiento tumoral (*Sharma et al, 2006*).

Otros ejemplos de regulación por drogas epigenéticas de señales inhibitoras del crecimiento en células tumorales son: a) Restauración del receptor  $\beta_2$  del ácido retinoico (RAR- $\beta_2$ ) en células neoplásicas tratadas con decitabine o TSA, bien solos o combinados con ATRA, (ácido trans-retinoico), dando lugar a una inhibición de la proliferación celular, incrementando la apoptosis y reduciendo el crecimiento del tumor (*Sirchia et al, 2002; Youssef et al, 2004*). b) Restauración de la sensibilidad de células tumorales a TGF- $\beta$  tras la re-expresión de los

receptores I y II para el TGF- $\beta$  (*Ammanamanchi & Brattain, 2004*). c) Inducción de las proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina 1 y 3 (IGFBP1 e IGFBP3) que inhiben el crecimiento promovido por el IGF (*Hanafusa et al, 2002*).

### **3.3.5. Metástasis y angiogénesis**

La capacidad de las drogas epigenéticas para controlar la invasión de las células tumorales y la metástasis radica en su actividad sobre los sistemas de adhesión y de remodelación de la matriz extracelular. La disminución de la expresión del sistema de adhesión de cadherina, debido a alteraciones epigenéticas que dan lugar a la inactivación transcripcional de esta proteína en las células neoplásicas, se ha asociado a la capacidad invasiva y metastásica de estas células tumorales. El uso de agentes hipometilantes induce por tanto el re-establecimiento de la expresión de E-cadherina (CDH1) y H-cadherina (CDH13) en tumores sólidos y hematopoyéticos, al inhibir la metilación de sus promotores (*Nam et al, 2004; Toyooka et al, 2001*).

La re-expresión en células tumorales de E-cadherina en respuesta al tratamiento con decitabine se correlaciona con un incremento *in vitro* de la agregación celular reduciendo de esta manera la movilidad; también se ha demostrado que la administración sistémica de esta droga en un modelo de ratones con cáncer de mama, impide el desarrollo de metástasis en el pulmón y esto parece ser en parte atribuido a que la droga induce la re-expresión de CDH1 (*Nam et al, 2004*). Además, la inhibición de la invasión celular tras el tratamiento con drogas desmetilantes, se ha descrito que puede deberse a la reducción de la actividad metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 (*Yuecheng et al, 2006*). Sin embargo, otros autores han observado que la expresión de MMP puede ser regulada por metilación de su promotor y se puede inducir la expresión de MMP tras el tratamiento con decitabine, efecto demostrado en células de cáncer de páncreas y células de linfoma. El aumento de expresión de esta proteína se ha



asociado a un incremento del potencial invasivo de las células tumorales (*Sato et al, 2003*).

La situación se complica aún más si tenemos en cuenta que proteínas inhibidoras o que antagonizan la acción de las MMP aparecen frecuentemente silenciadas en tumores debido a hipermetilación de su promotor. Por tanto, el efecto final de la drogas epigenéticas en el potencial invasivo de las células tumorales es el resultado de la suma de los efectos de todos los genes afectados y todo está relacionado con el fondo epigenético de la célula tumoral.

Además de afectar a la invasión tumoral, las drogas epigenéticas modulan también la angiogénesis, fenómeno clave en el desarrollo del tumor y en la metástasis. Se sabe que el gen supresor de tumores VHL (von Hippel-Lindau) está silenciado por metilación de su promotor en células de carcinoma renal y su ausencia hace que se produzca un fallo en la degradación del factor inducible por hipoxia HIF-1, cuya acumulación produce una activación constitutiva de las rutas de respuesta a hipoxia que favorecen la angiogénesis del tumor (*Hermann et al, 2004b*). La activación aberrante de esta ruta es bloqueada en respuesta a decitabine, el cual restaura la expresión de VHL en estas líneas celulares y disminuye la expresión de HIF-1. La proteína inhibidora de la angiogénesis, trombospondina-1, también aparece silenciada por metilación de su promotor y se activa en células tumorales tras el tratamiento con decitabine (*Li et al, 1999*).

Los inhibidores de HDAC también pueden regular la invasión tumoral y la angiogénesis regulando la expresión de proteínas relacionadas con estos procesos de forma similar a como lo hacen los inhibidores de metilación del ADN.

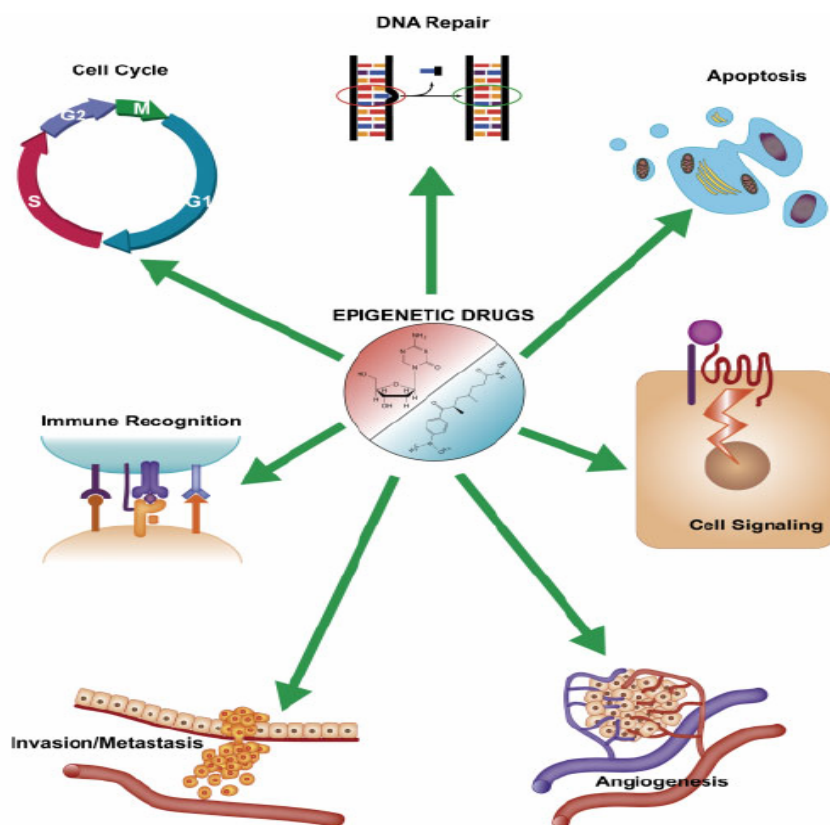
### **3.3.6. Inmunomodulación**

Las células tumorales adoptan distintas estrategias para evadir la respuesta inmunitaria del hospedador. Algunos estudios destacan que las alteraciones epigenéticas juegan un importante papel en la disminución en la expresión de diferentes moléculas relacionadas con el reconocimiento inmunológico de las

células tumorales. Así, las drogas epigenéticas pueden actuar como potentes moduladores de la inmunogenicidad de las células tumorales. Entre los distintos antígenos asociados a tumores identificados hasta el momento, los antígenos cáncer/testículo (CTA) están atrayendo cada vez más el interés para ser utilizados como diana inmunoterapéutica debido a su inmunogenicidad *in vivo*, a su expresión compartida entre tumores de diferentes tejidos y a su ausencia en tejidos normales, excepto placenta y testículo. Estas características los definen casi como antígenos específicos tumorales (*Scanlan et al, 2004*). A pesar de estas propiedades biológicas, el uso de estos antígenos CTA como diana en la inmunoterapia del cáncer puede verse afectado porque se expresan de forma constitutiva en sólo un porcentaje limitado de tumores y porque su expresión intratumoral es heterogénea (*Sigalotti et al, 2007*). Esto es debido a que su expresión está regulada por metilación de su promotor. De hecho, se ha demostrado que el decitabine puede inducir el aumento de expresión de estos antígenos CTA, tanto en tumores sólidos como en tumores hematopoyéticos de diferentes tejidos, permitiendo su reconocimiento inmunológico por los linfocitos T citotóxicos, los cuales van a producir la lisis de estas células (*Weber et al, 1994*). Incluso, el decitabine es capaz de revertir la expresión heterogénea intratumoral de CTA.

No solo regulan la expresión de antígenos tumorales sino que, las drogas epigenéticas, son también capaces de modular la expresión de otras moléculas implicadas en la presentación de dichos antígenos y en su reconocimiento por parte de células T citotóxicas. Por ejemplo, la expresión de las moléculas HLA de clase I está disminuida en células de melanoma y esta expresión se incrementa cuando las células son tratadas con inhibidores de la metilación. También se ha comprobado que se induce la expresión de novo de estas moléculas, en células tumorales que han perdido totalmente su expresión por hipermetilación de su promotor (*Serrano et al, 2001*). Además, aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras y accesorias en las células tumorales.

En definitiva, existen multitud de ejemplos y de trabajos que han verificado la actividad inmunomoduladora de las drogas epigenéticas, lo que aumenta el interés por estas drogas y por su posible uso en estrategias combinadas de quimio- e inmunoterapia.



**Figura 11.** Rutas celulares que son afectadas tras el uso de las drogas epigenéticas. Figura extraída de L. Sigalotti, et al, 2007.

#### 4. APOPTOSIS

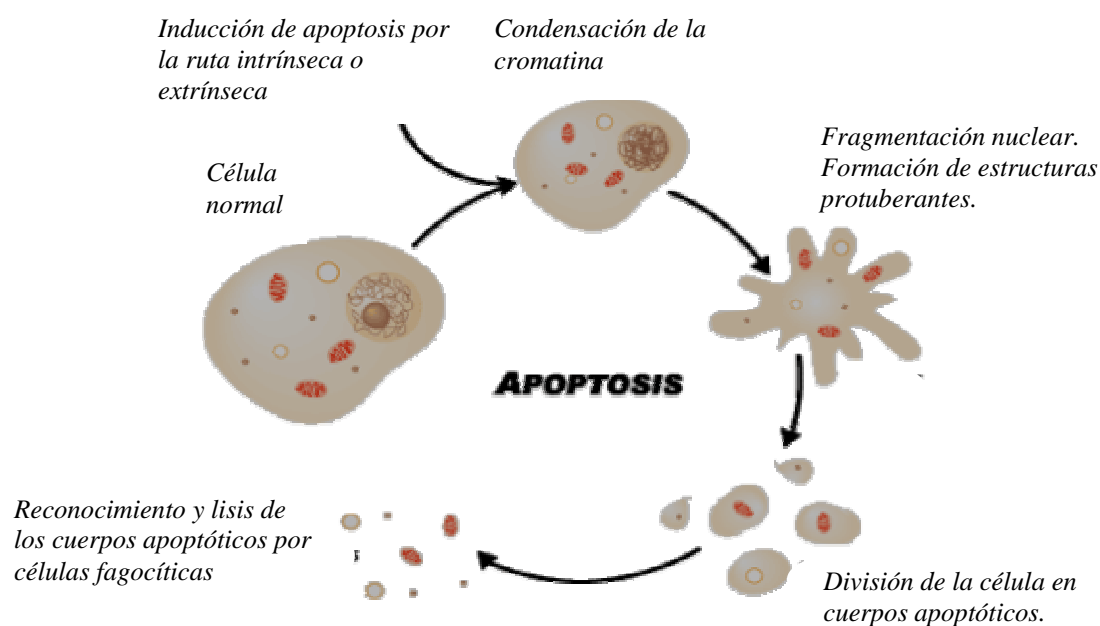
La vida para todos los organismos metazoarios requiere la eliminación de células innecesarias, infectadas o dañadas. La renovación de tejidos, la angiogénesis, así como la homeostasis del sistema inmunológico, requieren de

manera constante la muerte de algunas células para mantener la vida del organismo completo. Para ello han desarrollado diversos mecanismos programados de muerte celular, siendo el más conocido de ellos y el mejor caracterizado el proceso de muerte por “apoptosis” (*Kerr et al, 1972*). Defectos en la regulación del programa de muerte por apoptosis dan lugar a numerosos procesos patológicos. Así, cuando hay una apoptosis excesiva se pueden producir enfermedades como el SIDA, Alzheimer, enfermedad de Huntington, isquemia cardiaca y daños renales. De forma contraria, una deficiencia en la apoptosis es uno de los componentes claves en el desarrollo de enfermedades autoinmunes y también del cáncer.

Las células neoplásicas acumulan alteraciones genéticas y epigenéticas que les permiten sobrevivir, a pesar de la ausencia de factores de supervivencia y de hallarse bajo condiciones de hipoxia y estrés oxidativo. Este microambiente va a determinar que, con el tiempo, se produzca la expansión del tumor, dando lugar a la formación de una masa de células que han perdido su función, que sufren una proliferación y una diferenciación celular alteradas y que presentan una movilidad y capacidad invasiva incrementadas (*Reed, 1996; Tschopp et al, 1999; Frisch & Sreaton, 2001*). Por ello, la regulación del proceso de muerte por apoptosis es un aspecto fundamental en la biología del cáncer.

La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos (*Wyllie et al, 1980*) como son la retracción de pseudópodos, reducción del volumen celular y nuclear (pyknosis) debido a la condensación del citoplasma y a la compactación de la cromatina y fragmentación nuclear (karyorrhexis) dando lugar a densos agregados que se deslocalizan para situarse junto a la membrana nuclear y que posteriormente serán degradados en fragmentos oligonucleosomales de 180 pares de bases o múltiplos de éstos por la acción de endonucleasas. De forma paralela tiene lugar la dilatación del retículo endoplasmático dando lugar a formación de vesículas, aunque sin pérdida de su integridad física, que confieren a la célula el fenotipo característico en forma de “burbujas” (zeiosis). Por último, la célula se fragmenta en los denominados

cuerpos apoptóticos que son fagocitados por macrófagos y otras células circundantes, evitando así la liberación del material intracelular y su exposición al sistema inmunitario que conllevaría al desarrollo de una respuesta inflamatoria. Las células fagocíticas pueden reconocer a las células apoptóticas ya que éstas exponen en su superficie marcadores como la fosfatidilserina, fosfolípido situado en la cara interna de la membrana plasmática que se transloca a la cara externa en la fase temprana de la apoptosis (*Fadok et al, 1992*). Otros marcadores reconocidos por las células fagocíticas son ICAM-3, motivos oxidados tipo LDL (lipoproteínas de baja densidad), moléculas expresadas de novo como la trombospondina-1 ó cambios en la composición de azúcares y en la carga eléctrica de la superficie celular.



**Figura 12.** Cambios morfológicos de la célula durante el proceso de muerte por apoptosis.

#### 4.1. Maquinaria de muerte celular: Caspasas

Las **CASPASAS**, Cysteine **AS**Partyl-specific prote**ASES**, constituyen una familia de enzimas muy conservadas en la evolución y son los componentes

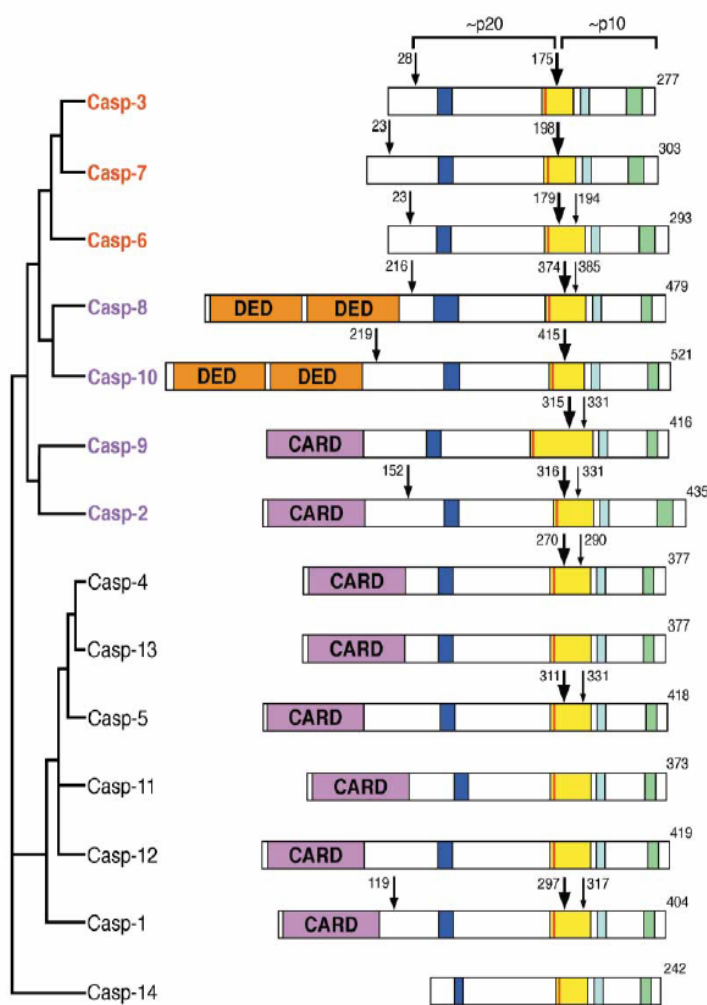
centrales de la maquinaria de inducción de apoptosis. Son cisteín-proteasas, ya que en su sitio catalítico se encuentra un residuo de cisteína, y se caracterizan por cortar sus sustratos en un residuo de aspártico, de ahí su nombre.

Las caspasas están constituidas por un prodominio N-terminal de longitud variable, seguido de una subunidad larga de unos 20 kDa y una corta de unos 10 kDa en la región C-terminal. El residuo de cisteína del centro activo forma parte de una secuencia pentapeptídica conservada QACXG y se encuentra en la subunidad grande, mientras que los residuos que forman el sitio de unión para el sustrato se localizan tanto en la subunidad grande como en la pequeña, aunque el residuo dominante para la especificidad de sustrato se localiza en la subunidad pequeña. Su activación requiere de la escisión de las tres subunidades – prodominio, subunidad larga y subunidad corta - para formar un tetrámero, integrado por dos subunidades largas y dos cortas, que presentará dos sitios activos de catálisis (*Wolf & Green, 1999*). Esta proteólisis tiene lugar en dos fases: en la primera se separa la subunidad grande, junto con el prodominio, de la subunidad pequeña; y en la segunda fase se escinde el prodominio. La presencia de residuos de aspártico en los sitios de separación de las subunidades se relaciona con la capacidad de las caspasas para auto-activarse o ser activadas por otras caspasas dentro de la cascada apoptótica.

Las caspasas reconocen en sus sustratos una secuencia de al menos cuatro aminoácidos P4-P3-P2-P1 y cortan después del aminoácido carboxi-terminal, P1, que es el residuo de aspártico. El residuo P3 suele ser una glutamina, y los residuos P2 y P4 son variables, por lo que la secuencia de especificidad de corte de una caspasa será X-Glu-X-Asp. Los aminoácidos de la enzima que se unen al sustrato y que, por tanto, reconocen la secuencia P4-P3-P2-P1 se denominan S4-S3-S2-S1. S1 y S3 son residuos muy conservados en las diferentes caspasas, al contrario que S2 y S4, que varían significativamente entre las caspasas y originan las diferentes especificidades por el sustrato en función de los residuos situados en las posiciones P2 y P4.

En humanos, existen 11 genes que codifican para 11 caspasas, de la caspasa-1 a la -10 y la caspasa-14, que sólo se expresa en queratinocitos (Pistrutto *et al*, 2002).

Las caspasas se dividen en tres grupos bien diferenciados en base a su función (Degterev *et al*, 2003): las caspasas iniciadoras, las caspasas efectoras o ejecutoras y las caspasas implicadas en inflamación.



**Figura 13. Esquema de caspasas.** Con la flecha gruesa se muestra el sitio del primer corte proteolítico, entre la subunidad grande y la pequeña. Las flechas finas indican otros sitios adicionales de corte. Los segmentos sombreados indican las regiones que corresponden a los bucles que constituyen la cavidad catalítica. (Adaptado de Shy, Y. Mol Cell 2002).

El grupo de las **caspasas iniciadoras** está formado por las caspasas -2, -8, -9 y -10 y son las primeras en activarse tras un estímulo apoptótico. Este estímulo va a dar lugar al ensamblaje de lo que se denominan plataformas o complejos de activación, formados por las propias caspasas y por proteínas adaptadoras, donde se activarán dichas caspasas iniciadoras. Las proteínas adaptadoras se van a unir

de forma específica a dominios DED (Death Effector Domain) o CARD (Caspase Recruitment Domain) situados en los prodominios de las caspasas. Existen diferentes plataformas de activación para las caspasas. Así, el complejo de señales inductoras de muerte o DISC (Death-Inducing Signalling Complex) recluta y activa a las caspasas-8 y -10 (*Juo et al, 1998*) mediante los dominios DED. El apoptosoma permite el reclutamiento y la activación de la caspasa-9 (*Liu et al, 1999*), a través de sus dominios CARD. También la caspasa-2 tiene dominios CARD y su plataforma de activación se conoce como PIDDosoma. El reclutamiento de las caspasas iniciadoras por proteínas adaptadoras y la formación de los complejos de activación, determinaron la aparición de la teoría de activación de dichas caspasas por un mecanismo de autocatálisis por proximidad (*Salvesen, 1999*). Estudios más recientes han demostrado, sin embargo, que la activación de caspasas iniciadoras puede ocurrir en ausencia de cortes proteolíticos, simplemente debido al cambio conformacional que tiene lugar tras la homodimerización de las formas proenzimáticas monoméricas en los complejos de activación, especialmente en el caso de la caspasa-9 (*Boatright et al, 2003*).

El conjunto de **caspasas efectoras** está integrado por las caspasas -3, -6 y -7, carentes de dominios DED y CARD, que se van a activar directamente por el procesamiento mediado por caspasas iniciadoras. Las caspasas efectoras son las encargadas de degradar los distintos sustratos celulares que provocan los cambios morfológicos, estructurales y bioquímicos característicos de la muerte por apoptosis.

Las caspasas -1, -4 y -5 constituyen una clase particular dentro de esta familia de proteasas ya que se relacionan principalmente con el control de ciertas respuestas inflamatorias, especialmente de la maduración de citoquinas. La plataforma de activación de estas caspasas se conoce como inflamosoma. También pueden jugar un papel en la muerte por apoptosis en determinadas situaciones patológicas, como ocurre durante la isquemia, actuando probablemente tanto de iniciadoras como de efectoras.



#### ***4.2. Vías de inducción de apoptosis***

Existen dos rutas principales a través de las cuales se puede inducir apoptosis en la célula: **1)** la ruta de los receptores de muerte o ruta extrínseca, que se pone en marcha por la activación de determinados miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), y **2)** la ruta mitocondrial o ruta intrínseca, inducida por diferentes formas de estrés celular, como puede ser el causado por la privación de factores de crecimiento en el medio, pérdida de adhesión al sustrato, daño al ADN, estrés en el retículo endoplásmico, activación de oncogenes, infección viral, radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioleta, etc.

##### ***4.2.1 Ruta extrínseca o de los receptores de muerte***

Una célula normal o patológica puede entrar en apoptosis en respuesta al estímulo desencadenado por la unión de los denominados **ligandos de muerte** a sus receptores específicos. Los ligandos de muerte son proteínas transmembrana tipo II pertenecientes a la superfamilia del TNF, como **FasL/CD95L**, **TRAIL** (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) o el propio **TNF**, que presentan en su región extracelular los denominados dominios de homología a TNF (THD) a través de los cuales se asocian a sus receptores (*Bodmer et al, 2002*). Estos ligandos son expresados por distintas células del sistema inmunológico como linfocitos T, células NK, monocitos y células dendríticas, participando y permitiendo la eliminación de células que han cumplido su función, células infectadas, autorreactivas y metaplásicas (*Singh et al, 1999; Perlman et al, 2001; Yang et al, 2001a; Zhang et al, 2004*).

Los receptores de muerte a los que se unen estos ligandos son proteínas transmembrana tipo I de la superfamilia de receptores de TNF y reciben el nombre de receptores de muerte. Se caracterizan por presentar en su región intracelular los denominados dominios de muerte (**DD**) a través de los cuales va a

---

transmitir el estímulo apoptótico. Existen además receptores anti-apoptóticos o “*señuelo*” para dichos ligandos, que se denominan así porque no transmiten la señal de apoptosis, siendo algunos de ellos receptores solubles (*Gruss & Dower, 1995*). Ambos tipos de receptores presentan en su región extracelular unos dominios ricos en cisteínas (**CRDs**) que se asocian con las regiones THD de los ligandos de muerte por medio de puentes disulfuro formando multímeros funcionales. La unión del ligando a su correspondiente receptor de muerte va a tener como consecuencia la trimerización del receptor y el reclutamiento de proteínas citoplasmáticas adaptadoras con dominios DD homólogos a los del receptor, como la proteína FADD. Estas proteínas, a través de dominios DED, van a permitir a su vez el reclutamiento de las caspasas iniciadoras -8 y/o -10, formándose así el complejo DISC donde se activarán dichas caspasas (*Kischkel et al, 2000*).

En función de las señales implicadas en la inducción de apoptosis tras la activación de los receptores de muerte, las células pueden clasificarse en tipo I si no requieren de la vía mitocondrial o en tipo II si requieren la participación de este orgánulo (*Scaffidi et al, 1998*). En las células tipo I, las caspasas iniciadoras activadas a nivel del DISC a su vez activan directamente a las caspasas efectoras -3 y -7 que provocarán finalmente la muerte celular por apoptosis. Por el contrario, en las tipo II, las caspasas iniciadoras dan lugar a la activación de las señales mitocondriales características de la ruta intrínseca (que se explicarán el siguiente apartado) y dichas señales permitirán finalmente la activación de las caspasas efectoras.

El TNF tiene un papel fundamental en inflamación e inmunidad. Se han descrito dos receptores para TNF: TNFR-1 y TNFR-2. Sólo el TNFR-1 se considera como un receptor de muerte, ya que el TNFR-2 carece del dominio de muerte intracelular necesario para transmitir la señal de apoptosis. A pesar de ello, el TNFR-1 puede disparar la inducción de apoptosis o bien activar rutas de supervivencia celular, dependiendo del complejo de señalización que se active. La interacción de FasL/CD95L con su receptor de muerte Fas/CD95 da lugar

generalmente a la inducción de apoptosis, aunque se han descrito algunas situaciones en las que Fas no tiene una acción citotóxica, sino que induce proliferación, migración y producción de citoquinas.

### *El ligando de muerte TRAIL*

Dentro del contexto de la apoptosis mediada por receptores de muerte, hay que destacar la inducida por el ligando de muerte TRAIL (*Wiley et al, 1995*). Con 32 kDa de peso molecular, este ligando está formado por una fracción intracelular seguida de un dominio extracelular que presenta un 28% de homología con el de CD95L. El dominio extracelular se puede liberar al medio, apareciendo así en forma soluble (*Mariani & Krammer, 1998*). De igual forma, se ha descrito que linfocitos T activados pueden liberar TRAIL al medio como una proteína completa, secretada mediante vesículas (*Monleon et al, 2001*). Al contrario que los otros miembros de la familia de TNF, cuya expresión está muy regulada, el ARNm de TRAIL se expresa constitutivamente en muchos tejidos humanos y en la mayoría de las células del sistema inmunitario.

TRAIL puede unirse específicamente a cuatro receptores transmembrana (TRAIL-R1 a -R4) y, con menor afinidad, a un receptor soluble denominado osteoprotegerina (OPG), aunque se desconoce la relevancia de esta unión en condiciones fisiológicas (*Almasan & Ashkenazi, 2003*). Los receptores de membrana de TRAIL se clasifican en pro- y anti-apoptóticos, en función de su capacidad para inducir la activación de la cascada apoptótica. Los receptores TRAIL-R1/DR4 y TRAIL-R2/DR5 (*Pan et al, 1997a; Pan et al, 1997b; Walczak et al, 1997*) son receptores de muerte o pro-apoptóticos, pues presentan en su región intracelular los dominios DD necesarios para transmitir la señal de apoptosis tras la unión del ligando (*Cha et al, 2000*). Los receptores TRAIL-R3/DcR1 y TRAIL-R4/DcR2 son receptores “señuelo” debido a su incapacidad para inducir apoptosis tras la unión del ligando. TRAIL-R3 carece de dominios transmembrana e intracitoplasmático, anclándose a la membrana a través de una cola de glicofosfatidil-inositol (*Degli-Esposti et al, 1997*). TRAIL-R4, por el

---

contrario, sí presenta regiones citoplasmática y transmembrana, pero posee un DD truncado que lo incapacita a la hora de ensamblar la maquinaria necesaria para la activación del proceso apoptótico, aunque le permite activar la ruta de supervivencia de NF- $\kappa$ B tras la unión a TRAIL, hecho que también se ha descrito tras la unión del ligando de muerte a sus receptores pro-apoptóticos (*Chaudhary et al, 1997*).

En cuanto a la función de TRAIL *in vivo*, desde el punto de vista fisiológico, se sabe que puede participar en la diferenciación celular, concretamente en la de células intestinales y osteoclastos. En este sentido, TRAIL puede tener un papel en el metabolismo óseo, lo que viene apoyado por estudios recientes que muestran como TRAIL puede inhibir la osteoclastogénesis *in vitro* (*Zauli et al, 2004*). También se ha visto que está relacionado con la hematopoyesis, concretamente con la maduración y la eritropoyesis. Las células precursoras CD34<sup>+</sup> no presentan expresión alguna de este ligando ni de sus receptores, pero en monocitos y neutrófilos la maduración celular va a dar lugar a una expresión progresiva de los receptores de TRAIL, sugiriendo la implicación de los mismos en dicho proceso de maduración (*Zauli & Secchiero, 2006*). También parece participar en la maduración de los megacariocitos, aunque en el caso de la diferenciación eritroide jugaría un papel de inhibición, puesto que los eritroblastos inmaduros presentan receptores pro-apoptóticos y son sensibles a TRAIL (*Secchiero et al, 2004*). En relación con el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunitario, TRAIL participa en la inducción de apoptosis de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, una vez que han realizado su función, evitando de esta manera problemas de autoinmunidad (*Zerafa et al, 2005*). Además, se ha demostrado que ratones que no expresan TRAIL sufren defectos en la apoptosis de los timocitos y por lo tanto van a ser más susceptibles al desarrollo de enfermedades autoinmunes (*Lamhamedi-Cherradi et al, 2003*).

Pero el papel más relevante, desde el punto de vista clínico, es su capacidad para inducir apoptosis de forma selectiva en células tumorales, y no en células normales. TRAIL es expresado por distintas células del sistema inmunitario,

como linfocitos T, células NK, monocitos y células dendríticas (*Liu et al, 2001*) (*Mariani & Krammer, 1998*), especialmente tras la estimulación a través de interferones, o del TCR en el caso de los linfocitos T. Así, se favorece o se estimula la capacidad de dichas células de inducir apoptosis sobre células tumorales (*Takeda et al, 2002*). Si bien existe un gran número de tumores resistentes a la apoptosis mediada por TRAIL (*Griffith & Lynch, 1998*), su estudiada efectividad en la erradicación de tumores en modelos murinos junto con la ausencia de citotoxicidad en ensayos realizados con primates no humanos (*Ashkenazi et al, 1999*), hacen de TRAIL un prometedor agente terapéutico en la lucha contra el cáncer. Se están realizando estudios con anticuerpos frente a los receptores pro-apoptóticos TRAIL-R1 y -R2 y también se está utilizando el propio TRAIL recombinante, en forma de homotrímero soluble unido a un átomo de Zinc, tras haberse establecido su tolerancia por parte de algunas células no transformadas, como hepatocitos o células neuronales, previamente descritas como sensibles al ligando en ciertos estudios (*Kelley et al, 2001*).

#### ***4.2.2. Ruta intrínseca de apoptosis***

Esta ruta de inducción de apoptosis es conocida también como ruta mitocondrial, ya que la mitocondria es el principal orgánulo implicado en este tipo de muerte celular. La ruta intrínseca es activada por diferentes estímulos que incluyen la retirada de factores de crecimiento, daño al ADN, radiación ultravioleta y drogas quimioterapéuticas. Las vías de señalización activadas por estos estímulos de estrés, van a dar lugar a la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (**PMEM**) y así, a la liberación de proteínas solubles del espacio intermembrana que permiten la activación de caspasas. Algunos de los factores liberados de la mitocondria pueden también conducir a una muerte celular independiente de caspasas.

Se han propuesto dos mecanismos para explicar el fenómeno de PMEM, pudiendo funcionar uno u otro según el contexto, el estímulo o el tipo celular:

- El primero de ellos, en el que participa la membrana mitocondrial interna, implica la formación de un poro que recibe el nombre de poro de permeabilidad transitoria (PPT). Este poro permitiría el paso de agua y moléculas de bajo peso molecular provocando la pérdida del equilibrio iónico así como el incremento en el volumen de la matriz mitocondrial por exceso de hidratación que desencadenaría la ruptura de la membrana mitocondrial externa. El PPT está formado, entre otros componentes, por el transportador de nucleótidos de adenina (ANT) a nivel de la membrana mitocondrial interna y el canal de aniones voltaje dependiente (VDAC) de la membrana externa. En condiciones fisiológicas es necesario para el mantenimiento de la función energética mitocondrial (*Mattson & Kroemer, 2003*). VDAC es la proteína más abundante en la membrana externa mitocondrial y es la responsable, junto con ANT, del transporte de ATP y ADP dentro y fuera de la mitocondria.

- En el segundo caso, la PMEM se debería a la formación de canales proteicos constituidos por la oligomerización de miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2 que actuarían directamente sobre la membrana mitocondrial externa, o bien de largos poros derivados de la asociación de dichas proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 con distintos componentes lipídicos (*Green & Kroemer, 2004*).

Existe un tercer modelo, que surge de la asociación de los anteriores, en el cual miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2, interaccionarían con proteínas del PPT: con VDAC para permitir la salida de factores a través de la membrana mitocondrial externa, o con ANT para formar canales iónicos en la membrana mitocondrial interna (*Shimizu et al, 1999*).

En cualquier caso, tras la PMME se van a producir los siguientes eventos, implicados todos ellos en la muerte celular:

1) *Liberación de proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria.* Estas proteínas pueden activar caspasas, nucleasas o pueden neutralizar inhibidores citosólicos del proceso apoptótico. Algunas de estas proteínas son:

- *Citocromo c*: Una vez liberado al citosol, y en presencia de ATP, se une a la proteína pro-apoptótica Apaf-1 provocando su oligomerización y el reclutamiento de la caspasa-9. Este complejo constituye el llamado **apoptosoma** en el cual se activará la caspasa-9, que a su vez cortará y activará a caspasas efectoras, como la -3 y-7.

- *AIF (Apoptosis Inducing Factor)*: Es una flavoproteína que posee una señal de localización mitocondrial y otra nuclear. Aunque normalmente está confinada en el espacio intermembrana de la mitocondria, se transloca al núcleo en respuesta a estímulos apoptogénicos produciendo fragmentación del ADN y condensación periférica de la cromatina. AIF también va a producir otros cambios celulares característicos de la apoptosis, como disipación del potencial de membrana mitocondrial o exposición de fosfatidilserina en la superficie celular. Hay que destacar que ninguno de estos procesos, resultado de la activación de AIF, son dependientes de caspasas. Esta proteína actúa de manera independiente del apoptosoma (*Joza et al, 2001*).

- *Smac/DIABLO*: Esta proteína se une e inactiva a una serie de proteínas inhibidoras de caspasas que pertenecen a la familia de los IAPs (proteínas inhibidoras de apoptosis) (*Du et al, 2000*). Además, se ha visto que tiene la capacidad de inducir apoptosis, de manera independiente de su acción inhibidora de los IAPs (*Fulda et al, 2002*).

- *Omi/HtrA2*: Es una serín-proteasa que interacciona con las proteínas IAPs citosólicas de manera similar a como lo hace Smac/DIABLO (*Suzuki et al, 2001*). Puede por tanto promover la activación de caspasas, como la -3 ó la -9. Sin embargo, al igual que Smac, Omi posee capacidad de inducir apoptosis, independientemente de la activación de caspasas o de su interacción con proteínas IAPs, gracias a su dominio catalítico serín-proteasa.

- *Endonucleasa G*: Esta proteína se trasloca al núcleo donde se ha visto involucrada en la fragmentación del ADN. Dicha fragmentación es independiente de la activación de caspasas. Es probable que esta proteína necesite de otras nucleasas o cofactores para poder realizar su función.

2) *Alteración de la cadena de transporte de electrones, de la fosforilización oxidativa y de la producción de ATP*. El citocromo c transporta electrones del complejo III al complejo IV de la cadena de transporte electrónico y esto va a generar un potencial eléctrico a través de la membrana interna mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). Este potencial es utilizado por el complejo V para generar ATP a partir de ADP y fosfato libre procedente de la respiración aeróbica y también se utiliza para importar proteínas y para la biogénesis mitocondrial (*Waterhouse et al, 2001*). La pérdida del citocromo c del espacio intermembrana causa una pérdida transitoria de este potencial, aunque este hecho por sí solo no es suficiente para impedir completamente la fosforilización oxidativa y la producción de ATP. Cuando las caspasas se activan tras la PMEM, cortan a la subunidad p75 del complejo I de la cadena de transporte electrónico (*Ricci et al, 2004*). Este proceso provoca una pérdida persistente del potencial de membrana y una alteración en la producción de ATP, principal forma de energía de la célula y esencial para el mantenimiento de la viabilidad, por lo que se ve afectada la supervivencia celular.

3) *Alteración del potencial reducción-oxidación (redox) de la célula*. La mitocondria es la principal fuente de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido. Como consecuencia de las alteraciones mitocondriales mencionadas, se va a producir un aumento en la producción de ROS que a su vez provocan modificaciones, por oxidación, en diferentes macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Existe una cierta controversia sobre la relevancia o la necesidad del aumento en la producción de ROS para la inducción de apoptosis por la vía intrínseca. Es posible que la importancia de este evento dependa del tipo celular y de la señal de estrés que conlleva a la muerte de la célula.



### Familia de Bcl-2

Como ya se ha mencionado anteriormente, miembros de la familia Bcl-2 regulan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Dentro de esta familia encontramos miembros anti-apoptóticos, los cuales van a preservar la integridad de la membrana externa mitocondrial y a impedir la muerte de la célula, y miembros pro-apoptóticos, que promueven la PMEM y todos los eventos mitocondriales que llevan a la muerte de la célula por apoptosis.

Podemos establecer una clasificación de los miembros de la familia Bcl-2 en tres grupos, dependiendo de su actividad y de sus dominios de homología conservados, denominados BH.

*Clase 1: miembros anti-apoptóticos.* Las proteínas de esta clase presentan cuatro dominios de homología: BH1, BH2, BH3 y BH4. Dentro de este grupo se encuentran Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, A1/Bfl-1, Boo/Diva y Mcl-1. Los dominios BH1-BH4 intervienen en las interacciones con otras proteínas de la familia y con moléculas que están localizadas en la cara citoplasmática de las membranas intracelulares, como por ejemplo, la membrana mitocondrial externa, el retículo endoplasmático y la envuelta nuclear. Los dominios BH1-BH3 forman un surco hidrofóbico que puede unir la  $\alpha$ -hélice del dominio BH3 de una proteína pro-apoptótica de esta misma familia. La importancia de esta familia en la regulación de la muerte celular se hizo evidente a partir de estudios que mostraron que la sobre-expresión de Bcl-2 contribuía al desarrollo de linfoma inducido por activación del proto-oncogen c-myc. Es por ello Bcl-2 la proteína que da nombre a esta familia (*Leibowitz & Yu*).

*Clase 2: miembros pro-apoptóticos tipo Bax.* Las proteínas de este grupo se caracterizan porque presentan dominios BH1, BH2 y BH3. Dentro de esta clase se encuentran Bax, Bak y Bok.

*Clase 3: miembros pro-apoptóticos "sólo BH3".* Los miembros de esta clase comparten sólo, entre ellos y con el resto de los miembros de la familia, el

dominio BH3, de ahí su denominación. Dentro de esta clase se encuentran las proteínas Bad, Bim, Bid, Bmf, Bik, Noxa, Puma, Blk, Hrk, Nip3 y BNip3.

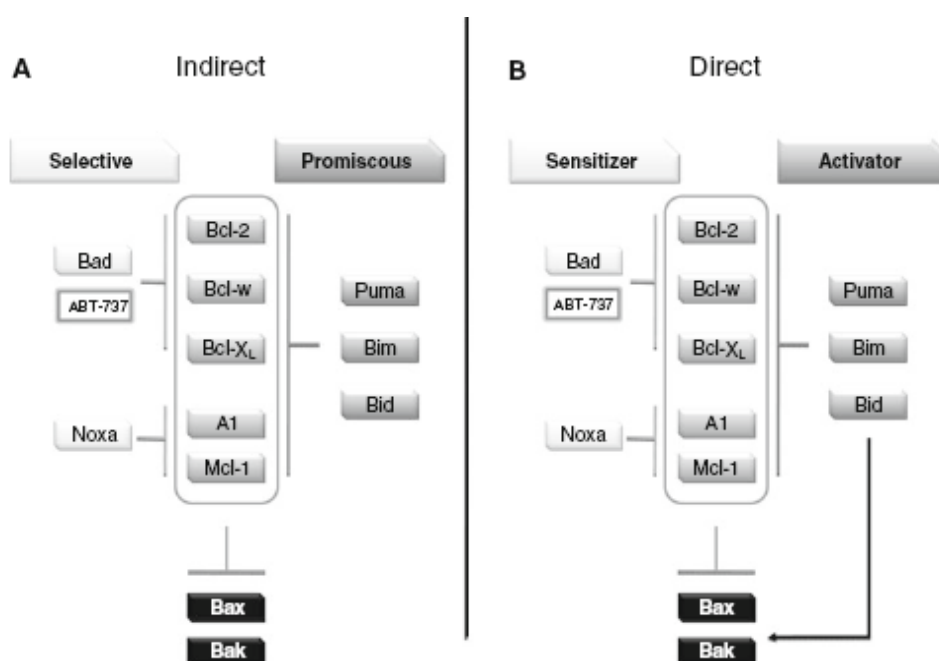
La importancia de las proteínas Bax y Bak en la regulación de la apoptosis no se evidenció en un principio ya que al anular alguna de estas proteínas en modelos murinos, no se veía afectada la viabilidad de los ratones o la inducción de apoptosis en respuesta a distintos estímulos pro-apoptóticos. Pero cuando estos ratones se cruzaron, con el fin de obtener el ratón deficiente para ambas proteínas, se obtuvieron embriones muertos y además se observó que los fibroblastos de estos embriones eran resistentes a distintos estímulos pro-apoptóticos, encontrándose inhibida la liberación del citocromo c de la mitocondria (*Lindsten et al, 2000*).

Bax y Bak participan en el proceso apoptótico como factores activadores de la ruta mitocondrial, formando oligómeros en forma de poros en la membrana externa mitocondrial y permitiendo así su permeabilización. Aunque parece que realizan el mismo papel en este proceso, cada una de estas proteínas requiere distintos pasos para su activación. Bax está en el citosol de las células como un monómero inactivo, y su activación requiere un cambio conformacional, su translocación a la mitocondria y su oligomerización. Hasta el momento, la mayoría de los estudios sobre Bax se han llevado a cabo con la isoforma  $\alpha$ , aunque recientemente se ha descrito en humanos una nueva isoforma  $\beta$  de Bax, que procede del procesamiento del intron 5. Bax $\beta$  está constitutivamente activo, ya que carece del dominio por el cual Bax $\alpha$  se encuentra en una conformación inactiva (*Fu et al, 2009*), pero tiene un dominio C-terminal que es reconocido por el proteosoma, produciendo la degradación de esta isoforma y haciéndola altamente inestable.

Al contrario que Bax, Bak está localizado en la membrana externa mitocondrial. Recientemente el grupo de Dr. Kluck ha descrito un nuevo mecanismo para su activación y oligomerización, según el cual ésta ocurre por la inserción de su dominio BH3 en la ranura del dominio BH3 de otra molécula de

Bak. Esta interacción origina la formación de un inesperado dímero simétrico que es esencial para la oligomerización y la formación de un gran multímero de Bak que provocará la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (Dewson *et al*, 2009).

Los miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2, como Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> ó Mcl-1, regulan la PMEM por inhibición de Bax y Bak. La interacción con dichos miembros anti-apoptóticos parece ocurrir a través del bolsillo hidrofóbico de unión a BH3 formado por los dominios BH1 y BH3. En relación con los miembros de la familia tipo “solo BH3”, hoy en día se sabe que juegan un papel importante en la activación de Bax y Bak, aunque el mecanismo por el que lo hacen no está del todo claro. Se han propuesto dos modelos.



**Figura 14.** Modelos directo e indirecto de activación de Bax y Bak por proteínas “sólo BH3”. Figura adaptada de L. A. Pradelli., *et al*, 2010.

El *modelo indirecto o desrepressor* predice que estos miembros “solo BH3” lo que hacen es “desreprimir” o permitir la actividad intrínseca de Bax y Bak

interaccionando e inhibiendo a los miembros anti-apoptóticos de la familia. Los estudios realizados en animales doblemente deficientes para Bim y Bid apoyan este modelo. Algunas proteínas “solo BH3” son capaces de inducir apoptosis por si mismas, ya que inhiben todo el repertorio de miembros anti-apoptóticos de esta familia, mientras que otras proteínas “solo BH3” son más selectivas y por tanto menos potentes como activadoras de la muerte por apoptosis (*Lomonosova & Chinnadurai, 2008*).

El segundo modelo es el llamado *directo o activador*. Según este modelo, aunque la mayoría de las proteínas “solo BH3” actúan como desrepresoras, algunas pueden unirse y activar a Bax y Bak directamente. Según Lovell y colaboradores, la inserción de Bid truncado en la membrana mitocondrial inicia el reclutamiento y la activación de Bax en la bicapa. También demuestran que Bcl-x<sub>L</sub> puede secuestrar a Bid truncado en la membrana y que Bad puede desplazar a Bid truncado, dejándolo libre para activar a Bax. Por otro lado, se ha demostrado que proteínas no relacionadas con la familia Bcl-2 pueden activar directamente a Bax y Bak. Por ejemplo, el gen supresor de tumores p53 se puede unir y activar directamente a Bax y Bak.

Bid juega además un papel importante en la activación de la ruta mitocondrial tras la activación de los receptores de muerte en las llamadas células tipo II. Esta proteína “solo BH3” es sustrato de la caspasa-8 iniciadora de la vía extrínseca. Cuando Bid es cortado por dicha caspasa, la forma truncada resultante se transloca a la mitocondria permitiendo la activación de Bax y Bak y así la PMEM y el resto de eventos mitocondriales característicos de la ruta intrínseca de inducción de apoptosis (*Luo et al, 1998*).

### ***4.3. Regulación de la apoptosis***

Como ya hemos visto, la apoptosis es un proceso que se encuentra altamente regulado, ya que sólo se debe activar en situaciones y momentos

determinados. Por ello, existen numerosas proteínas que, ya sea inhibiendo directamente la señalización de apoptosis o bien activando señales y rutas de supervivencia, evitan la posible entrada de la célula en apoptosis de forma accidental. Entre los mecanismos reguladores de la apoptosis podemos señalar el balance entre los niveles de receptores pro- y anti-apoptóticos (*Zhang et al, 2000*) o de proteínas pro- y anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2. Existen otros mecanismos de control, que favorecen o impiden la señalización de apoptosis, entre los que podemos destacar los que a continuación se describen.

#### ***4.3.1. Inhibidores de caspasas: IAPs y c-FLIP***

*IAPs (Inhibidores de apoptosis)*: Esta familia de proteínas se identificó en baculovirus, observándose su capacidad para impedir la entrada de la célula infectada en apoptosis mediante inactivación de las caspasas. Se han descrito hasta 8 proteínas IAPs en mamíferos, entre las que se encuentran XIAP, c-IAP1, c-IAP2, ILP2, ML-IAP (asociado a melanoma), NAIP (proteína inhibidora de la apoptosis neuronal), Survivina y Bruce (*Wright et al, 2005*).

Estas proteínas inhibidoras de la apoptosis, con capacidad de unión e inactivación de caspasas tanto iniciadoras como efectoras, llevan a cabo su acción de inhibición a través de los denominados dominios BIR (Baculoviral IAP Repeat), que consisten en aproximadamente 80 aminoácidos plegados alrededor de un átomo de Zinc. Muchas de ellas contienen también un dominio contiguo RING encargado de la destrucción de la caspasa, pues actúa como una ligasa de ubiquitina que promueve la degradación por el proteosoma del propio IAP asociado a la enzima (*Yang & Li, 2000*). Junto al dominio RING, tanto en c-IAP1 como en c-IAP2 se localiza un dominio CARD que sugiere que estas IAPs podrían regular directa o indirectamente el procesamiento de las caspasas a través de interacciones por dicho dominio.

*c-FLIP* (Flice Inhibitory Protein), se identificó originalmente como producto de un gen viral, mediante el cual el virus trataba de mantener con vida a la célula infectada para lograr con éxito su etapa de replicación, evitando la apoptosis mediada por receptores de muerte (*Thome et al, 1997*). Es una proteína inhibidora de la activación de las caspasas-8 y -10. Se ha visto que se expresa constitutivamente en diferentes tipos de células normales como cardiomiocitos, células endoteliales, queratinocitos, células dendríticas, células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y espermatocitos. Además, se ha encontrado una elevada expresión de *c-FLIP* en células tumorales que suelen ser resistentes a la apoptosis inducida por receptores de muerte. En humanos, encontramos dos isoformas de la proteína obtenidas por procesamiento alternativo del ARNm y denominadas por su longitud FLIP largo (**FLIP<sub>L</sub>**), de 55 kDa, y FLIP corto (**FLIP<sub>S</sub>**), de 26 kDa (*Hu et al, 1997*). Ambas isoformas se caracterizan por presentar en su estructura dos dominios DED, análogos a los de los prodominios de las caspasas-8 y -10. Estos dominios son necesarios para cumplir su función inhibidora de la apoptosis, pues a través de ellos pueden asociarse por interacciones homotípicas con la proteína adaptadora FADD y ser reclutados en el DISC en lugar de dichas caspasas iniciadoras. Si bien ésta constituye la estructura básica de la isoforma FLIP<sub>S</sub>, en el caso de FLIP<sub>L</sub> encontramos también un dominio pseudocaspasa inactivo que va a ser degradado a nivel del DISC como si de la auténtica caspasa -8/-10 se tratara, dando lugar a una fracción de 43 kDa que quedará anclada al DISC impidiendo el reclutamiento de la auténtica caspasa (*Krueger et al, 2001*).

#### **4.3.2. Ruta de las MAPKs**

Los diferentes miembros de la familia de *proteínas quinasas activadas por mitógenos* (MAPKs), participan en múltiples vías de señalización conservadas a lo largo de la evolución, regulando importantes procesos biológicos relacionados con la supervivencia celular y la inducción de apoptosis. La cascada de señalización de las MAPKs puede ser activada por una gran variedad de estímulos tanto extracelulares como intracelulares, los cuales incluyen factores

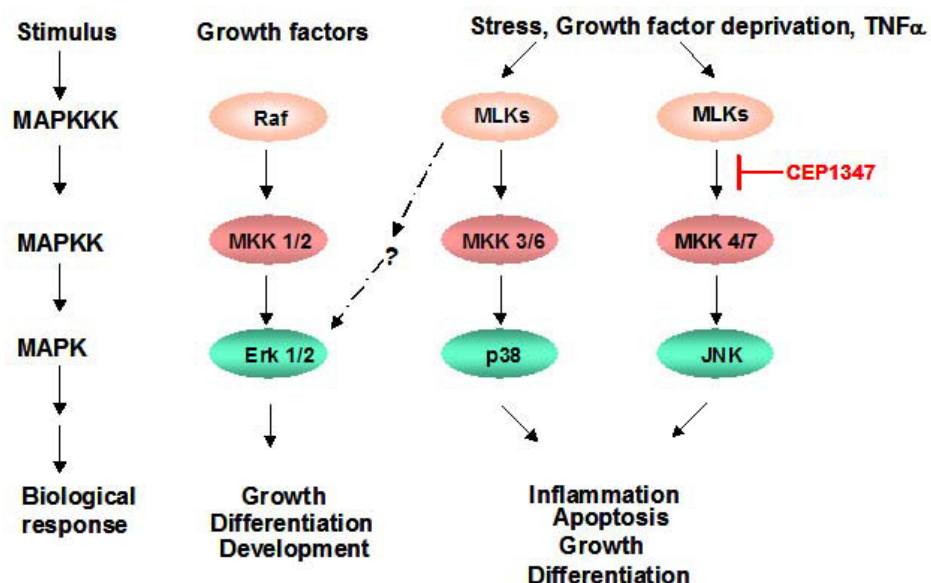
de crecimiento, citoquinas, hormonas y fenómenos de estrés celular como estrés oxidativo y estrés del retículo endoplásmico. Tras su activación, las MAPKs actúan sobre una serie de moléculas efectoras, como son otras quinasas, fosfolipasas, proteínas de citoesqueleto y factores de transcripción, para finalmente regular la producción de citoquinas y factores de crecimiento, entre otros, lo que hace que esta familia de quinasas tenga importantes funciones, por ejemplo en el control de la hematopoyesis (*Platanias, 2003*).

Los tres grupos principales de MAPKs son:

- Familia Erk (quinasas reguladas por señales extracelulares). Se distinguen dos miembros, Erk1 y Erk2. Esta familia es activada en respuesta a ciertas citoquinas y factores de crecimiento y da lugar principalmente a señales mitogénicas y anti-apoptóticas, por lo que se asocia con supervivencia celular. Bajo ciertas circunstancias también pueden promover la diferenciación.

- Familia p38. Está compuesta por cuatro isoformas que son p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ . Esta familia es activada principalmente por señales de estrés, pero también en respuesta a la interacción de diferentes receptores de citoquinas con sus correspondientes ligandos. Estas quinasas son necesarias para la regulación de la apoptosis, parada del ciclo celular, inducción de la diferenciación celular, así como producción de citoquinas e inflamación. La activación de esta ruta puede inducir también señales anti-apoptóticas, bajo ciertas condiciones, dependiendo del tejido y la isoforma que se active.

- Familia JNK (quinasa de c-Jun). Está compuesta por tres miembros, JNK1, JNK2 y JNK3. Estas proteínas son también activadas en respuesta a señales de estrés y factores de crecimiento, y están relacionadas con la inducción de apoptosis, producción de citoquinas y progresión del ciclo celular. La principal diana de estas quinasas es c-Jun, que junto a Fos forma el factor de transcripción AP1. Así, la mayoría de los efectos de JNK derivan de la expresión de genes regulados por AP1.



*Figura 15. Ruta de las MAPK*

Para que las MAPKs sean activadas requieren una fosforilación en residuos de treonina y tirosina que están situados en motivos específicos (ThrXaaTyr) para cada grupo de quinasas. Estas fosforilaciones están mediadas por las llamadas MEKs o MAPKKs y la activación de estas quinasas a su vez la llevan a cabo otras quinasas llamadas MAPKKKs, las cuales fosforilan a las MAPKKs en residuos específicos de serina. La activación de las diferentes MAPKKKs va a depender de las señales recibidas.

Estudios realizados sobre las rutas de señalización de las MAPKs han demostrado que tienen un papel muy importante en la regulación de la apoptosis y el crecimiento de células tumorales hematopoyéticas, lo que ha llevado a tratar de caracterizar el mecanismo preciso por el cual se producen estos fenómenos. La ruta Raf/MEK/Erk, la cual se ha caracterizado muy bien en leucemias humanas crónicas y agudas, linfomas y mieloma múltiple, participa en la generación de respuestas mitogénicas en tumores hematológicos. Además, Erk1/2 regulan la actividad y los niveles de proteínas de la familia de Bcl-2 como la proteína pro-apoptótica Bim y la proteína anti-apoptótica Mcl-1. En concreto, Erk media la fosforilación del factor de transcripción FOXO3A, que regula la expresión de Bim, para que sea degradado por el proteosoma. En cuanto a Mcl-



1, Erk fosforila a esta proteína estabilizándola y promoviendo la supervivencia de la célula tumoral. Por todo ello, la ruta de señalización de Erk es considerada como una prometedora diana terapéutica para el desarrollo de drogas antitumorales (*Park et al, 2010*).

Las rutas de JNK y p38 parecen mediar señales responsables de la sensibilidad o resistencia a ciertos agentes farmacológicos que se utilizan en terapia antitumoral. Existen reguladores comunes de ambas rutas de modo que diversos estímulos pueden activarlas simultáneamente. Por otro lado, los efectos de ambas vías de señalización pueden ser similares pero también antagónicos, según el contexto, existiendo una interacción entre ellas. Así, se ha descrito que p38 puede regular negativamente la actividad de JNK por diferentes mecanismos (*Wagner & Nebreda, 2009*). En general, los efectos producidos por las rutas de JNK y p38 van a depender del tipo celular y de la isoforma implicada en el proceso ya que se ha visto que, además de promover la apoptosis y actuar como supresores de tumores, también pueden activar fenómenos anti-apoptóticos, proliferativos y dar señales de supervivencia a la célula bajo ciertas condiciones.

Todos estos conocimientos han dado lugar al desarrollo de fármacos que son inhibidores específicos de las diferentes MAPKs, algunos de los cuales están siendo evaluados actualmente en clínica. Dado que la actividad Erk1/2 se encuentra aumentada en ciertos tumores, se ha convertido en diana de drogas inhibitoras que presentan escasa o nula toxicidad en células no transformadas, como los compuestos PD-184352 o PD-98059, actualmente en ensayos clínicos (*Sebolt-Leopold, 2000*). También se han desarrollado inhibidores específicos de JNK y de p38, algunos de los cuales se encuentran en fases I y II de ensayos clínicos para el tratamiento de determinados tipos de tumores.

#### **4.3.3. Ruta de PI3K**

La ruta de supervivencia iniciada por PI3K se pone en marcha por la unión de factores de crecimiento, como EGF, a sus receptores específicos, o bien directamente a través del proto-oncogen Ras (*Rodriguez-Viciano et al, 1996*).

Esta ruta determina la activación de la quinasa Akt, regulada en condiciones no patológicas por la proteína tirosina fosfatasa conocida como supresora de tumores PTEN (Li et al, 1997). Akt se encuentra incrementada en un elevado número de tumores, siendo capaz de bloquear señales intracelulares apoptóticas mediante fosforilación de distintos sustratos:

- Bad, que pierde así su capacidad de unión e inhibición de Bcl-x<sub>L</sub>
- Caspasa-9, inhibiendo su activación.
- Mdm2, favoreciendo su unión a p53 y así la degradación de esta proteína supresora de tumores.
- IKK, potenciando la ruta de supervivencia mediada por NF-κB.

El hecho de que PI3K participe en un gran número de procesos celulares que afectan a la proliferación, supervivencia, e incluso a la resistencia a la quimio- y la radio-terapia, ha fomentado la búsqueda de inhibidores específicos de esta ruta, como potenciales agentes antitumorales. Así, el compuesto LY-294002 que bloquea esta ruta de supervivencia inhibiendo de forma específica a PI3K, se ha usado en combinación con otros compuestos citotóxicos en ensayos *in vitro* e *in vivo* y se ha descrito como un agente sensibilizador a la apoptosis mediada por diversos estímulos, como el ligando de muerte TRAIL (Alladina et al, 2005).

#### ***4.4. Daño al ADN y apoptosis***

La replicación del ADN es un fenómeno de muy alta fiabilidad, ya que asegura el paso de toda la información del genoma a la célula hija. Sin embargo, el genoma está constantemente amenazado por diversos elementos, como los subproductos endógenos procedentes del metabolismo celular o factores medioambientales, que originan roturas de cadena simple o de doble cadena en el ADN. Cuando se produce este daño en el ADN se activan respuestas celulares que van a tratar de reparar dicho daño manteniendo la integridad del genoma. La

respuesta al daño al ADN incluye también la activación de vías de señalización que afectan al control del ciclo celular y a la inducción de apoptosis.

Las primeras proteínas que se activan en respuesta al daño al ADN son ATM (ataxia telangiectasia mutada) y ATR (ATM- and Rad3-related), ambas Ser-Thr quinasas de la familia de PI3K. Estas proteínas, que actúan como sensores nucleares, van a fosforilar y a activar una gran variedad de moléculas que llevarán a cabo la respuesta derivada del daño al ADN. ATM es activada principalmente en respuesta al daño de doble cadena producido por la radiación ionizante y actúa durante todas las fases del ciclo celular. ATR va a responder a agentes que interfieren en las horquillas de replicación del ADN, como luz ultravioleta e hidroxiurea. ATR puede activar muchas de las dianas de ATM, indicando que las dos vías principales de reparación del ADN están interconectadas (*Bao et al, 2001*).

Estas dos quinasas pueden dar lugar a la parada del ciclo celular, en respuesta al daño, mediante fosforilación de quinasas como CHK1 y CHK2. Ambas, junto con ATM y ATR, actúan por diferentes mecanismos reduciendo la actividad de las quinasas dependientes de ciclina (CDKs) y así inhibiendo la progresión del ciclo celular. La parada puede producirse en los puntos de control de las fases G1/S, S y G2/M (*Barlow et al, 1997*). De este modo, la célula tiene tiempo de reparar el ADN dañado antes de entrar en mitosis.

Otras proteínas relacionadas con la respuesta al daño al ADN y activadas por ATM/ATR son H2AX, BRCA1, BRCA2, Nbs1, 53BP1 y MDC1. Todas ellas son reclutadas al sitio del daño participando en los focos de reparación del mismo.

Por otro lado, ATM/ATR fosforilan y activan directa e indirectamente (a través de CHK2) a p53, proteína supresora de tumores e implicada en la inducción de apoptosis en respuesta al daño al ADN. Además, ATM inactiva a Mdm-2, proteína que induce la degradación de p53 (*Banin et al, 1998*). Todo ello conlleva a una acumulación de p53 durante la respuesta al daño al ADN, y

así a una activación de dianas transcripcionales de p53, como el inhibidor de CDKs p21<sup>WAF</sup>, que estará implicado en la parada del ciclo celular, o proteínas pro-apoptóticas como Bax, Noxa y Puma, entre otras. Además, se ha descrito la inducción de apoptosis mediada por p53 de manera independiente de su actividad transcripcional, por ejemplo, uniéndose y activando directamente a las proteínas Bax y Bak, como ya se mencionó anteriormente. Se ha propuesto que si el daño al ADN es pequeño, los niveles de p53 acumulados serán bajos pero suficientes para inducir la expresión de algunos genes como p21. Por el contrario, cuando el daño al ADN es importante, los niveles de p53 también serán elevados y entonces activará la expresión de los genes pro-apoptóticos. De este modo, p53 actuaría como sensor regulando la posible entrada de la célula en apoptosis, dependiendo de que el daño pueda o no ser reparable.

La capacidad de p53 para inducir apoptosis en la célula en respuesta al daño al ADN tiene importantes implicaciones terapéuticas. Los tratamientos clásicos antitumorales, la quimio- y la radioterapia, prácticamente se basan en la inducción de daño al ADN, con la consiguiente parada de ciclo celular e inducción de apoptosis en las células tumorales. Aquellas células tumorales en las que p53 es funcional deben responder a estos tratamientos, pero si p53 está mutada la célula podría tener problemas para entrar en apoptosis, comportándose entonces como resistente a dichas terapias.

Existen otros genes pertenecientes a la familia de p53, como son p63 y p73, que también están relacionados con el daño al ADN (*Vilgelm et al, 2008*). Una de las diferencias entre los miembros de esta familia es que p53 se expresa en todos los tipos celulares, mientras que p73 y p63 presentan especificidad tisular. Ambas proteínas se activan en respuesta al daño al ADN, y regulan la expresión de genes diana similares a los activados por p53, como p21, Noxa, Bax ó Puma (*Harms et al, 2004*), por lo que pueden sustituir a p53 en aquellas células tumorales en que esta proteína aparece mutada.

#### **4.5. Drogas epigenéticas y apoptosis**

La metilación del ADN y las modificaciones de las histonas pueden alterar la expresión de genes pro- y anti-apoptóticos, implicados tanto en el inicio como en la ejecución de este proceso de muerte celular, contribuyendo así a la inactivación de las rutas extrínseca e intrínseca de inducción de apoptosis. De ahí que las drogas epigenéticas, que revierten dichos procesos de metilación del ADN y de modificación de histonas, tengan la capacidad para sensibilizar a las células neoplásicas a la muerte por apoptosis.

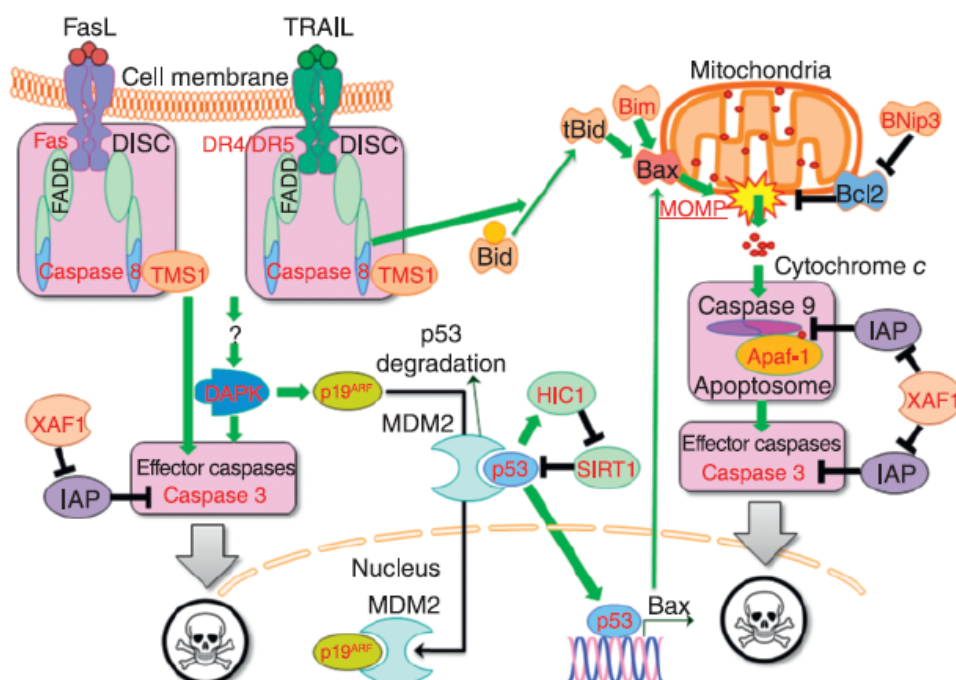
Una de las primeras evidencias sobre la capacidad de las drogas epigenéticas para regular genes directamente relacionados con las rutas apoptóticas fue la demostración de que el decitabine restauraba la expresión de DAPK1 (proteína quinasa asociada a muerte) en células de cáncer de vejiga y en líneas tumorales de células B (*Kissil et al, 1997*). También se comprobó que inducía desmetilación del promotor de DAPK1 en células Raji de linfoma de Burkitt, haciéndolas sensibles a la apoptosis mediada por interferón gamma (*Katzenellenbogen et al, 1999*). De la misma manera, el decitabine sensibiliza a células NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas) a la apoptosis inducida por TRAIL mediante re-expresión de DAPK1 (*Tang et al, 2004*).

El decitabine y los oligonucleótidos antisentido de la DNMT1 también aumentan la sensibilidad de células tumorales a la apoptosis mediada por interferón mediante la re-expresión de los genes pro-apoptóticos RASSF1A y XAF-1, que se encuentran frecuentemente silenciados por mecanismos epigenéticos en diferentes tumores.

Aunque las caspasas no aparecen inactivadas epigenéticamente durante la transformación neoplásica, sí se ha observado que la hipermetilación del promotor de la caspasa-8 va a dar lugar a la disminución o ausencia de su expresión en diferentes tipos de tumores, lo que provoca la resistencia a la apoptosis mediada por receptores de muerte. El tratamiento con decitabine parece ser efectivo ya que se ha comprobado que restablece la expresión de la caspasa-8

en células tumorales, haciéndolas sensibles a la apoptosis inducida por los ligandos de muerte TRAIL y CD95L (*Fulda et al, 2001*). En células de glioblastoma se ha demostrado una importante regulación por decitabine de la ruta apoptótica de TRAIL, ya que esta droga activa la expresión del receptor TRAIL-R1 y de la caspasa-8 y disminuye la del inhibidor de los receptores de muerte PED/PEA-15 (*Eramo et al, 2005*). Se ha descrito también la capacidad de decitabine para restaurar la expresión de Apaf-1 en células de melanoma, lo que las sensibiliza a la inducción de apoptosis por drogas quimioterapéuticas de forma dependiente de p53.

Por su parte, los HDACi también han demostrado su capacidad para regular la expresión del receptor TRAIL-R2 específicamente en células tumorales, sensibilizándolas a la apoptosis mediada por TRAIL (*Nakata et al, 2004*), y para inducir la expresión en células leucémicas mieloides de TNF- $\alpha$ , a través de la hiperacetilación de su promotor, facilitando así la muerte por apoptosis de forma auto- y paracrina en la población tumoral.



**Figura 16.** Las rutas apoptóticas se pueden desestabilizar por la metilación del ADN. Figura obtenida del artículo de Nabil Hajji and Bertrand Joseph, 2010.

En general, la inducción de apoptosis representa un efecto común en las células tumorales tratadas con drogas epigenéticas, y el tratamiento combinado con inductores de hipometilación e inhibidores de HDAC muestra un efecto sinérgico que sugiere que ambos tipos de drogas actúan mediante mecanismos complementarios.

### ***III. OBJETIVOS***





Los inhibidores de DNMTs constituyen un nuevo grupo de fármacos que están resultando ser muy efectivos en la inhibición de la proliferación y supervivencia de células tumorales. Los estudios realizados con este tipo de drogas se han centrado principalmente en su acción desmetilante sobre genes supresores de tumores, acción que permite la reactivación de la expresión y función de dichos genes ayudando a la eliminación de las células tumorales. Además se han descrito otros posibles mecanismos de acción citotóxica para estas drogas, como es la inducción de daño al ADN.

En leucemias linfoblásticas T se ha asociado el silenciamiento de ciertos genes a una metilación aberrante de los mismos. En este trabajo nos hemos propuesto estudiar el efecto de inhibidores de metilación del ADN en el modelo de leucemias de células T. En concreto, planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto de los inhibidores de DNMTs decitabine y zebularine sobre el ciclo celular, la proliferación y la supervivencia de células T leucémicas.
2. Conocer la toxicidad de decitabine y zebularine sobre linfocitos T normales.
3. Estudiar la vía de señalización implicada en la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en células T leucémicas.
4. Analizar el mecanismo de inducción de apoptosis por los análogos de nucleósidos decitabine y zebularine en células T leucémicas.
5. Estudiar la posible modulación de la acción citotóxica de decitabine y zebularine cuando se combinan con otras drogas quimioterapéuticas.



## ***IV. MATERIALES Y MÉTODOS***



### *1. Células y cultivos celulares*

Las muestras de sangre, procedentes de donantes voluntarios sanos, fueron recogidas en tubos con citrato. Las células mononucleares se obtuvieron por centrifugación en gradiente de Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), eliminando los monocitos del cultivo por adhesión al frasco tras incubación de 1 hora a 37 °C. Los linfocitos T de sangre periférica fueron aislados por selección negativa mediante un sistema de unión indirecta a partículas magnéticas, constituido por un grupo de anticuerpos frente a CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 y CD235a asociados a biotina (Human Pan T Cells Isolation Kit II, Miltenyi Bistec, GmbH). La pureza de los linfocitos T fue superior al 95%, establecida mediante determinación del porcentaje de células CD3 positivas tras marcaje con un anticuerpo directo (OKT3-FITC) y análisis por citometría de flujo.

Las células T en reposo se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Cambrex, Bio Sciece, Bélgica) enriquecido con suero bovino fetal (GIBKO, California, USA) al 10%, L-glutamina 1 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Cambrex) (medio completo), y se mantuvieron en un incubador a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

La activación de linfocitos T se realizó mediante cultivo a la concentración de 2x10<sup>6</sup> células/ml en presencia de 5 µg/ml PHA (fitohemoglutinina-M, Roche, Indianápolis, USA) y 1 µg/ml anti-CD28 durante 20 horas. Tras lavar con PBS, los linfocitos se cultivaron en medio completo suplementado con 25 U/ml de IL-2 durante 5 días.

Las líneas celulares T leucémicas humanas Jurkat, CEM-6, MOLT-4 y HPB-ALL, fueron amablemente proporcionadas por el Dr. Abelardo López-Rivas (CABIMER, Sevilla). Las células Jurkat deficientes en caspasa-9 y células Jurkat a las que se le ha reconstituido la caspasa-9 (Samraj et al, 2007), fueron cedidas por el Dr. Klaus Schulze-Osthoff (Interfaculty Institute of Biochemistry,

University of Tübingen, Alemania). Todas estas líneas celulares fueron mantenidas en medio RPMI completo en un incubador a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células Jurkat que sobreexpresan de forma estable Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>, fueron cedidas generosamente por el Dr. Jacint Boix (Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Universidad de Lleida, España) y se mantuvieron en cultivo con medio completo RPMI y 1mg/ml de G418 sulfatado (Sigma Chemical Co.).

Las líneas tumorales de cáncer de mama, MDA-MB231, MCF-7, SKBr3 y BT474 y la línea celular Hela de cáncer de cervix, se mantuvieron en medio completo RPMI y en las mismas condiciones que las líneas de células T leucémicas.

Las muestras de sangre de pacientes con linfoma o con leucemia de células T fueron proporcionadas por el Hospital Virgen de Las Nieves de Granada, y los linfocitos de sangre periférica fueron obtenidos por centrifugación en gradiente de Ficoll- Histopaque (Sigma-Aldrich) y resuspendidas en medio RPMI 1640 completo, para ser tratadas y analizadas de forma inmediata.

## ***2. Reactivos y Anticuerpos***

El inhibidor de DNMT decitabine, la sonda fluorescente dihidroetidido, el anticuerpo anti-β-actina, el anticuerpo monoclonal anti-p53, el inhibidor LY 294002 y los compuestos nocodazol, ácido valproico (VPA), tricostatina A (TSA), butirato sódico (NaB) y MS-275, se obtuvieron de Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). El inhibidor de DNMT zebularine, el inhibidor de HDAC apicidina, los compuestos PD 98059 (inhibidor de MEK), SP 600125 (inhibidor de JNK) y SKF 86002 (inhibidor de p38MAPK) y el anticuerpo monoclonal anti-Bak (Ab-1), fueron obtenidos de Calbiochem (Darmstadt, Germany). El ligando de muerte TRAIL recombinante fue donado por el Dr. Abelardo López- Rivas (CABIMER, Sevilla). El inhibidor de HDAC vorinostat (SAHA, Zolinza®) fue generosamente cedido por Merck Research Laboratories (Boston, MA). Los anticuerpos frente a

los receptores de TRAIL y frente a TRAIL (clon 2E5) se obtuvieron de Alexis Biochemicals (San Diego, CA). El inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK, se adquirió de Bachem (Bubendorf, Switzerland). El anticuerpo monoclonal frente a CD28 humano se obtuvo de eBioscience (San Diego, CA). El anticuerpo monoclonal anti-caspasa-8 se obtuvo de Cell Diagnostica (Munster, Germany). El anticuerpo monoclonal anti-caspasa-9 y los inhibidores específicos de caspasa-8 (Z-IETD-FMK) y caspasa-9 (Z-LEHD-FMK), se obtuvieron de R&D Systems (Minneapolis, MN). El anticuerpo monoclonal anti-PARP, anti-XIAP, anti-c-IAP2 y anti-Bax se obtuvieron de BD Biosciences (San Jose, CA). El anticuerpo monoclonal anti-Bcl-2 fue de Dako (Glostrup, Denmark). En cuanto al anticuerpo monoclonal anti-Bcl-x<sub>L</sub> se obtuvo de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). El anticuerpo policlonal de conejo anti-caspasa-3 de Stressgen (Ann Arbor, MI). El anticuerpo monoclonal anti-DNMT1 fue obtenido de Abcam (Cambridge, UK). El anticuerpo monoclonal anti-fosfo-histona H2AX (Ser139) se obtuvo de Upstate/Millipore (Billerica, MA). El catión fluorescente lipofílico 3,3'-dihexyloxacarbo-cianina ioduro (DiOC<sub>6</sub>(3)) fue de Molecular Probes (Carlsbad, CA). El antioxidante porfirina de Manganeso Mn(III)TMPyP se obtuvo de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

### ***3. Determinación de células apoptóticas***

Las células apoptóticas hipodiploides fueron detectadas por citometría de flujo de acuerdo con el protocolo publicado (Gong et al, 1994). De forma breve, las células se lavaron con buffer salino (PBS), se resuspendieron en 100 µl del mismo y se fijaron durante 5 minutos en 900 µl de una solución de etanol al 70 % frío. Después de lavar el exceso de etanol, se resuspendieron en 250 µl de PBS, se añadió 250 µl de una solución de extracción de ADN (0.2 M NaHPO<sub>4</sub>, 0.1 M ácido cítrico pH 7.8) y se incubaron 10 minutos a 37 °C. Finalmente, para la tinción del ADN se incubaron en 200 µl de PBS conteniendo 100 µg/ml de ARNasa y 40 µg/ml de ioduro de propidio, durante 30 minutos a 37 °C en



oscuridad. El análisis del pico sub-G1 del ciclo celular se realizó midiendo la fluorescencia del ADN en el detector FL2 o en FL3 del citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson) utilizando el programa Cell Quest (BD Biosciences).

Otro método empleado para la cuantificación de la muerte por apoptosis fue la detección del fosfolípido fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular mediante la proteína Anexina-V-FLUOS (Roche), que se une al fosfolípido en presencia de  $\text{Ca}^{++}$ . Las células se suspendieron en un tampón de incubación compuesto por Hepes NaOH 10 mM pH 7.4, NaCl 140 mM y  $\text{CaCl}_2$  5 mM al que se añadió Anexina-V-FLUOS a la concentración indicada por el fabricante durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La externalización de la fosfatidilserina se detectó en la región de emisión correspondiente a FL1 del citómetro de flujo.

#### ***4. Análisis por citometría de flujo de la proliferación celular***

Para determinar la proliferación celular, 250.000 células han sido incubadas con 0,5µl de CFDA-SE a la concentración de 5mM, durante 5 minutos en oscuridad a 37°C, a continuación realizan dos lavados a las células con 50 ml de PBS suplementado al 20% de FBS. La proliferación celular se determinó detectando la región de emisión correspondiente a FL1 del citómetro de flujo.

#### ***5. Análisis por citometría de flujo de los receptores de TRAIL***

Para la detección del ligando de muerte TRAIL y sus receptores en superficie, las células ( $2.5 \times 10^5$ ) se lavaron y se incubaron con PBS conteniendo el anticuerpo primario monoclonal correspondiente (5 µg/ml) durante 30 minutos a 4 °C. Tras lavar con PBS para eliminar los restos del anticuerpo primario no unido al receptor, las células se incubaron con un anticuerpo frente a Ig de ratón,

conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Caltag laboratories, Invitrogen) durante 30 minutos a 4° C. Tras esta segunda incubación, las células se lavaron de nuevo, se resuspendieron en PBS y se analizaron en el detector FL1 del citómetro FACScan.

### ***6. Análisis por citometría de flujo de la activación de Bak***

Para detectar la activación de Bak, las células ( $2.5 \times 10^5$ ) se lavaron en PBS y a continuación fueron fijadas en paraformaldehído al 0.25%, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS, las células se incubaron con un anticuerpo anti-Bak en una solución de PBS con suero fetal bovino al 1% y 100  $\mu\text{g/ml}$  de digitonina, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente, las células fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor-488 (Molecular Probes, Invitrogen), durante 30 minutos a 4 °C y en oscuridad. Por último, las células se lavaron, se resuspendieron en PBS y se analizaron en un citómetro FACScan con el programa Cell Quest software.

### ***7. Determinación del potencial de membrana mitocondrial y la producción de ROS***

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se analizaron mediante citometría de flujo. Las células ( $2.5 \times 10^5$ ) fueron incubadas durante 20 minutos a 37 °C en oscuridad en medio de cultivo RPMI 1640 al 5% de FBS, conteniendo la sonda fluorescente dihidroetidio (DHE, 2  $\mu\text{M}$ ) sensible al anión superóxido y el catión lipofílico fluorescente DIOC<sub>6</sub> (10 nM) sensible a los cambios del potencial de membrana mitocondrial. Las células fueron sometidas a un análisis cuantitativo en un citómetro FACScan con el programa Cell Quest software.

## ***8. Inmunodetección de proteínas por Western Blot***

Las células control y tratadas fueron lavadas con PBS y lisadas en soluciones de distinta composición en función de la localización de la proteína a detectar.

Para la detección de proteínas citosólicas, las células ( $1 \times 10^6$ ) se incubaron durante 30 minutos en hielo con 100  $\mu$ l de buffer de lisis (150 mM NaCl, 50 mM Tris-ClH y NP-40 al 1%). Los sobrenadantes citosólicos se separaron por centrifugación durante 10 minutos a 13000g y se les añadió tampón de carga. En todos los casos las proteínas del sobrenadante se cuantificaron por el método Bradford (Sigma) antes de añadir el tampón de carga, buffer Laemmli compuesto por Tris 2 M pH 6.8, urea 6 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 6%, azul de bromofenol 0.003% y SDS al 3%.

La detección de proteínas nucleares se llevó a cabo a partir de extractos celulares totales. Para ello, las células ( $5 \times 10^6$ ) fueron resuspendidas en 100  $\mu$ l de una solución de lisis (50 mM Tris pH 8, 0.1 mM EDTA, 0.5% Tritón X-100, 12.5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol), y a continuación fueron incubadas 30 minutos a 4 °C. Después se centrifugaron durante 15 minutos a 13.000 g y se recogió el sobrenadante, al cual se le añadió el tampón de carga.

Las proteínas se separaron en geles de SDS-poliacrilamida (Bio-Rad) al 7.5 %, 10 % ó 12 %, en función del tamaño de la proteína a detectar, en el sistema Mini Protean (Bio-Rad) durante 80 minutos a 140 voltios. A continuación se transfirieron las proteínas desde el gel a una membrana de PVDF (Millipore) por transferencia semiseca empleando el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad) durante 50 minutos a 50 mA.

Las membranas se bloquearon con una solución de PBS / 0.1% Tween 20 (PBSt) con 5% de leche en polvo durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron con PBSt y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, o toda la noche a 4 °C, con el anticuerpo correspondiente frente a la proteína a detectar,

diluido en PBSt con 1% de leche. Tras la incubación, las membranas se lavaron tres veces con PBSt durante 5 minutos y finalmente se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (frente a Ig de ratón o de conejo según el caso) marcado con peroxidasa de rábano (HRP), preparado en solución de bloqueo. Tras otros tres lavados de 5 minutos con PBSt las membranas se revelaron por quimioluminiscencia empleando el reactivo ECL (Amersham Biosciences) y recogiendo la señal en placas fotográficas (AGFA) o bien con el sistema de captación de quimioluminiscencia (LAS-4000 mini, Fujifilm) y análisis del resultado con el software Multicaule V.30 (Fujifilm).

### ***9. Ensayo cometa***

Para determinar el daño al ADN se utilizó el reactivo Comet Assay Kit (*R&D Systems*), siguiendo las especificaciones del fabricante pero con algunas modificaciones. Las células ( $1 \times 10^5$ ) se mezclaron con azarosa de bajo punto de fusión, previamente calentada a 37 °C, en una proporción de 1:10 vol/vol. Se pusieron 75 µl de la suspensión de células en portaobjetos específicos del kit y se incubaron durante 10 minutos en oscuridad a 4 °C, hasta que la mezcla se solidificó. A continuación, los portaobjetos fueron sumergidos en una solución de lisis previamente enfriada a 4 °C durante 30 minutos, se lavaron en 50 ml de solución TBE y se colocaron en una fuente de electroforesis horizontal en solución TBE, equidistantes de los electrodos. Se les sometió a un voltaje de 1 volt por centímetro (distancia entre electrodo y electrodo), durante 20 minutos. Seguidamente, las muestras fueron lavadas en agua destilada, se sumergieron en etanol frío al 70 % durante 5 minutos y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se tiñeron con 50 µl de SYBR Green del kit, previamente diluido en TE, dejándolo incubar durante 5 minutos en oscuridad a 4 °C, se retiró el exceso de SYBR Green y se dejó secar a temperatura ambiente en oscuridad.

Las muestras teñidas se analizaron en un microscopio de fluorescencia. Se evaluaron de 70 a 90 células de cada muestra usando el programa Comet Assay

Software Project (CASP). El daño al ADN se cuantificó determinando “el momento de cola” del cometa (TM), que corresponde al producto del porcentaje de ADN en la cola del cometa por la longitud de la cola.

## ***10. PCR Array***

El ARN total se purificó utilizando el reactivo RNeasy Mini Kit (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células ( $5 \times 10^6$ ) se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con un buffer que contiene  $\beta$ -mercaptoetanol y tiocianato de guanidina. Se homogeneizaron en columnas proporcionadas por el kit, y se les añadió etanol al 70%. A continuación se realizó una digestión con ADNasa, para degradar el ADN, se lavó la columna y finalmente se añadió agua libre de ARNasa para recoger el eluido. Una vez obtenido, se midió la cantidad de ARN purificado en un espectrofotómetro.

Para eliminar cualquier posible contaminación de ADN génomico (ADNg) de la muestra, y así evitar falsos positivos, al ARN total purificado se le agregó un buffer de eliminación de ADNg que contiene ADNasa, proporcionado por el reactivo RT<sup>2</sup> First Strand Kit (SABiosciences), se incubó durante 5 minutos a 42 °C y pasado este tiempo se enfrió inmediatamente en hielo.

Para llevar a cabo la síntesis del ADN complementario (ADNc), se preparó una mezcla con buffer de retrotranscripción, primer poliA, enzima retrotranscriptasa y agua libre de ARNasa, todo ello proporcionado por el RT<sup>2</sup> First Strand Kit. Esta mezcla se añadió a la muestra de ARN total y el proceso de retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems mediante incubación de 15 minutos a 42 °C seguido de 5 minutos a 95 °C.

La PCR a tiempo real se realizó mezclando el ADNc, producto de la retrotranscripción, con el reactivo RT<sup>2</sup> SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (SABiosciences), de acuerdo a las instrucciones facilitadas por el fabricante. A

continuación se agregó 25 µl de la mezcla a cada pocillo de la placa de RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array System y se llevó a cabo la PCR en el sistema ABI 7500 de Applied Biosystem, siguiendo los siguientes pasos: 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

El agente intercalante SYBR Green se une al ADN de doble cadena inmediatamente después de su síntesis y emite fluorescencia tras su estimulación (absorción a 497 nm y emisión a 520 nm). La emisión es recogida por el sistema detector del equipo en cada uno de los ciclos de PCR, siendo la fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN formado. El ciclo de la PCR en que se comienza a detectar el incremento de la señal se denomina ciclo umbral o Ct (threshold cycle) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN de la muestra. Los valores de Ct de cada muestra se normalizaron con respecto a cinco genes de referencia de expresión estable (“housekeeping”) que incluye el propio kit de PCR Array. La cuantificación relativa de la expresión génica se determinó usando un método comparativo donde el número de veces de inducción es igual a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , siendo  $\Delta\Delta Ct$  la diferencia entre el  $\Delta Ct$  de la muestra problema y el  $\Delta Ct$  de la muestra control (normalizados según la expresión de los genes de referencia) (Wang et al, 2002).

## ***11. Análisis estadístico***

Los datos se analizaron mediante el test de la t de Student no pareado utilizando el programa GraphPad Prism 4 para Windows. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos.



## ***IV. RESULTADOS***





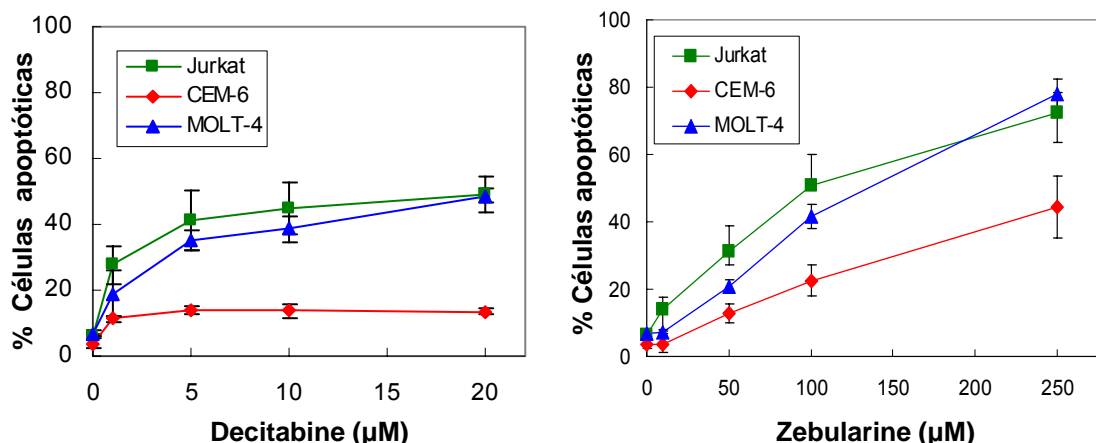
---

## ***1. Inducción de apoptosis por los inhibidores de metilación del ADN decitabine y zebularine en células T leucémicas***

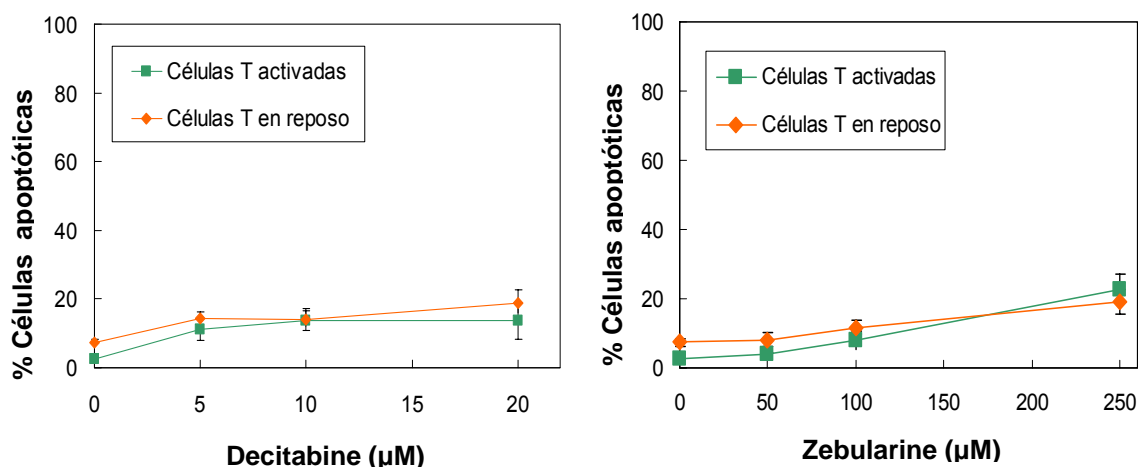
### ***1.1. Decitabine y zebularine inducen apoptosis de forma selectiva en células T leucémicas.***

Se ha descrito que los inhibidores de las ADN metiltransferasas, decitabine y zebularine, tienen capacidad para inducir apoptosis en distintos tipos de células tumorales, debido a su acción desmetilante (*Schmelz et al, 2005; Stumpel et al, 2009*). Con objeto de conocer el efecto de estos inhibidores sobre células T leucémicas, en primer lugar analizamos la inducción de apoptosis en tres líneas celulares T leucémicas humanas, Jurkat, CEM-6 y MOLT-4, en las cuales la proteína supresora de tumores p53 se encuentra mutada. Para ello, tratamos las células durante dos días con dosis de zebularine y decitabine similares a las descritas y utilizadas en otros estudios, en los cuales se ha comprobado que dichas dosis inducen hipometilación en leucemias y otros tipos de tumores (*Scott et al, 2007; Qin et al, 2009*).

Observamos que las líneas celulares Jurkat y MOLT-4 responden de forma similar a zebularine y decitabine, de modo que ambos agentes inducen una apoptosis significativa en estas células a las distintas dosis utilizadas, a excepción de la dosis 10  $\mu$ M de zebularine (Fig. 1). En cuanto a la línea T leucémica CEM-6, la respuesta observada tras el tratamiento con estas drogas es diferente a la que se produce en las células Jurkat y MOLT-4. Las células CEM-6 presentan una menor sensibilidad a la inducción de apoptosis por zebularine, aunque dosis superiores a 10  $\mu$ M también producen una apoptosis significativa en este tipo de células. Y su sensibilidad al decitabine es muy baja, en comparación con las otras dos líneas celulares, si bien el porcentaje de muerte obtenido es estadísticamente significativo (Fig. 1).



**Figura 1. Inducción de apoptosis en líneas celulares T leucémicas tratadas con decitabine y zebularine.** Las líneas celulares Jurkat, MOLT-4 y CEM-6, fueron tratadas durante 48 horas con distintas dosis de decitabine y zebularine. El porcentaje de células en la fase sub-G1 del ciclo celular se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error corresponden al error estándar de la media (SEM) de tres experimentos independientes.



**Figura 2. Inducción de apoptosis en linfocitos T primarios tratados con decitabine y zebularine.** Linfocitos T primarios en reposo y activados, extraídos de donantes sanos, se trataron durante 48 horas con distintas dosis de decitabine y zebularine. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error corresponden al SEM de tres experimentos con tres donantes diferentes.

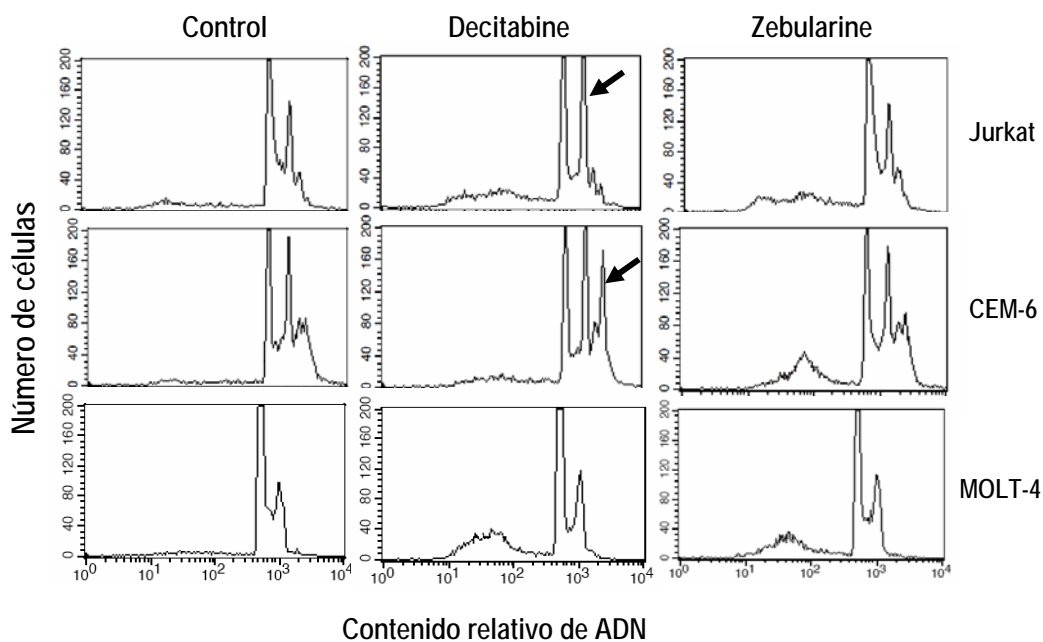
---

Para determinar si el efecto de estas drogas es producido exclusivamente sobre células tumorales, hemos analizado la posible inducción de apoptosis por zebularine y decitabine en linfocitos T normales extraídos de donantes sanos, tanto en reposo como activados. Tras someter a estas células a tratamiento durante 48 horas, observamos que el decitabine, a todas las dosis utilizadas, presenta una ligera toxicidad, aunque no es significativa, sobre ambos tipos de linfocitos, en reposo y activados; mientras que el zebularine solo induce una leve toxicidad, en los linfocitos de donantes sanos tanto activados como en reposo, a dosis muy elevadas del orden de 250  $\mu\text{M}$  (Fig. 2).

Para continuar con este estudio y profundizar en el efecto y el mecanismo de acción de estos agentes desmetilantes sobre líneas celulares T leucémicas, seleccionamos las dosis de 5  $\mu\text{M}$  de decitabine y 50  $\mu\text{M}$  de zebularine, ya que éstas inducen unos porcentajes elevados de apoptosis en las células tumorales sin presentar toxicidad para los linfocitos T normales, especialmente en el caso del zebularine.

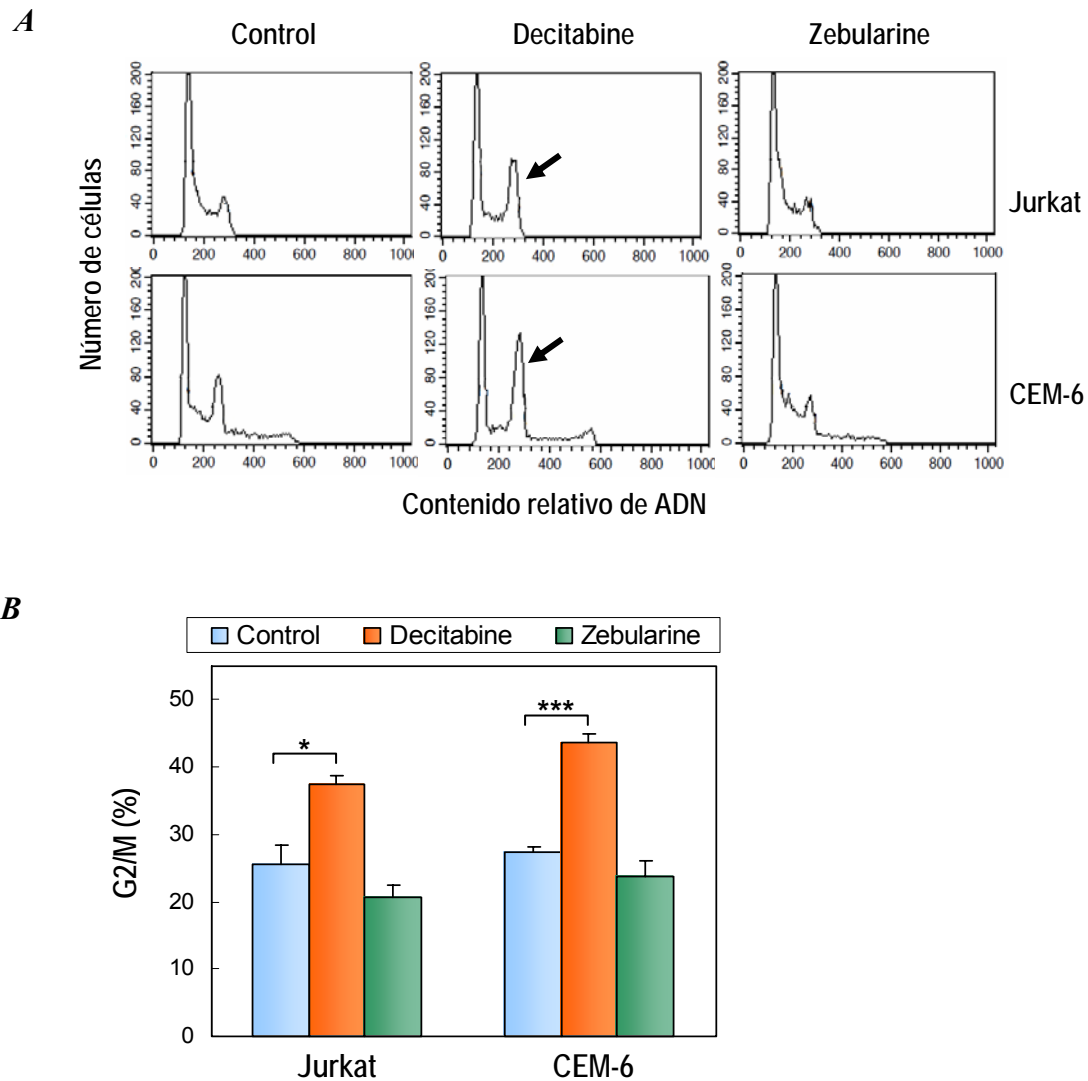
### ***1.2. Regulación por decitabine y zebularine del ciclo celular y la proliferación en células T leucémicas.***

El análisis de la fase sub-G1 del ciclo celular mediante citometría de flujo, realizado para determinar el porcentaje de células apoptóticas, nos revela que decitabine y zebularine no sólo se diferencian en su capacidad para inducir apoptosis en las diferentes líneas celulares T leucémicas, sino también en su capacidad para afectar a la progresión del ciclo celular. En dicho análisis se observa que, tras el tratamiento con decitabine, las líneas tumorales Jurkat y CEM-6 sufren una parada en la fase G2 del ciclo celular, hecho que no se aprecia en la línea MOLT-4. Además encontramos que esta parada en la fase G2 del ciclo no se produce cuando las mismas líneas se tratan con el agente desmetilante zebularine (Fig. 3).



**Figura 3. Perfil del ciclo celular en células T leucémicas tratadas con decitabine y zebularine.** El ciclo celular de las líneas T leucémicas Jurkat, CEM-6 y MOLT-4, tratadas o no (Control) durante 48 horas con decitabine ( $5\mu\text{M}$ ) o zebularine ( $50\mu\text{M}$ ), se analizó mediante citometría de flujo y utilizando una escala de amplificación logarítmica. Las flechas en los histogramas señalan el pico correspondiente a la parada en G2/M.

Para confirmar estos resultados se ha realizado un estudio mediante citometría de flujo en el cual se analiza el contenido en ADN de la población de células viables, no apoptóticas, utilizando una escala de amplificación lineal, en lugar de logarítmica (Fig. 4A). El incremento en el porcentaje de células en la fase G2/M del ciclo celular de las líneas Jurkat y CEM-6, en respuesta al tratamiento con decitabine, es estadísticamente significativo (Fig. 4B). Estos resultados indican que la sensibilidad de las diferentes líneas de células T leucémicas a los inhibidores de ADN metiltransferasas, no se correlaciona con los cambios o la modulación que estos inhibidores ejercen sobre la progresión del ciclo celular.

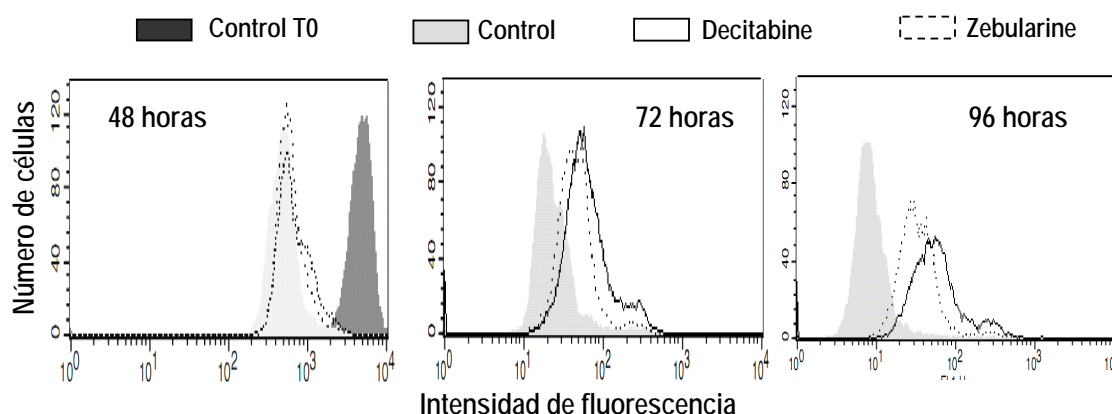


**Figura 4. Decitabine induce parada del ciclo celular en G2/M en células Jurkat y CEM-6.** Células Jurkat y CEM-6 fueron tratadas durante 48 horas sin (Control) o con decitabine ( $5\mu\text{M}$ ) o zebularine ( $50\mu\text{M}$ ). **(A)** Perfil del ciclo celular de las células viables, no apoptóticas, analizado mediante citometría de flujo con escala lineal. Las flechas señalan el pico correspondiente a la parada en G2/M. **(B)** Cuantificación del porcentaje de células en fase G2/M del ciclo celular. Las barras de error nos muestran el SEM de tres experimentos independientes, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

Todos los experimentos llevados a cabo hasta el momento corresponden a tratamientos de 48 horas. Como acabamos de explicar, el zebularine no afecta a la progresión del ciclo celular a este tiempo, y en el caso de la línea celular MOLT-4 ni siquiera se observa la parada en G2/M en respuesta al tratamiento

con decitabine. Utilizamos por ello esta línea para analizar el efecto de los inhibidores de metilación sobre la proliferación celular a tiempos más largos de 48 horas, mediante marcaje con la sonda fluorescente CFSE.

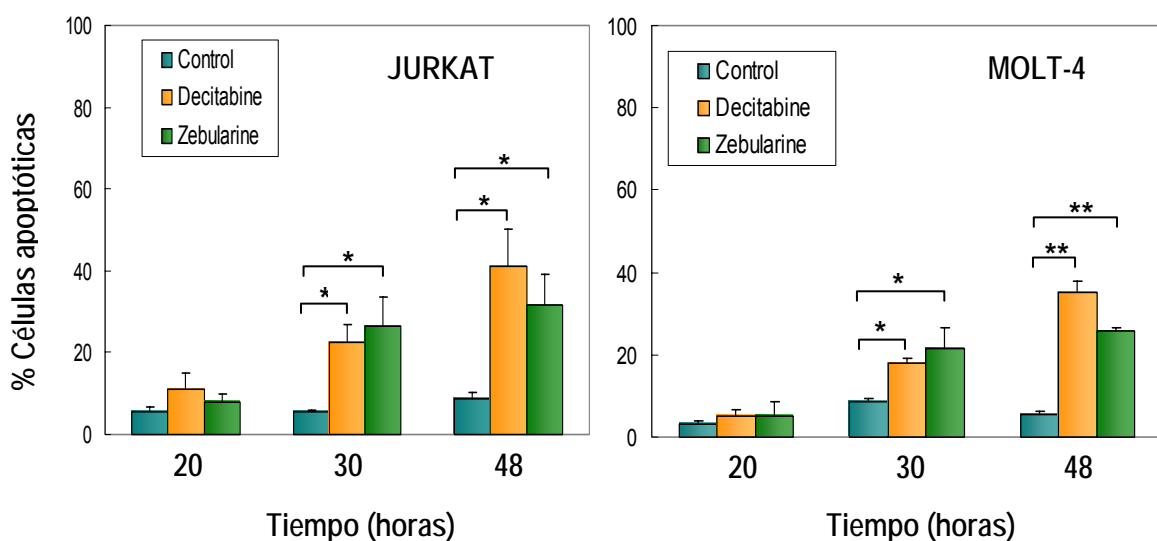
Como se observa en la figura 5, tras 48 horas de tratamiento las células tratadas con decitabine y zebularine presentan la misma intensidad de fluorescencia que las células control, no tratadas. Sin embargo, a partir de las 72 horas, la intensidad de fluorescencia es mayor en las células tratadas que en las controles, lo que indica un menor índice de división celular, o dicho de otro modo, una parada de la proliferación. Estos resultados indican que además del efecto inductor de apoptosis, los agentes desmetilantes decitabine y zebularine pueden ejercer su acción antitumoral sobre células T leucémicas inhibiendo la proliferación celular de las células que no entran en apoptosis.



**Figura 5. Inhibición de la proliferación en células MOLT-4 tratadas con decitabine y zebularine.** Células MOLT-4 fueron teñidas con CFSE, siguiendo el protocolo descrito en *Materiales y Métodos*, y se midió la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo a tiempo cero (Control T0). A continuación las células se incubaron sin (Control) o con decitabine (5 $\mu$ M) o zebularine (50 $\mu$ M) durante 48, 72 y 96 horas y se determinó la intensidad de fluorescencia a los diferentes tiempos.

### 1.3. Decitabine y zebularine inducen apoptosis dependiente de caspasas en células T leucémicas.

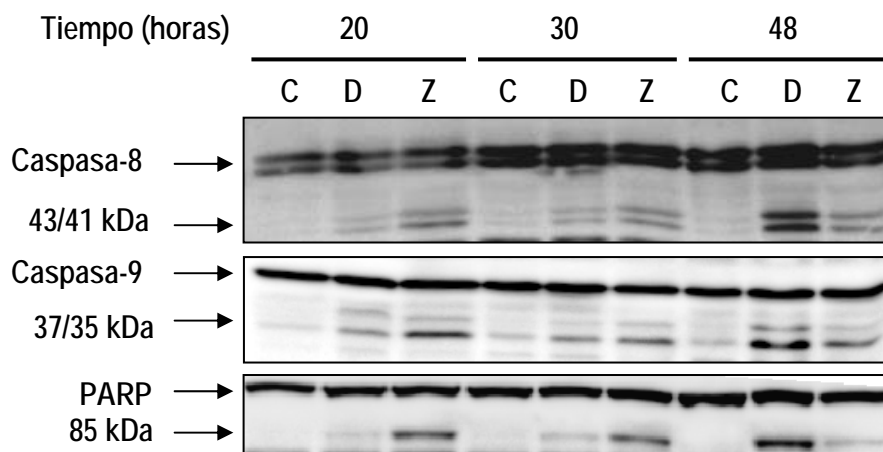
Comprobada la capacidad de decitabine y zebularine para inducir apoptosis en células T leucémicas, y sabiendo que a las 48 horas ya se observa una proporción considerable de células apoptóticas, realizamos experimentos para conocer la cinética de inducción de apoptosis. Nos hemos centrados en las líneas celulares Jurkat y MOLT-4 ya que, como hemos demostrado anteriormente, son más sensibles a la acción de los dos agentes desmetilantes. Llevamos a cabo distintos tiempos de tratamiento - 20, 30 y 48 horas - y estudiamos la proporción de células apoptóticas a cada uno de ellos. Los resultados obtenidos nos indican que a las 30 horas de tratamiento ya se observa un porcentaje relativamente elevado y significativo de células apoptóticas en las dos líneas celulares analizadas (Fig. 6).



**Figura 6. Cinética de inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en células T leucémicas.** Células Jurkat y MOLT-4 fueron no tratadas (control) o tratadas durante 20, 30 y 48 horas con decitabine ( $5\mu\text{M}$ ) ó zebularine ( $50\mu\text{M}$ ). El porcentaje de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error nos muestran el SEM de tres experimentos independientes.



Para comprobar si la muerte observada en estas líneas celulares tras el tratamiento con los agentes desmetilantes es muerte por apoptosis dependiente de caspasas, analizamos la activación de caspasas, tanto iniciadoras como efectoras, a diferentes tiempos de tratamiento con decitabine y zebularine.

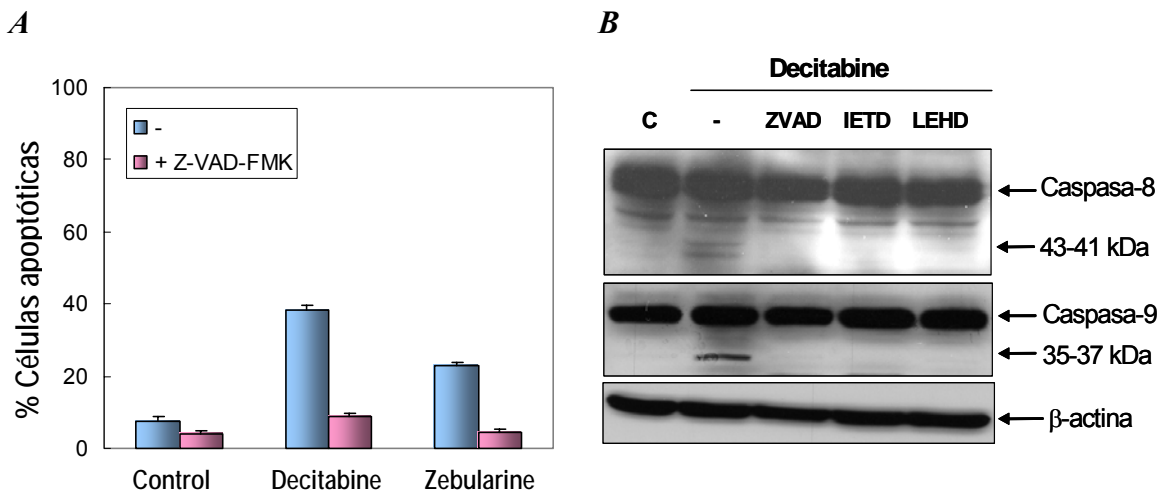


**Figura 7. Cinética de activación de caspasas por decitabine y zebularine en células Jurkat.** La activación de las caspasas iniciadoras -8 y -9 y la degradación de PARP se determinó mediante Western-blot, en células Jurkat no tratadas (C) o tratadas durante 20, 30 y 48 horas con 5 $\mu$ M decitabine (D) o 50 $\mu$ M zebularine (Z).

Encontramos que los dos inhibidores de DNMTs dan lugar al procesamiento de las caspasas iniciadoras -8 y -9, indicativo de su estado de activación, además de inducir la fragmentación de PARP, sustrato de caspasas efectoras. La activación de todas las caspasas se observa al tiempo más corto estudiado, 20 horas, tanto en células Jurkat como en células MOLT-4 (Fig. 7 y datos no mostrados). También hay que destacar en este experimento una ligera diferencia en la inducción de apoptosis entre el decitabine y el zebularine, de manera que la activación de caspasas producida por zebularine a los tiempos más cortos es mayor que la que se observa en el caso del decitabine (Fig.7). Esto, junto a los datos del porcentaje de células en la fase sub-G1 del ciclo celular a 30 horas (Fig.

6) sugiere que la cinética de inducción de apoptosis por zebularine puede ser algo más rápida que la del decitabine.

Para confirmar la importancia de las caspasas y por tanto su participación en la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine, preincubamos las células con el inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK, antes de tratarlas con los inhibidores de DNMTs. Así encontramos que la apoptosis inducida por ambos agentes desmetilantes se previene completamente en aquellas células que han sido pretratadas con el inhibidor (Fig. 8A), demostrando la implicación de las caspasas en este proceso de inducción de muerte celular.



**Figura 8. La inhibición de caspasas inhibe la apoptosis inducida por decitabine y zebularine.** **A)** Células Jurkat fueron pre-incubadas durante 1 hora en ausencia o en presencia del inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK (20 $\mu$ M) y a continuación fueron tratadas o no (Control) durante 48 horas con decitabine 5 $\mu$ M o zebularine 50 $\mu$ M. Las células en fase sub-G1 fueron determinadas por citometría de flujo. Las barras de error nos muestran el SEM de tres experimentos independientes. **B)** La activación de las caspasas-8 y -9 se determinó, mediante Western-blot, en células Jurkat pre-tratadas durante 1 hora con el inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK o con los inhibidores específicos Z-IETD-FMK y Z-LEHD-FMK, a una concentración de 20 $\mu$ M, e incubadas durante 48 horas con decitabine 5 $\mu$ M.

Mediante western-blot, comprobamos que tras el tratamiento con el inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK no se produce el corte de las caspasas -8 y -9 en células tratadas con decitabine o zebularine (Fig. 8B y datos no mostrados). Hemos utilizado también inhibidores específicos de ambas caspasas, Z-IETD-FMK como inhibidor de caspasa-8 y Z-LEHD-FMK como inhibidor de caspasa-9, para tratar de comprobar el orden de activación de estas caspasas iniciadoras. Sin embargo, encontramos que ambos inhibidores impiden el corte de las dos caspasas iniciadoras lo que sugiere que, a pesar de usarlos a dosis bajas (20 $\mu$ M), podrían no estar actuando de forma específica (Fig. 8B).

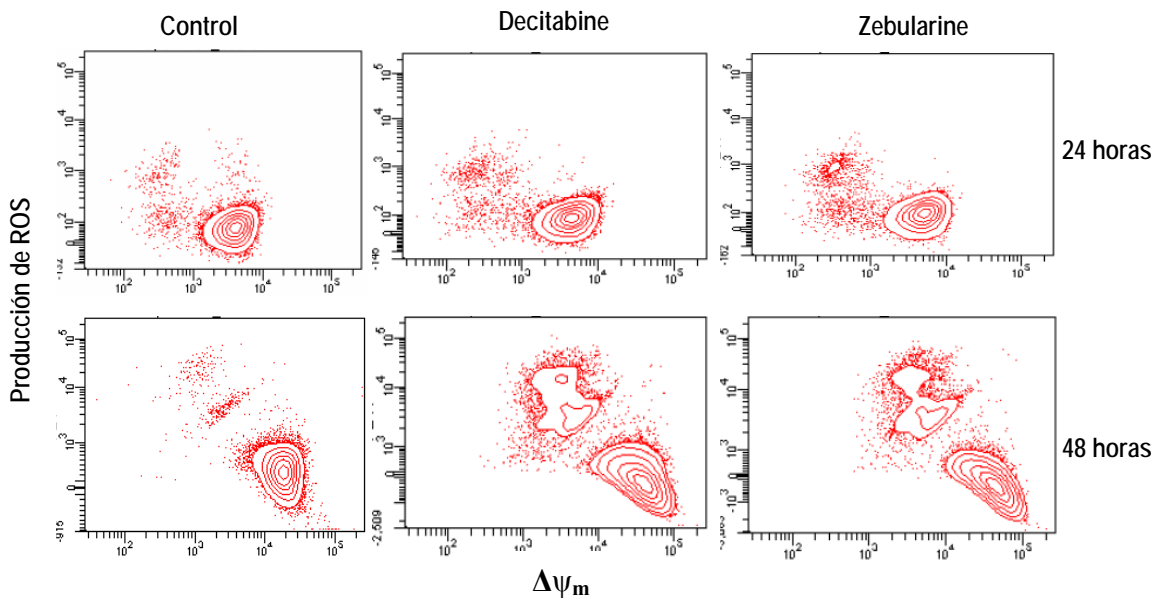
## ***2. Caracterización de la ruta de inducción de apoptosis por los inhibidores de DNMTs decitabine y zebularine en células T leucémicas.***

### ***2.1. Decitabine y zebularine activan la vía mitocondrial de inducción de apoptosis.***

Para determinar la ruta por la cual los inhibidores de ADN metiltransferasas inducen apoptosis en líneas celulares T leucémicas, estudiamos diferentes eventos mitocondriales específicos de la ruta intrínseca de apoptosis. En primer lugar analizamos la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

A las 24 horas de tratamiento ya se observa una clara caída del  $\Delta\psi_m$  y un incremento en la producción de ROS, especialmente con zebularine, siendo ambos eventos mucho más evidentes tras 48 horas de tratamiento con ambos agentes desmetilantes (Fig. 9). Los resultados, además, sugieren que la caída del potencial de membrana precede a la producción de ROS, ya que a 24 horas de tratamiento encontramos células con la membrana mitocondrial despolarizada pero sin acumulación de ROS, mientras que todas aquellas que presentan alta producción de ROS muestran también una pérdida de  $\Delta\psi_m$ . Estos experimentos

también se han llevado a cabo en células MOLT-4, obteniéndose resultados similares.

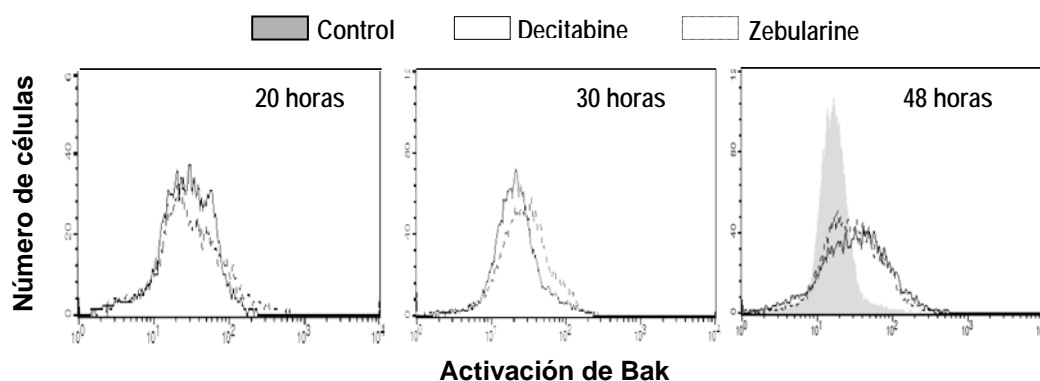


**Figura 9. Decitabine y zebularine inducen pérdida de potencial de membrana mitocondrial y producción de ROS en células T leucémicas. Células Jurkat fueron cultivadas sin (control) o con decitabine ( $5\mu\text{M}$ ) o zebularine ( $50\mu\text{M}$ ) durante los tiempos indicados en la gráfica. La caída del potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) y la producción de ROS se determinaron mediante citometría de flujo utilizando las sondas fluorescentes  $\text{DIOC}_6$  y DHE, respectivamente, como se indica en el apartado de Materiales y Métodos.**

Los miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2, Bax y Bak, son proteínas esenciales para disparar la ruta mitocondrial de apoptosis. Debido a que las células Jurkat no expresan Bax, hemos analizado la activación de Bak mediante citometría de flujo y utilizando un anticuerpo específico que detecta la forma activada de la proteína.

Como se observa en la figura 10, tras 20 horas de tratamiento con decitabine y zebularine se empieza a detectar una leve activación de Bak que aumenta considerablemente con el tiempo de incubación. Además, observamos que la activación de Bak es algo mayor a los tiempos más cortos (20 y 30 horas) en

respuesta al tratamiento con zebularine. Estos resultados, junto con la cinética de activación de caspasas (Fig. 7) y la producción de ROS y caída del  $\Delta\psi_m$  (Fig. 9), sugieren que las señales apoptóticas se originan más rápidamente tras el tratamiento con zebularine que con decitabine.



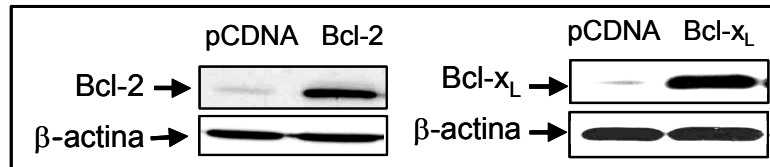
**Figura 10.** *Decitabine y zebularine inducen la activación de Bak en células T leucémicas.* Células Jurkat fueron tratadas durante 20, 30 y 48 horas con decitabine ( $5\mu\text{M}$ ) y zebularine ( $50\mu\text{M}$ ). La activación de Bak se determinó mediante citometría de flujo, siguiendo el protocolo descrito en el apartado de Materiales y Métodos.

## **2.2. La sobre-expresión de Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> inhibe la activación de la ruta mitocondrial y la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine.**

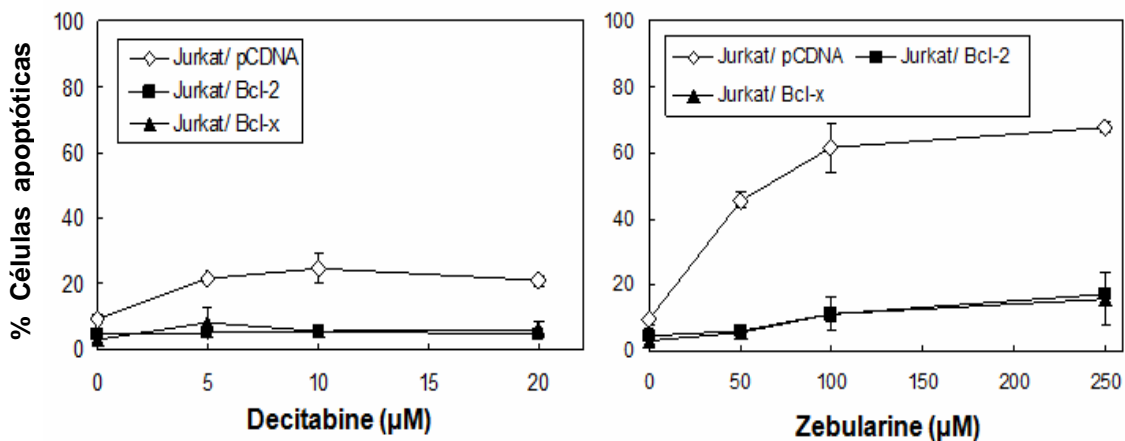
La participación de la mitocondria en la inducción de apoptosis por los inhibidores de ADN metiltransferasas se ha confirmado mediante el estudio de los efectos de decitabine y zebularine en células Jurkat transfectadas con vectores de expresión de Bcl-2 o de Bcl-x<sub>L</sub>, para sobre-expresar dichas proteínas anti-apoptóticas (Fig. 11).

Experimentos de dosis-respuesta para determinar la sensibilidad de las células Jurkat que sobre-expresan Bcl-2 ó Bcl-x<sub>L</sub> a decitabine y zebularine demuestran que estas proteínas protegen de la inducción de apoptosis, incluso tras el tratamiento con las dosis más elevadas de dichas drogas (Fig. 12). La baja

sensibilidad al decitabine que se observa en las células Jurkat/pCDNA, en comparación con las células Jurkat utilizadas anteriormente (Fig. 1), puede deberse a la existencia de diferentes subclones de células Jurkat, de los que podrían derivan los diferentes tipos utilizados en este trabajo.

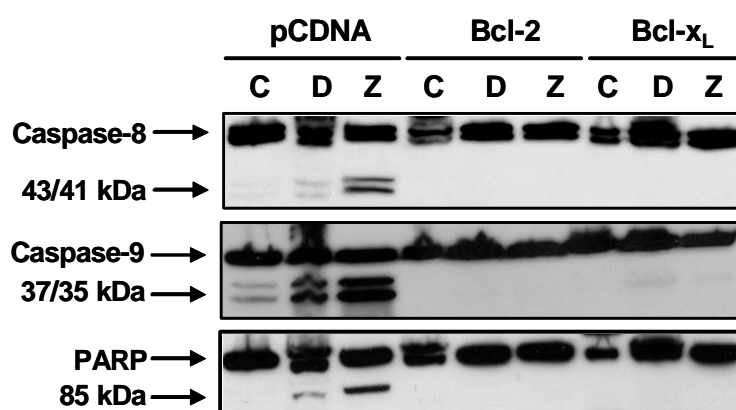


**Figura 11. Determinación de Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> en células Jurkat que sobreexpresan dichas proteínas.** Los niveles de expresión de Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> se determinaron en células Jurkat transfectadas con vectores de expresión de estas proteínas mediante Western-blot. Las células control (pCDNA), transfectadas con el vector vacío, nos muestran los niveles normales de expresión de estas proteínas en células Jurkat. La cantidad de proteína se comparó determinando los niveles de β-actina.



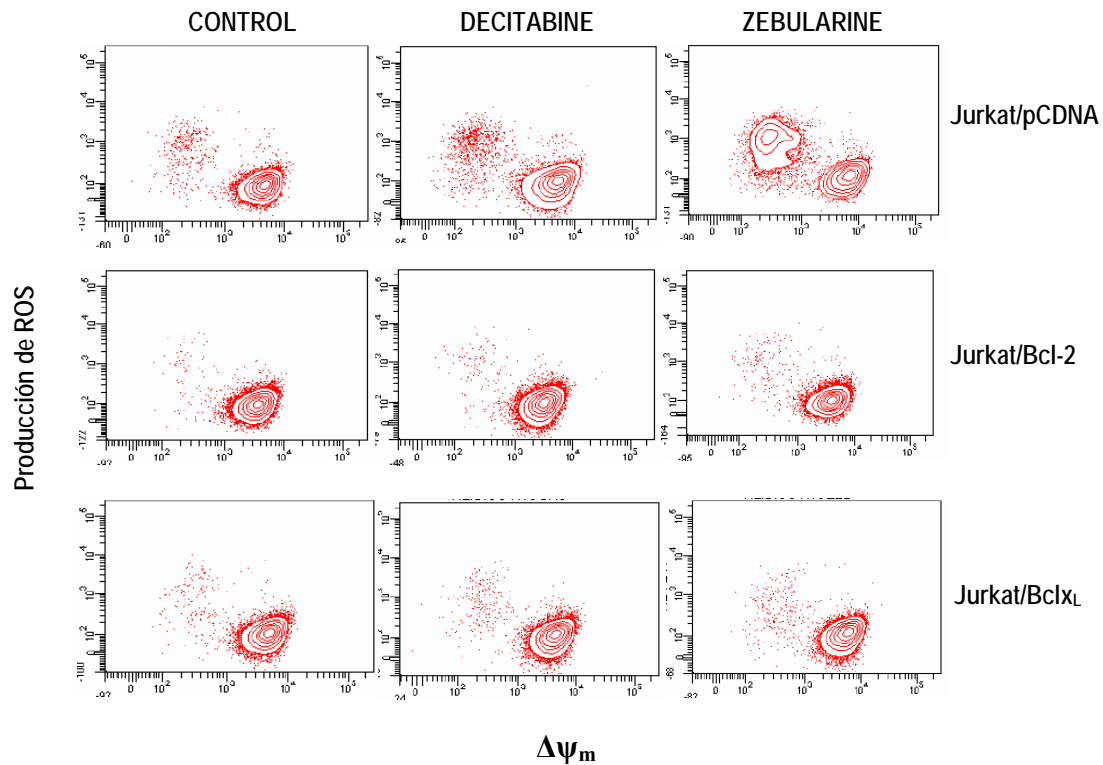
**Figura 12. Las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> protegen a las células Jurkat de la apoptosis inducida por decitabine y zebularine.** Células Jurkat control/pCDNA y las que sobre-expresan Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>, fueron tratadas durante 48 horas con distintas concentraciones de decitabine y zebularine. El porcentaje de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error corresponden al SEM de tres experimentos independientes.

Además de comprobar que en estos clones de células Jurkat que sobreexpresan Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> no se detectan células en la fase sub-G1 del ciclo celular tras el tratamiento con los inhibidores de ADN metiltransferasas, también hemos demostrado que no se produce la activación de las caspasas iniciadoras -8 y -9, ni la degradación de la proteína reparadora PARP, eventos que sí ocurren en las células control/pCDNA (Fig. 13).



**Figura 13.** La sobre-expresión de Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub> inhibe la activación de caspasas en respuesta al tratamiento con decitabine y zebularine. Células Jurkat control/pCDNA (transfectadas con el vector vacío) y células Jurkat que sobre-expresan Bcl-2 ó Bcl-x<sub>L</sub>, fueron tratadas durante 48 horas sin (C) o con decitabine (5μM, D) o zebularine (50μM, Z), La activación de las caspasas-8 y -9 y la degradación de PARP se determinó mediante Western-blot.

Por último, para completar el estudio con estas células, hemos analizado la pérdida de  $\Delta\psi_m$  y la acumulación de ROS. Como se observa en la figura 14, en células que sobre-expresan Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub>, el tratamiento con decitabine o zebularine no produce estos eventos mitocondriales característicos de la ruta intrínseca de inducción de apoptosis y que sí ocurren en las células control/pCDNA, que expresan niveles muy bajos de Bcl-2 y prácticamente nulos de Bcl-x<sub>L</sub> (Fig. 11).



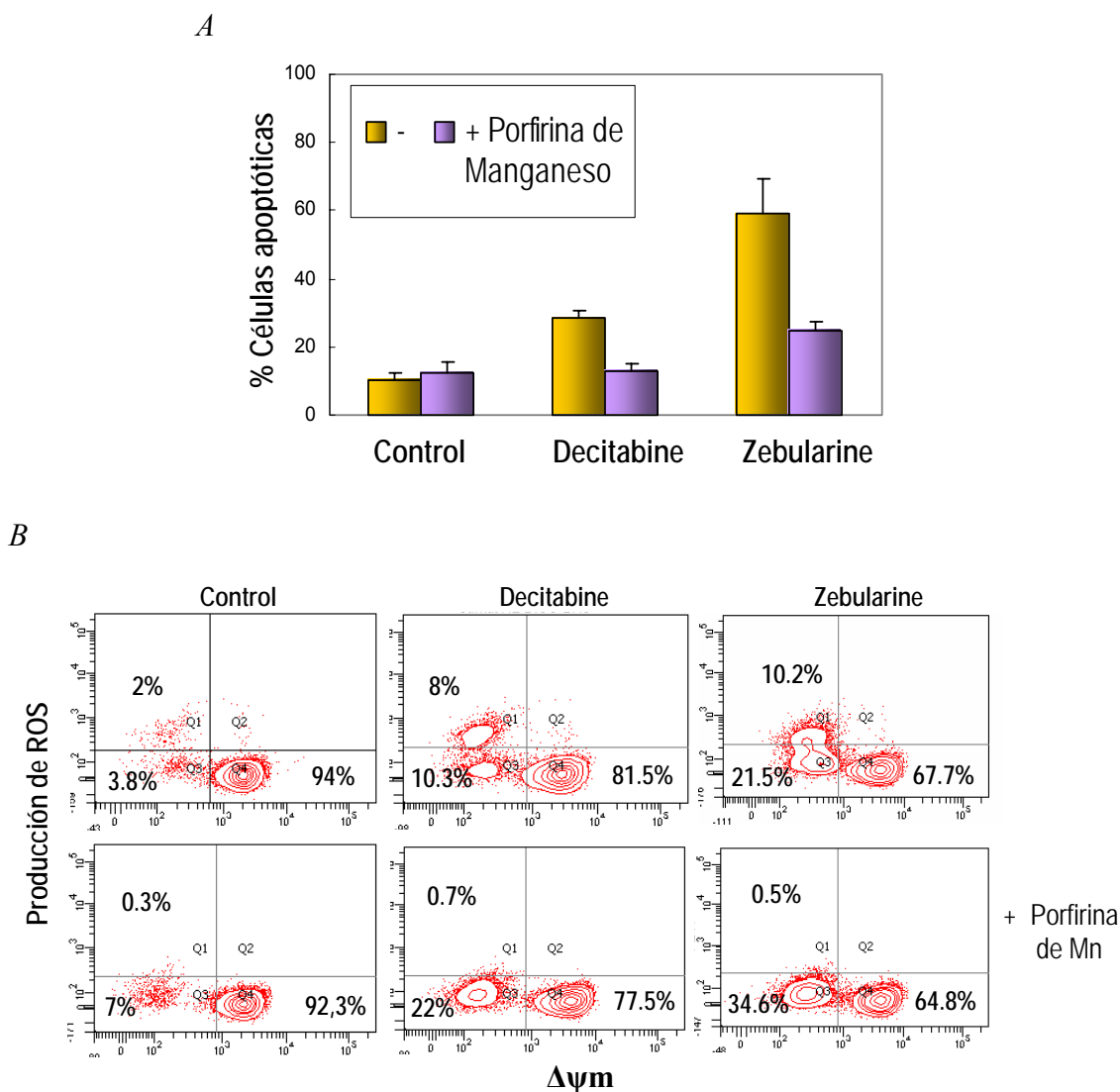
**Figura 14.** La sobre-expresión de *Bcl-2* o *Bclx<sub>L</sub>* protege de la pérdida de  $\Delta\psi_m$  y de la producción de ROS tras el tratamiento con decitabine y zebularine. Células Jurkat transfectadas con el vector vacío (pCDNA) o con los vectores de expresión de *Bcl-2* ó *Bcl-x<sub>L</sub>*, fueron tratadas durante 48 horas con decitabine (5 $\mu$ M) o zebularine (50 $\mu$ M). La caída de  $\Delta\psi_m$  y la producción de ROS se determinaron mediante citometría de flujo.

### **2.3. La acumulación de ROS es necesaria para la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en células T leucémicas.**

Para determinar si la producción de ROS juega un papel crítico en la inducción de muerte celular por los inhibidores de DNMTs análogos de nucleósidos, hemos utilizado el compuesto porfirina de manganeso Mn(III)TMPyP, mimético de la superóxido dismutasa (SOD) con capacidad para difundir al interior de la célula. El mecanismo por el cual la porfirina de manganeso actúa como antioxidante es induciendo una rápida dismutación del anión superóxido, especie reactiva derivada del oxígeno con mayor poder oxidante.



Como se muestra en la figura 15A, la apoptosis inducida por decitabine y zebularine se bloquea casi completamente en células Jurkat que han sido pre-tratadas con porfirina de manganeso, sugiriendo este resultado que la inducción de apoptosis por estos agentes desmetilantes depende de la producción de ROS.



**Figura 15. La eliminación de ROS protege a las células de la apoptosis inducida por decitabine y zebularine.** Células Jurkat fueron preincubadas durante 24 horas en presencia o en ausencia del antioxidante porfirina de manganeso, a una concentración de  $250\mu\text{M}$ , y a continuación fueron tratadas sin (control) o con decitabine ( $5\mu\text{M}$ ) o zebularine ( $50\mu\text{M}$ ) durante 48 horas. (A) El porcentaje de células apoptóticas y (B) la caída de  $\Delta\psi\text{m}$  y la producción de ROS, fueron determinadas mediante citometría de flujo. Las barras de error corresponden al SEM de tres experimentos independientes.

---

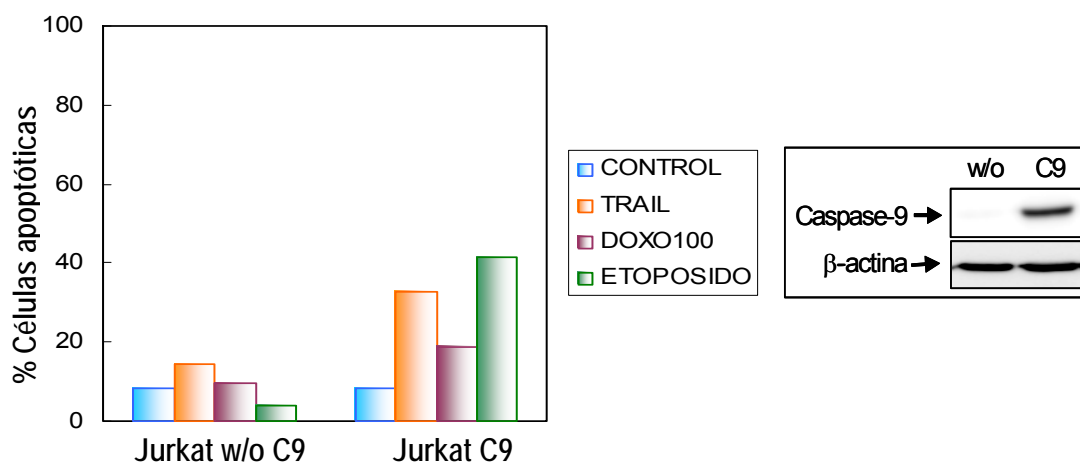
Analizamos también la producción de ROS para comprobar que, efectivamente, en las células que han sido pre-incubadas con este antioxidante antes de ser tratadas con los inhibidores de las DNMTs, no se produce este evento mitocondrial; sin embargo, sí observamos un porcentaje de células que sufren pérdida del potencial de membrana mitocondrial similar al de la población de células no pre-tratadas con este mimético de la SOD (Fig. 15B). Este resultado confirma nuestra hipótesis de que la acumulación de ROS es un fenómeno que se produce tras la caída del  $\Delta\psi_m$ .

#### ***2.4. La caspasa-9 es esencial para la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en células T leucémicas.***

Resultados anteriormente mostrados indican que decitabine y zebularine inducen la activación de las caspasas iniciadoras -8 y -9. Sabemos que la caspasa-9 juega un papel fundamental en la ruta mitocondrial de inducción de apoptosis, mientras que la caspasa-8 puede ser cortada y activada en esta ruta como consecuencia de la activación de caspasas efectoras, al ser un sustrato de ellas.

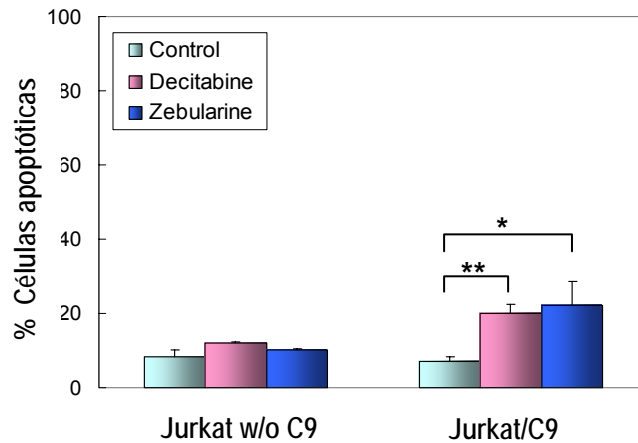
Para completar el estudio de la importancia de la ruta mitocondrial en la inducción de apoptosis por los inhibidores de DNMTs, y conocer al mismo tiempo la implicación de la caspasa-9 en este proceso, hemos estudiado el efecto de dichos inhibidores en un clon de células Jurkat deficientes en caspasa-9 (Jurkat w/o C9). Como control en estos experimentos utilizamos estas mismas células reconstituidas mediante transfección con un vector de expresión de caspasa-9 (Jurkat C9). Estas células deficientes en caspasa-9 deben ser resistentes a drogas genotóxicas que inducen apoptosis activando la ruta intrínseca. Confirmamos por tanto su fenotipo analizando la inducción de apoptosis en respuesta al tratamiento con doxorrubicina y etopósido. Como se observa en la figura 16, las células deficientes en caspasa-9, a diferencia de las células reconstituidas Jurkat C9, son resistentes a estas drogas genotóxicas.

También analizamos la respuesta al ligando de muerte TRAIL, el cual activa la ruta extrínseca de apoptosis. En este caso, se observa una leve inducción de apoptosis en las células Jurkat w/o C9, pero su sensibilidad es menor que la de células Jurkat con caspasa-9, posiblemente debido a que esta línea celular puede considerarse como de tipo II en lo que se refiere al requerimiento de la mitocondria para la inducción de apoptosis por ligandos de muerte.



**Figura 16. Inducción de apoptosis por distintas drogas en células Jurkat deficientes en caspasa-9.** Células Jurkat deficientes en caspasa-9 (Jurkat w/o C9) y las mismas células transfectadas con caspasa-9 (Jurkat C9), fueron tratadas durante 24 horas con TRAIL (100ng/ml), doxorubicina (500ng/ml) o etopósido (100 $\mu$ M). Las células apoptóticas se determinaron mediante citometría de flujo. En el panel de la derecha se muestran los niveles de caspasa-9, analizados mediante Western-blot, en ambos tipos de células. Como control de carga se muestra la expresión de  $\beta$ -actina.

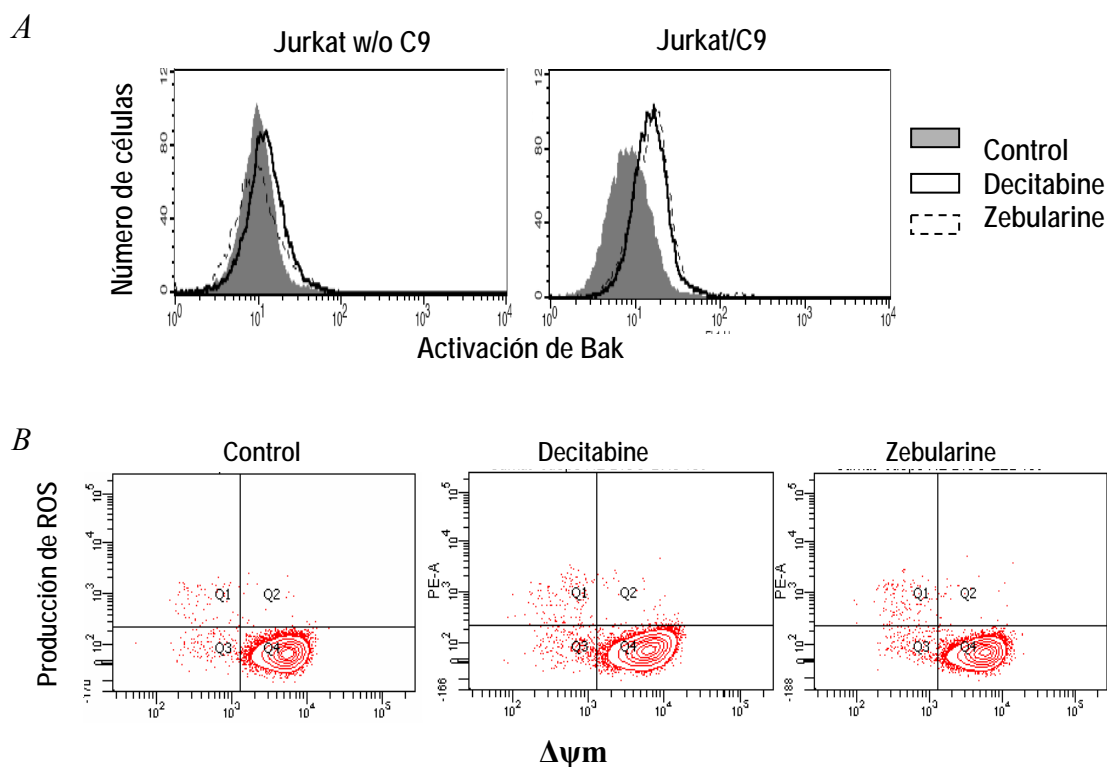
De forma similar a lo observado con las drogas genotóxicas, los agentes desmetilantes decitabine y zebularine no inducen apoptosis en células Jurkat deficientes en caspasa-9, demostrando la importancia de esta caspasa en su mecanismo de acción (Fig. 17). Como control, analizamos paralelamente la inducción de apoptosis en las células Jurkat deficientes transfectadas de forma estable con el vector de expresión de caspasa-9.



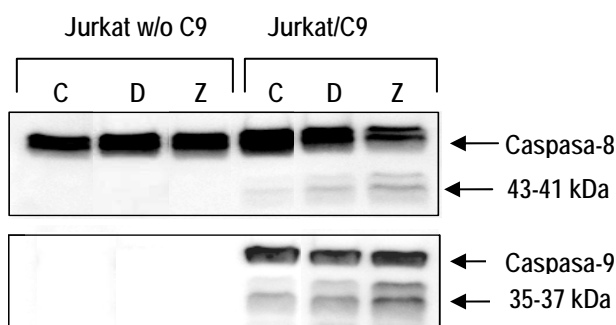
**Figura 17. Células Jurkat deficientes en caspasa-9 son resistentes a la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine.** El porcentaje de células apoptóticas en la fase sub-G1 del ciclo celular se determinó mediante citometría de flujo en células deficientes en caspasa-9 (Jurkat w/o C9) y en células reconstituidas con caspasa-9 (Jurkat/C9), tras ser tratadas durante 48 horas con decitabine (5 $\mu$ M) o zebularine (50 $\mu$ M). Las barras de error corresponden al SEM de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

Para continuar con el estudio en este tipo de células, hemos analizado los eventos mitocondriales relacionados con la inducción de apoptosis. Tras el tratamiento con decitabine y zebularine se produce una débil activación de Bak en las células deficientes de caspasa-9, en comparación con las células Jurkat a las que se les ha reconstituido la caspasa-9 (Fig. 18 A). En cambio no se observa caída del potencial de membrana mitocondrial ni acumulación de ROS (Fig. 18 B). Estos resultados indican que la presencia de caspasa-9 es esencial para que se activen completamente los eventos mitocondriales que conducen a la muerte celular por apoptosis.

Por último, hemos comprobado que en estas células que no tienen caspasa-9 no se produce la activación de caspasa-8 en respuesta al tratamiento con decitabine o zebularine (Fig. 19), confirmando que dicha caspasa se activa con posterioridad a la caspasa-9 y que no actúa como caspasa iniciadora en la ruta de inducción de apoptosis por estos agentes desmetilantes.



**Figura 18. Activación de eventos mitocondriales por decitabine y zebularine en células Jurkat deficientes en caspasa-9.** *A)* Células Jurkat deficientes en caspasa-9 (Jurkat w/o C9) y reconstituídas con caspasa-9 (Jurkat / C9) fueron tratadas durante 48 horas con 5 $\mu$ M de decitabine o 50 $\mu$ M de zebularine y se determinó la activación de Bak mediante citometría de flujo. *B)* Determinación del  $\Delta\psi_m$  y la producción de ROS mediante citometría de flujo en células deficientes en caspasa-9 tratadas como en A.

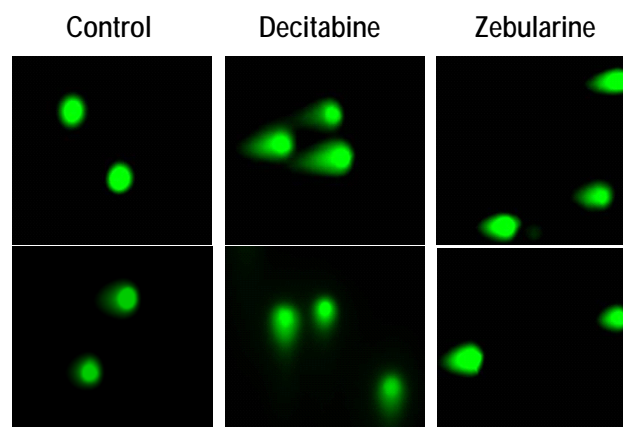


**Figura 19. Decitabine y zebularine no inducen la activación de caspasa-8 en células Jurkat deficientes en caspasa-9.** La activación de las caspasas iniciadoras -8 y -9 se analizó mediante Western-blot en células Jurkat que no tienen caspasa-9 (Jurkat w/o C9) y reconstituídas con esta caspasa (Jurkat / C9) tras 48 horas de tratamiento con 5 $\mu$ M decitabine o 50 $\mu$ M zebularine.

### 3. Decitabine y zebularine inducen daño al ADN en células T leucémicas.

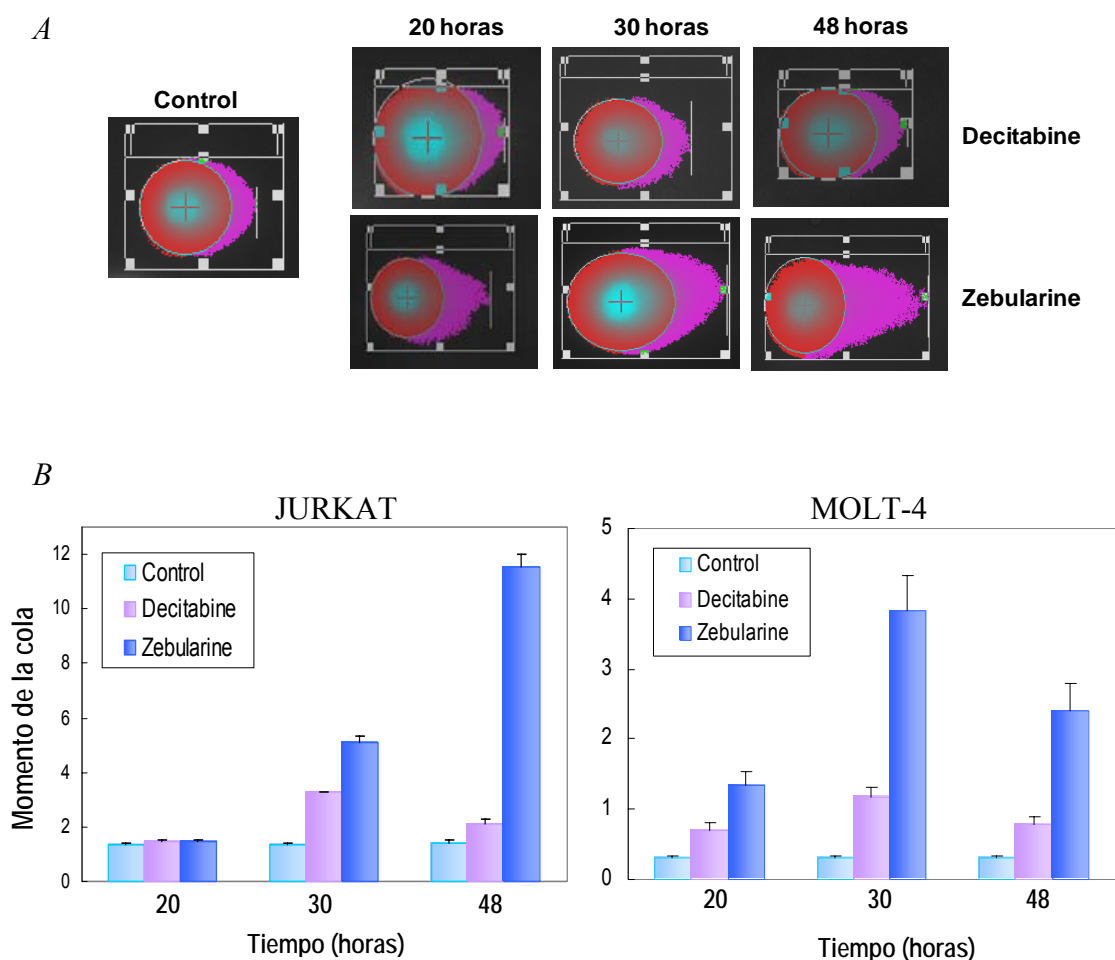
Una de las consecuencias de la incorporación al ADN de los análogos de nucleósidos es que pueden ocasionar roturas de doble cadena como consecuencia de la formación de aductos droga-DNMT-DNA. Este efecto se ha descrito en diferentes modelos de tumores sólidos (Pali et al, 2008) y se ha propuesto que contribuye a la acción citotóxica de estas drogas desmetilantes.

Para comprobar si el decitabine y el zebularine producen daño en el ADN en células T leucémicas, hemos llevado a cabo un ensayo cometa. Los resultados obtenidos indican que células Jurkat tratadas con estos agentes desmetilantes sufren daño de doble cadena en el ADN, como demuestra la aparición de colas en los cometas correspondientes a las células tratadas (Fig. 20).



**Figura 20. Inducción de daño en el ADN por decitabine y zebularine en células T leucémicas.** El daño en el ADN se determinó mediante ensayo cometa en células Jurkat sin tratar (Control) y tratadas 48 horas con decitabine 5 $\mu$ M o zebularine 50Mm.

Basándonos en las cinéticas de inducción de apoptosis previamente descritas, hemos analizado si el daño en el ADN se produce a tiempos cortos de tratamiento, en los cuales ya se observan ciertos eventos relacionados con el proceso de muerte celular, o por el contrario ocurre tras periodos de incubación más largos.

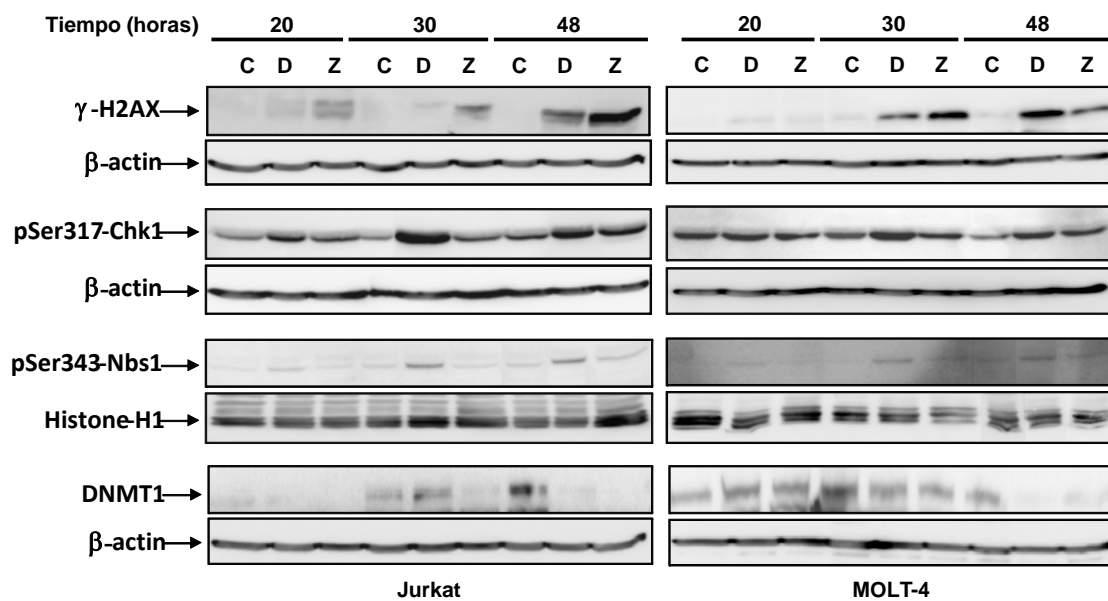


**Figura 21. Inducción de daño en el ADN por decitabine y zebularine en células *T* leucémicas.** El daño en el ADN se analizó mediante ensayo cometa en células Jurkat (A, B) y MOLT-4 (B) sin tratar (Control) y tratadas con decitabine  $5\mu\text{M}$  o zebularine  $50\mu\text{M}$  durante 20, 30 y 48 horas. En A, se muestran las células como las representa el programa de análisis CASP COMET ASSAY. En B, las gráficas representan la cuantificación del momento de la cola del cometa, basada en el estudio de 70 células por muestra (media  $\pm$  SEM).

Como se observa en la figura 21, el número de células con daños en el ADN, cuantificados mediante determinación del momento de la cola del cometa, se empieza a observar en células Jurkat entre las 20 y las 30 horas de tratamiento con los inhibidores de metilación del ADN. En cambio, en células MOLT-4 el daño al ADN aparece a las 20 horas, observándose un máximo de daño a las 30 horas de tratamiento. A pesar de que la acumulación de daño parece ser más rápida en MOLT-4, los niveles de daño acumulado a tiempos más largos son

mayores en Jurkat. Es interesante destacar que en todos los casos el daño acumulado en respuesta al tratamiento con zebularine es superior al acumulado en respuesta a decitabine.

Además de comprobar el daño en el ADN mediante ensayo cometa, hemos analizado la fosforilación de la histona H2AX ( $\gamma$ -H2AX), como un marcador temprano de daño al ADN. La incubación de células Jurkat con los inhibidores de DNMTs induce una acumulación de  $\gamma$ -H2AX que va aumentando con el tiempo de tratamiento (Fig. 22). La acumulación de esta proteína se empieza a detectar, como se muestra en la figura, a las 20 horas de tratamiento. Resultados similares se observan tanto en células Jurkat como en MOLT-4.



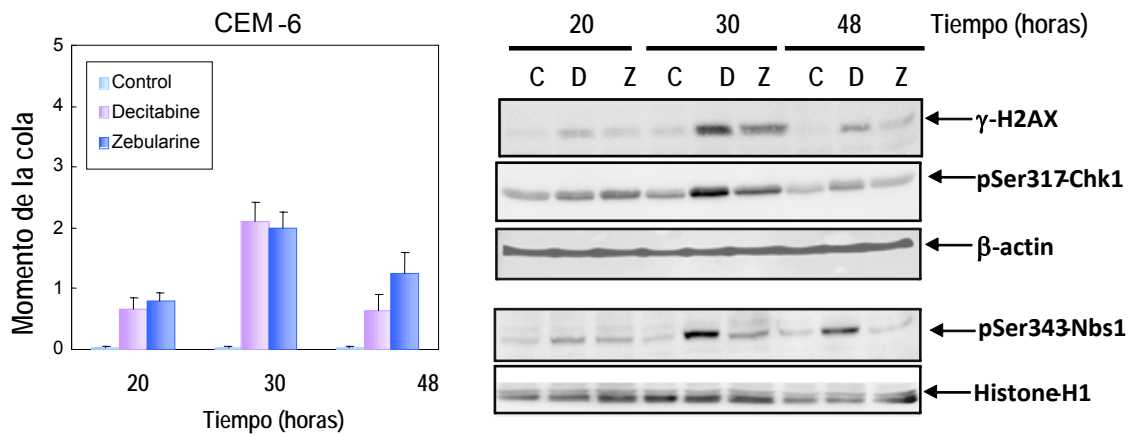
**Figura 22. Regulación por decitabine y zebularine de proteínas relacionadas con daño y metilación del ADN en células T leucémicas.** Células Jurkat y MOLT-4 se trataron durante 20, 30 y 48 horas con 5 $\mu$ M decitabine o 50 $\mu$ M zebularine. La expresión de  $\gamma$ -H2AX, DNMT1, Chk1 y Nbs1 se determinó mediante análisis por Western-blot. Los niveles de proteínas se normalizaron determinando la expresión de  $\beta$ -actina en los lisados de proteínas totales, y la de histona H1 en los extractos de proteínas nucleares.



Igualmente, hemos analizado la activación de proteínas implicadas en la respuesta al daño al ADN, como son Nbs1 y Chk1. Nbs1 actúa como proteína sensora del daño y es fosforilada y activada por ATM, mientras que Chk1 es sustrato de ATR. Observamos las formas fosforiladas activas de ambas proteínas a todos los tiempos analizados, especialmente en respuesta a decitabine y más débilmente tras el tratamiento con zebularine (Fig. 22). De nuevo, los resultados son similares en ambas líneas celulares, Jurkat y MOLT-4.

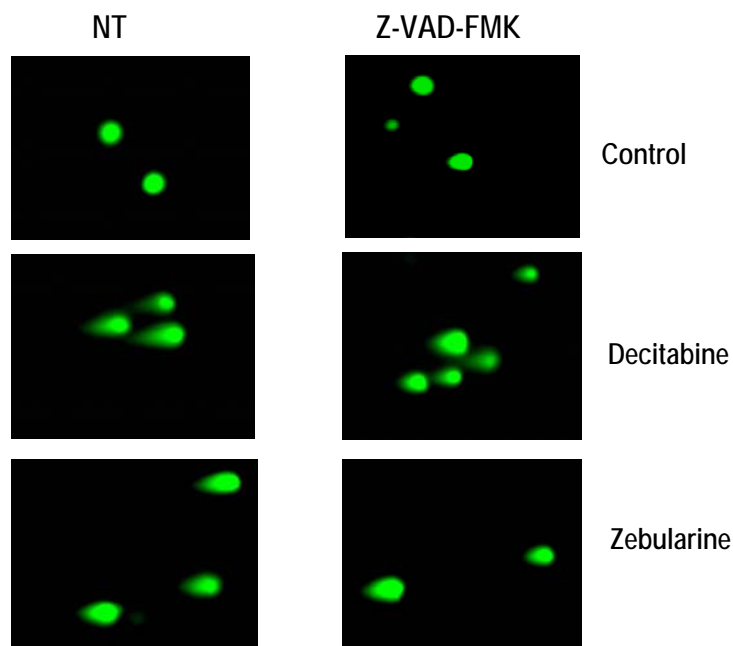
Por otro lado comprobamos que, además de inducir daño al ADN, decitabine y zebularine ejercen su acción como inhibidores de metilación. Para ello analizamos la expresión de DNMT1, ya que sus niveles se reducen como consecuencia de la inhibición por estos agentes desmetilantes. Aunque observamos que la expresión de este enzima va disminuyendo con el tiempo de tratamiento, desapareciendo casi completamente a las 48 horas tanto en células Jurkat como en MOLT-4, la caída en los niveles empieza a ser visible a partir de las 30 horas, es decir, a un tiempo posterior al necesario para detectar el daño al ADN (Fig. 22). La diferencia que se observa en los niveles basales de DNMT1 a los diferentes tiempos, puede deberse a que su expresión depende del momento de replicación en el que se encuentre la célula (*Qin et al, 2009*).

Hemos analizado también la inducción de daño al ADN y la activación de proteínas de respuesta al daño en la línea celular menos sensible, CEM-6. El ensayo cometa muestra que decitabine y zebularine inducen una acumulación similar de daño al ADN, evidente ya a las 20 horas de tratamiento (Fig. 23). Además, ambos inhibidores de DNMTs inducen fosforilación de H2AX, Chk1 y Nbs1 a todos los tiempos analizados, aunque se observan mayores niveles de proteínas fosforiladas en respuesta al tratamiento con decitabine (Fig. 23).



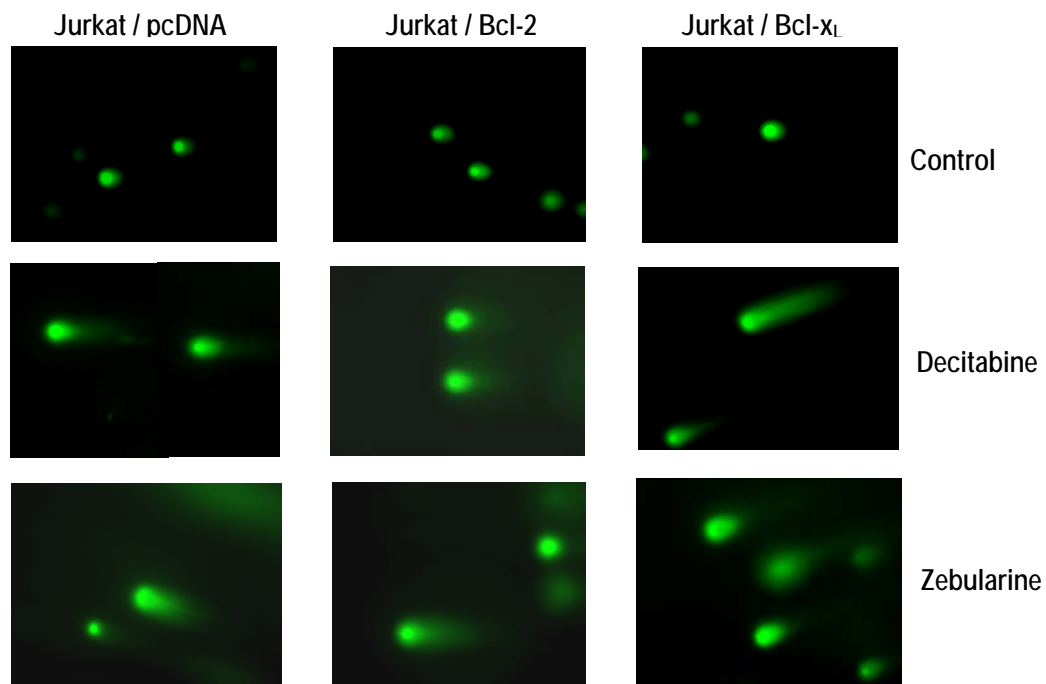
**Figura 23. Regulación por decitabine y zebularine de proteínas relacionadas con daño y metilación del ADN en células T leucémicas CEM-6.** Células CEM-6 se trataron durante 20, 30 y 48 horas con  $5\mu\text{M}$  de decitabine o  $50\mu\text{M}$  de zebularine. La gráfica de la izquierda representa la cuantificación del momento de la cola del cometa, basada en el estudio de 70 células por muestra ( $\text{media} \pm \text{SEM}$ ). La expresión de  $\gamma\text{-H2AX}$ , DNMT1, Chk1 y Nbs1 se determinó mediante análisis por Western-blot. Los niveles de proteínas se normalizaron determinando la expresión de  $\beta\text{-actina}$  en los lisados de proteínas totales, y la de histona H1 en los extractos de proteínas nucleares.

Para comprobar si el daño que se produce en el ADN tras el tratamiento de células T leucémicas con los inhibidores de DNMTs es consecuencia de la entrada de la célula en apoptosis o, por el contrario, es anterior a la inducción de apoptosis por estas drogas, pretratamos las células con el inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK. Como se observa en la figura 24, las colas de los cometas o, lo que es igual, la rotura de doble cadena del ADN inducida por decitabine y zebularine, es similar en células que han sido pretratadas con el inhibidor de caspasas y en células no pretratadas con dicho inhibidor. Este resultado indica que el daño en el ADN observado tras el tratamiento con los inhibidores de metilación no es debido a la fragmentación del ADN que acompaña a la muerte por apoptosis o una mera consecuencia de este proceso de muerte celular sino que precede al inicio de la apoptosis y a la activación de caspasas y por tanto podría ser la causa de dicha activación.



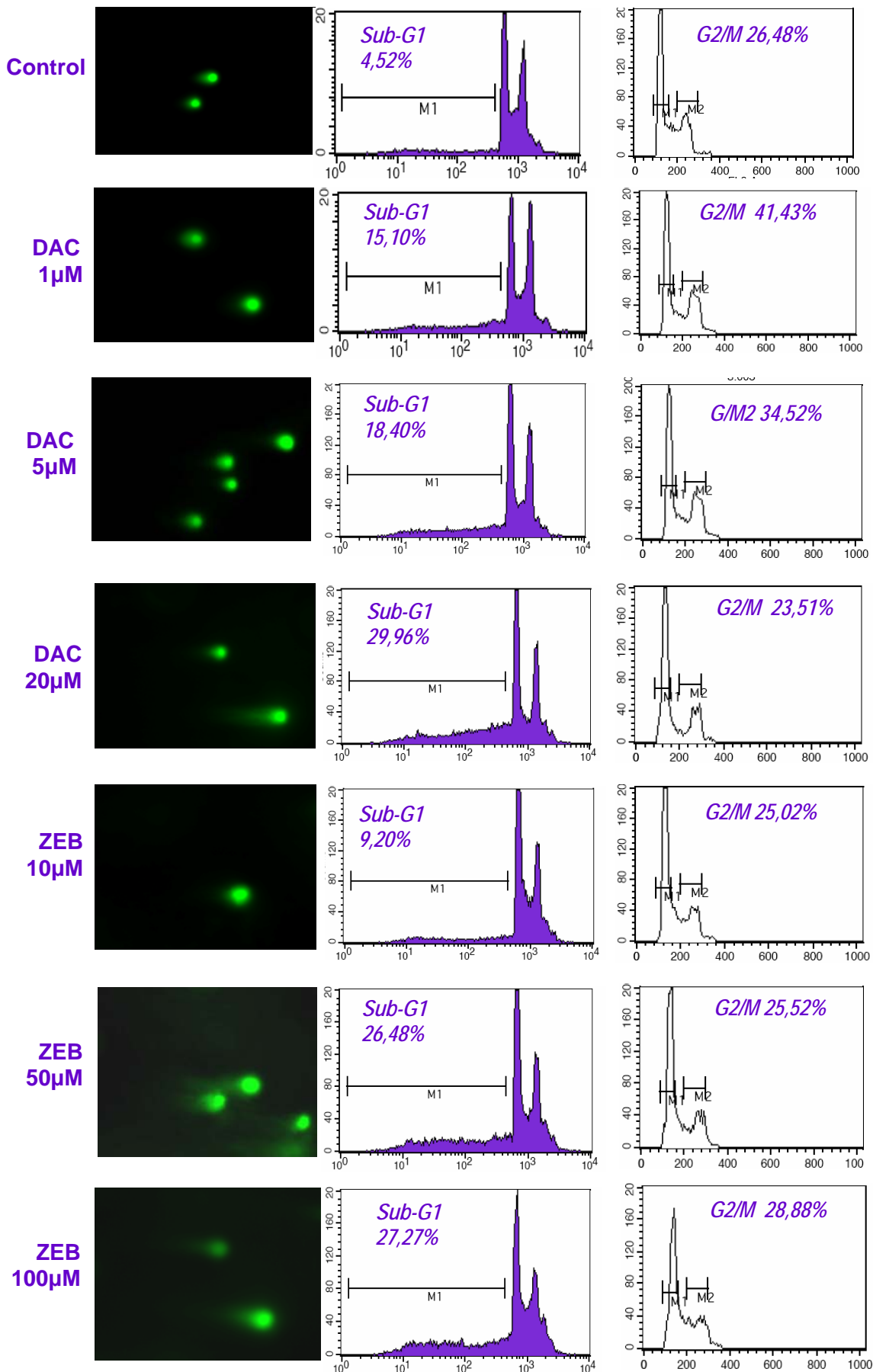
**Figura 24.** El daño al ADN producido por decitabine y zebularine no se inhibe con inhibidores de caspasas. Células Jurkat fueron pretratadas o no (NT) durante 1 hora con el inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK a la concentración de  $20\mu\text{M}$ , y posteriormente incubadas con decitabine  $5\mu\text{M}$  o zebularine  $50\mu\text{M}$ , durante 48 horas. El daño al ADN se determinó mediante ensayo cometa.

Como ya hemos descrito anteriormente, los clones de células Jurkat que sobre-expresan Bcl-2 o Bcl-x<sub>L</sub> están protegidos frente a la apoptosis inducida por los inhibidores de DNMTs, de modo que en ellas no se produce ni la caída del potencial de membrana mitocondrial, ni la acumulación de especies reactivas de oxígeno ni la activación de caspasas. Por ello, utilizamos estas células para corroborar los resultados y conclusiones obtenidas con el inhibidor de caspasas Z-VAD-FMK. Tras llevar a cabo el ensayo cometa, comprobamos que, al igual que en las células Jurkat control transfectadas con el vector vacío, en los clones que sobre-expresan las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bclx<sub>L</sub> también se produce daño al ADN (Fig. 25).



**Figura 25.** *Decitabine y zebularine inducen daño al ADN en células Jurkat que sobre-expresan Bcl-2 y Bcl-x<sub>L</sub>. Los clones de células Jurkat/pcDNA, Jurkat/Bcl-2 y Jurkat/Bcl-x<sub>L</sub>, fueron tratadas o no (Control) con 5μM decitabine o 50μM zebularine durante 48 horas. El daño en el ADN se determinó mediante ensayo cometa.*

Por último, en relación con la inducción de daño al ADN, hemos analizado si se correlacionan las dosis a las que se observa dicho daño con las dosis que inducen apoptosis y con la parada en fase G2/M del ciclo celular, ya que está descrito que diferentes dosis de estos agentes pueden tener efectos distintos. Como se observa en la figura 26, tanto en el caso de decitabine como en el de zebularine, existe una clara correlación entre el daño al ADN (aparición de la cola del cometa) y la inducción de apoptosis, a todas las dosis estudiadas. Por el contrario, no se observa correlación con la parada del ciclo celular en la fase G2/M. Incluso hay que destacar que las dosis más bajas de decitabine, que inducen menos daño al ADN y un menor porcentaje de células en apoptosis, son las que inducen una mayor parada del ciclo mientras que las dosis más elevadas no afectan a la progresión del mismo.



---

**Figura 26. Inducción de daño al ADN, apoptosis y parada en G2/M en células Jurkat en respuesta a distintas dosis de decitabine y zebularine.** Células Jurkat fueron tratadas o no (control) durante 48 horas con las dosis indicadas de decitabine (DAC) o zebularine (ZEB). El daño al ADN se analizó mediante ensayo cometa. El pico sub-G1 y la parada en la fase G2/M del ciclo celular se determinaron mediante análisis por citometría de flujo, y utilizando escalas de amplificación logarítmica y lineal, respectivamente. Todos los ensayos se llevaron a cabo en paralelo, para descartar la variabilidad entre experimentos.

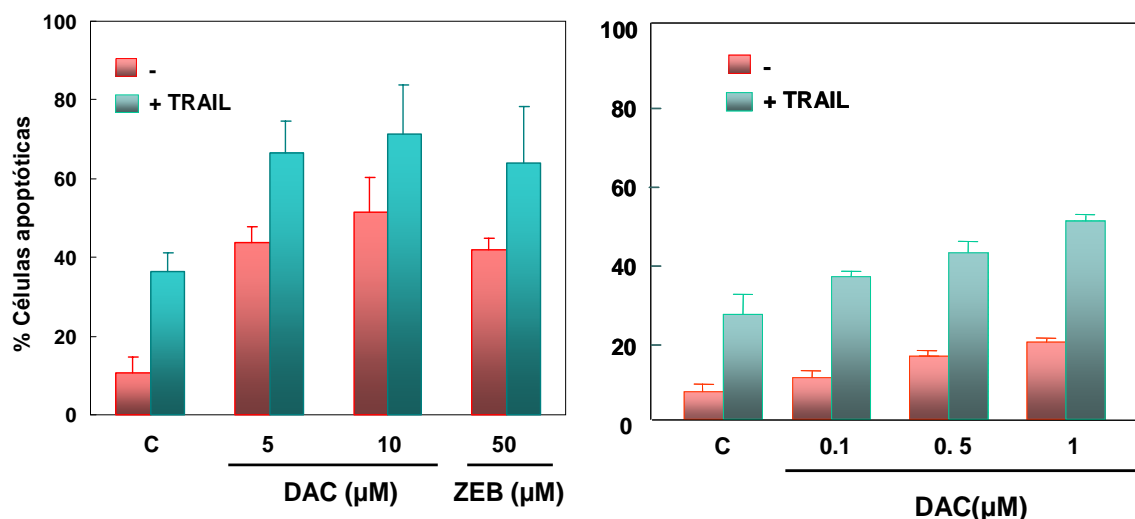
#### **4. Regulación por decitabine y zebularine de la respuesta a TRAIL en células T leucémicas.**

##### **4.1. Los inhibidores de DNMTs no facilitan la apoptosis mediada por TRAIL en células T leucémicas.**

Se ha descrito que la resistencia que presentan ciertos tipos de tumores, como los neuroblastomas y glioblastomas, a la apoptosis inducida por el ligando de muerte TRAIL se debe a una pérdida de expresión de la caspasa-8 como consecuencia de la hipermetilación de su promotor (*Martinez et al, 2007; Xu et al, 2007*). Cuando estos tumores son tratados con una terapia combinada de decitabine y TRAIL, se observa que las células se sensibilizan a TRAIL, consecuencia del aumento de expresión de caspasa-8 mediado por decitabine (*Yang & Thiele, 2003*). Otros autores han descrito la regulación por hipermetilación de la expresión de los receptores de TRAIL (*Horak et al, 2005a*).

Aunque no observamos cambios en la expresión de caspasa-8 en nuestras líneas de células T leucémicas tras el tratamiento con decitabine o zebularine (Fig. 7), hemos estudiado la posible acción reguladora de los inhibidores de DNMTs sobre la apoptosis mediada por TRAIL en dichas células. Cuando pretratamos células Jurkat con dosis de decitabine o zebularine que inducen apoptosis y añadimos TRAIL recombinante, no encontramos potenciación de la

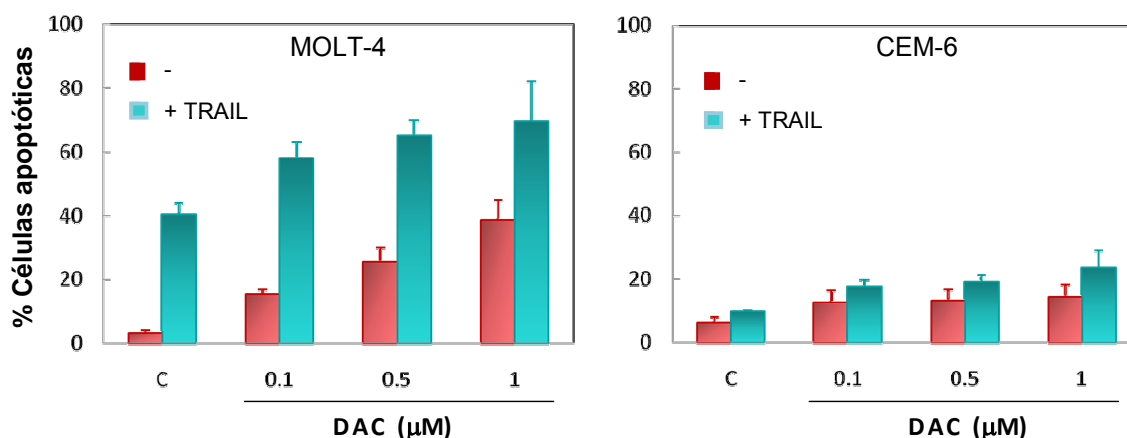
muerte celular mediada por este ligando. Por el contrario, el resultado del tratamiento combinado parece ser una suma de los efectos de ambas drogas (Fig. 27, panel de la izquierda).



**Figura 27. Inducción de apoptosis por los inhibidores de DNMTs y TRAIL en células Jurkat.** Células Jurkat fueron pretratadas durante 24 horas con las dosis indicadas de decitabine o zebularine y a continuación se trataron con TRAIL (50 ng/ml) durante 24 horas más. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error representan la SEM de tres experimentos independientes.

Hemos analizado también el efecto de dosis bajas de decitabine, ya que son las que parecen tener una mayor acción desmetilante (*Stresemann et al, 2006*) (*Qin et al, 2009*) encontrando de nuevo un efecto sumatorio en la inducción de apoptosis en respuesta al tratamiento combinado con TRAIL (Fig. 27, panel de la derecha).

Cuando estudiamos el efecto de la combinación de TRAIL con dosis bajas de decitabine en células MOLT-4, que presentan una sensibilidad a TRAIL similar a la de células Jurkat, o en células CEM-6, más resistentes a TRAIL que las dos anteriores, los resultados son similares a los obtenidos con células Jurkat (Fig. 28).

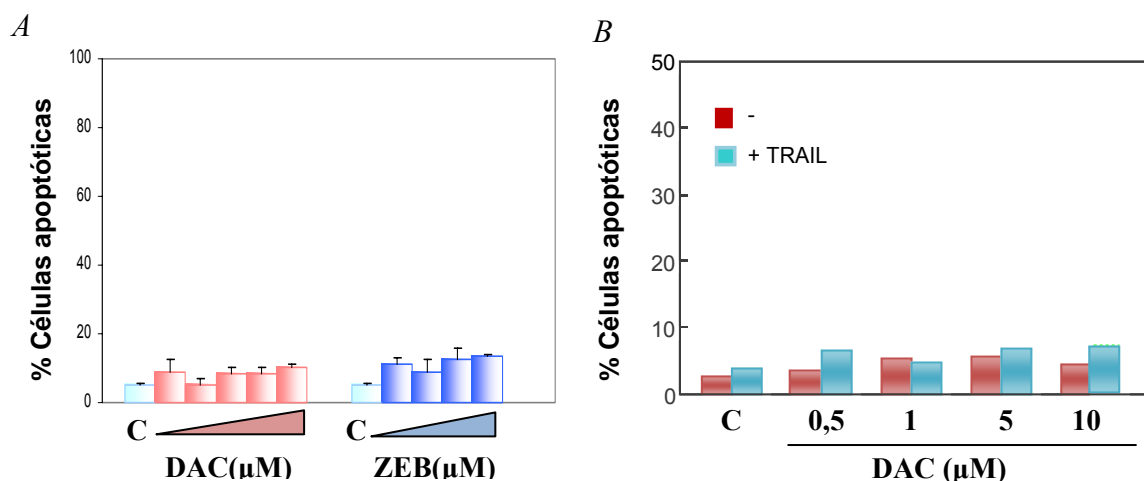


**Figura. 28. Inducción de apoptosis por decitabine y TRAIL en las líneas celulares CEM-6 y MOLT-4.** Células CEM-6 y MOLT-4 fueron pretradas durante 24 horas con las dosis indicadas de decitabine. Tras el pretratamiento, se incubaron 24 horas más con TRAIL (50ng/ml). El porcentaje de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error nos muestran el SEM de tres experimentos independientes.

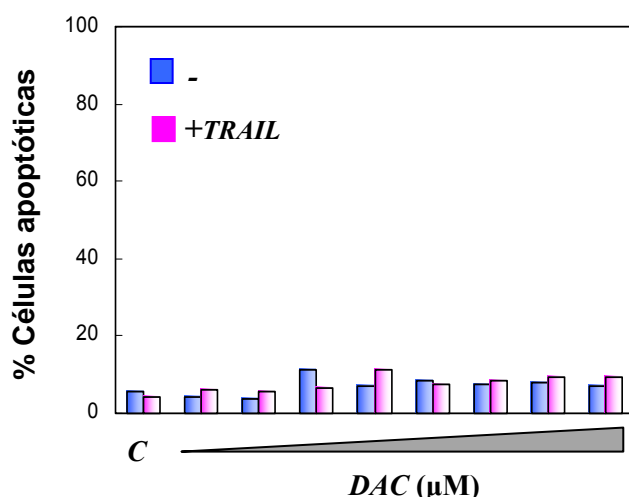
La línea de células T leucémicas HPB-ALL se caracteriza por ser resistente a la apoptosis mediada por TRAIL, además de a otras muchas drogas que habitualmente inducen apoptosis en células T leucémicas (datos no mostrados). Hemos analizado la respuesta de estas células a los inhibidores de DNMTs, utilizando dosis elevadas de hasta 100 μM de decitabine y 500 μM de zebularine. Como se observa en la figura 29 A, la línea celular HPB-ALL es muy resistente a estos agentes desmetilantes. Analizamos también la respuesta a TRAIL tras pretratamiento con dosis bajas de decitabine en células HPB-ALL y de nuevo observamos una elevada resistencia a la acción combinada de ambas drogas (Fig. 29B).

Estos resultados sugieren que, en células T leucémicas, los inhibidores de DNMTs no son capaces de regular factores o señales que participan en la ruta de apoptosis mediada por TRAIL y que puedan favorecer este proceso de muerte celular.





**Figura 29. Respuesta de células HPB-ALL a inhibidores de DNMTs y/o TRAIL.** A) Células HPB-ALL fueron tratadas 48 horas con decitabine (5, 10, 20, 50 y 100 μM) o zebularine (50, 100, 250 y 500 μM). B) Células HPB-ALL fueron tratadas 48 horas con las dosis indicadas de decitabine, y se añadió TRAIL (100ng/ml) en las últimas 24 horas de incubación. Las células en sub-G1 se analizaron mediante citometría de flujo. Las barras de error nos muestran el SEM de tres experimentos independientes.

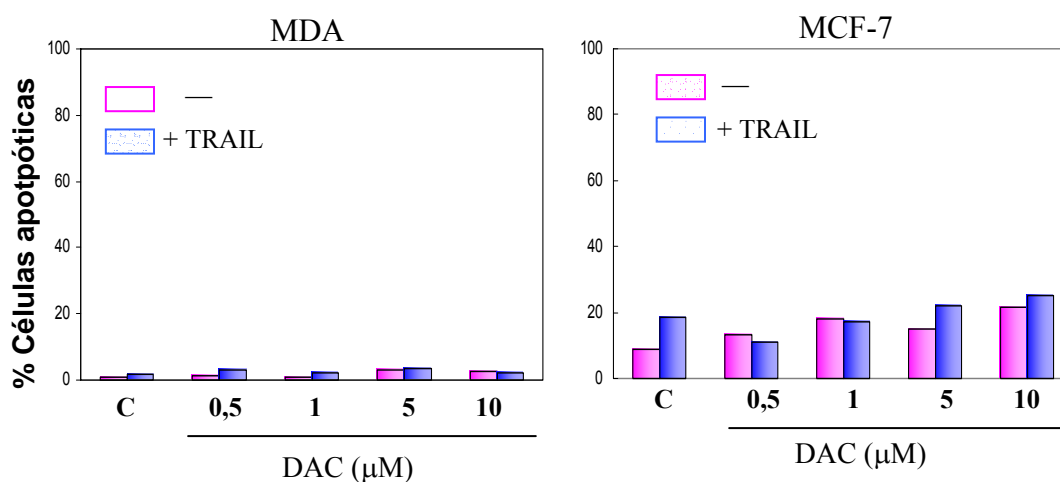


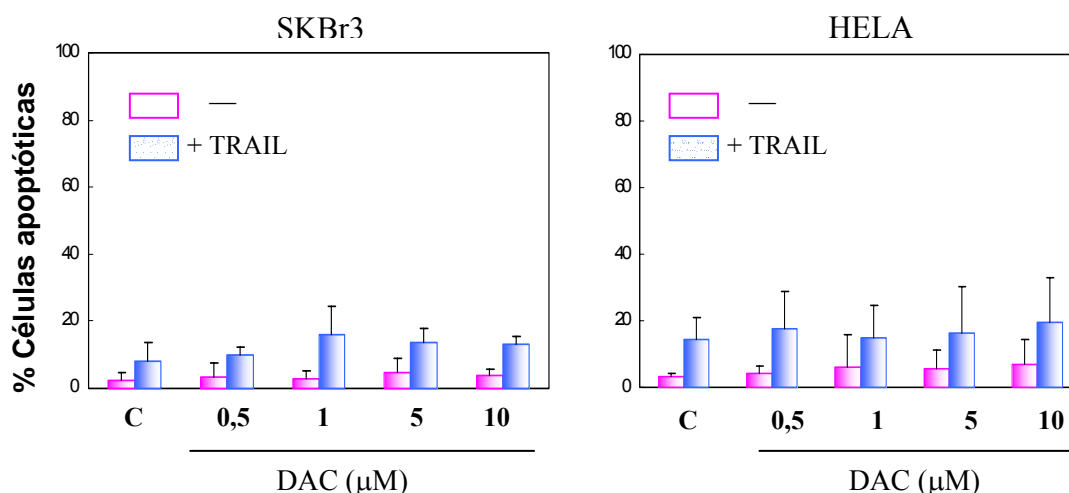
**Figura 30. Resistencia de linfocitos T primarios activados al tratamiento con decitabine y TRAIL.** Linfocitos T primarios, extraídos de sangre periférica de donantes sanos fueron activados, según se describe en el apartado de materiales y métodos. A continuación se pretrataron con diferentes dosis de decitabine (0.01, 0.05, 0.1, 1, 5, 10, 20 y 50 μM) durante 24 horas, se añadió TRAIL (250ng/ml) y se incubaron 24 horas más. El porcentaje de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo.

Al igual que las células HPB-ALL, las células T primarias tanto en reposo como activadas son muy resistentes a la inducción de apoptosis por TRAIL (Morales *et al*, 2007). Hemos comprobado si las células T primarias activadas, que están en división y por tanto pueden incorporar los inhibidores análogos de citidina al ADN, mantienen la resistencia a TRAIL tras ser pretratadas con decitabine. Los resultados de la figura 30 muestran que, efectivamente, los inhibidores de DNMTs tampoco son capaces de modular la respuesta a TRAIL de los linfocitos T primarios activados.

#### ***4.2. El agente desmetilante decitabine no regula la muerte mediada por TRAIL en células de cáncer de mama.***

Aunque el objetivo de este trabajo es conocer el efecto de los inhibidores de metilación del ADN sobre células T leucémicas, hemos comparado dicho efecto con el que presentan sobre otros modelos tumorales. Para ello, hemos utilizado diferentes líneas celulares de tumores sólidos, en concreto las líneas de cáncer de mama MDA-MB231, MCF-7 y SKBr3 y la línea de carcinoma cervical Hela. Cuando incubamos estas células con diferentes dosis de decitabine durante 48 horas observamos que todas ellas son muy resistentes a dicho agente desmetilante, encontrando solo un leve efecto en la línea MCF-7 (Fig. 31).





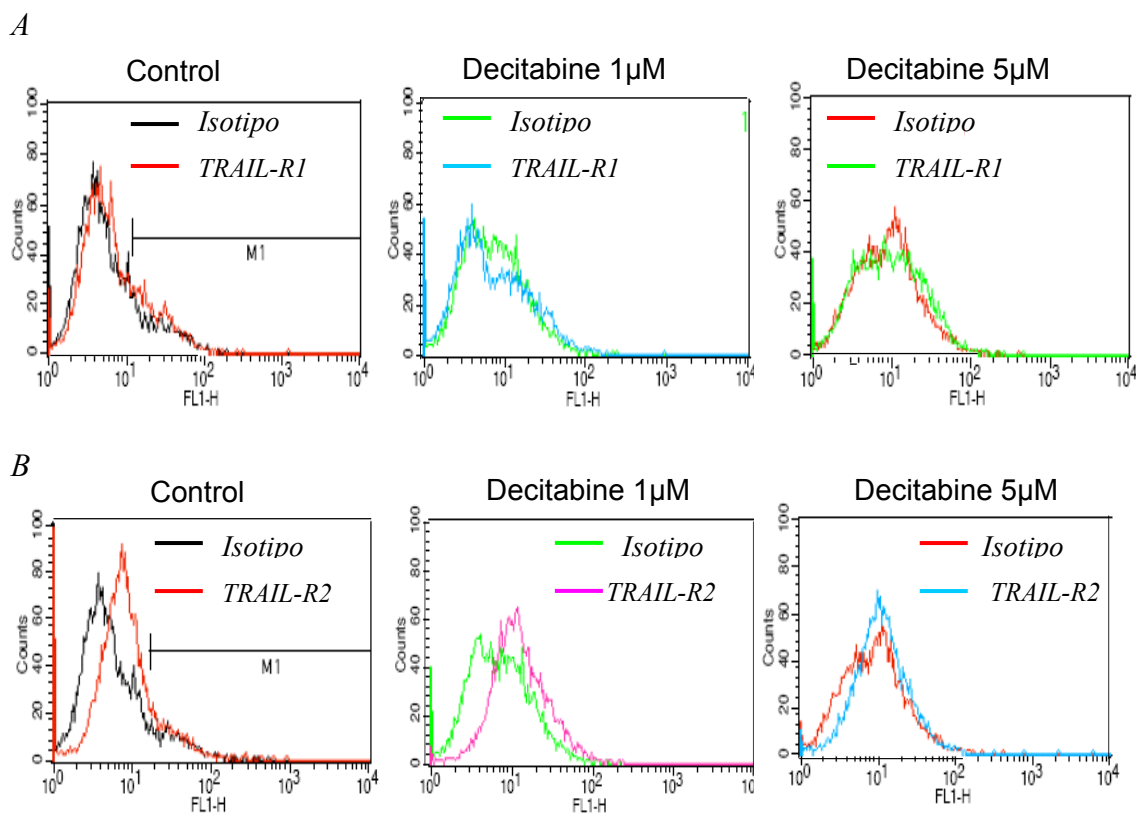
**Figura 31. Efecto del inhibidor de DNMTs decitabine en diferentes líneas de tumores sólidos.** Las líneas tumorales MDA-MB231, MCF-7, SKBr3 y Hela fueron tratadas o no (C) durante 48 horas con las dosis indicadas de decitabine. En algunos casos, las últimas 24 horas se añadió el ligando de muerte TRAIL (100nM). El porcentaje de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error muestran el SEM de tres experimentos independientes

Analizamos también la sensibilidad a TRAIL tras pretratamiento con decitabine en estas líneas de tumores sólidos observando que, al igual que ocurre en nuestro modelo de células T leucémicas, en dichos tumores el inhibidor de metilación tampoco regula la respuesta al ligando de muerte.

#### **4.3. El tratamiento con decitabine no afecta a la expresión de los receptores de TRAIL en células T leucémicas.**

Se ha descrito que la expresión del receptor pro-apoptótico TRAIL-R1 se encuentra silenciada por hipermetilación del promotor en distintas líneas tumorales, como en células de glioma (*Elias et al, 2009*), de melanoma (*Bae et al, 2008*) o de cáncer de ovario (*Horak et al, 2005a*), de modo que puede ser regulada por el agente desmetilante decitabine. Aunque ya hemos demostrado que decitabine no aumenta la sensibilidad de células T leucémicas a TRAIL,

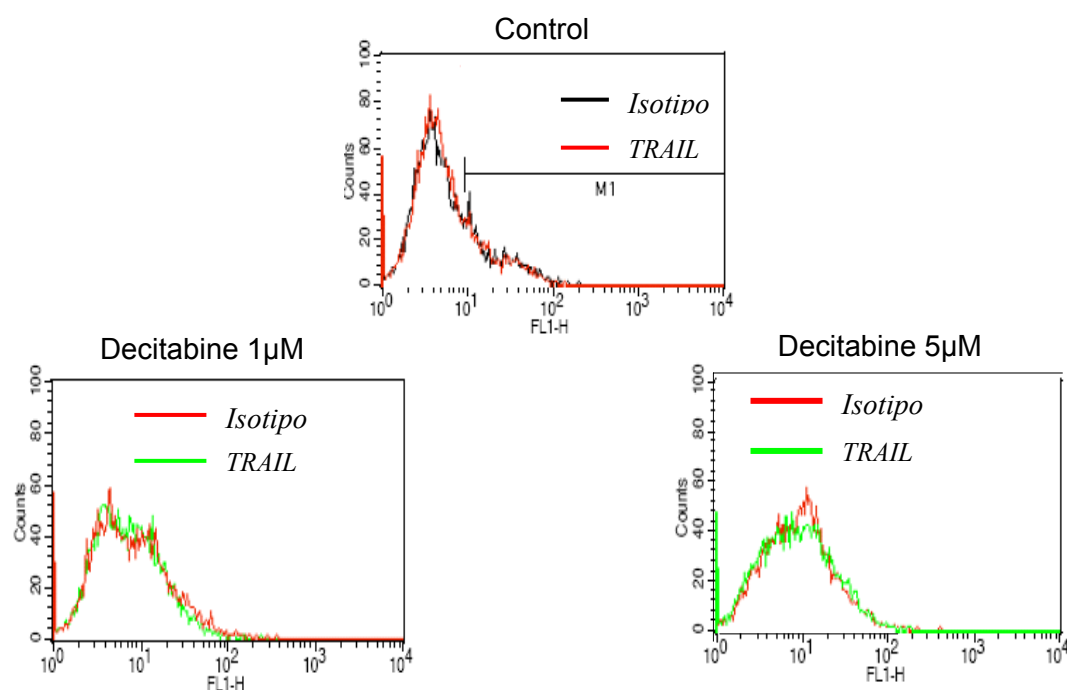
hemos comprobado si este inhibidor de DNMTs es capaz de modular la expresión de los receptores pro-apoptóticos TRAIL-R1 y TRAIL-R2, utilizando como modelo la línea de células Jurkat. Como se muestra en la figura 32 A, TRAIL-R1 no se expresa en esta línea celular, ni en condiciones basales ni tampoco en respuesta al tratamiento con decitabine. En el caso de TRAIL-R2 observamos una baja expresión en las células control que incluso parece reducirse tras el tratamiento con la dosis más elevada de decitabine (Fig. 32 B).



**Figura 32. Expresión de TRAIL-R1 y TRAIL-R2 en células Jurkat tratadas con decitabine.** Células Jurkat fueron tratadas o no tratadas durante 48 horas con las dosis indicadas de decitabine. La expresión de los receptores pro-apoptóticos TRAIL-R1 (A) y TRAIL-R2 (B), se determinó mediante citometría de flujo. La línea de isotipo corresponde a la fluorescencia del anticuerpo secundario.

#### 4.4. El ligando de muerte TRAIL no está implicado en la apoptosis inducida por los inhibidores de DNMTs en células T leucémicas.

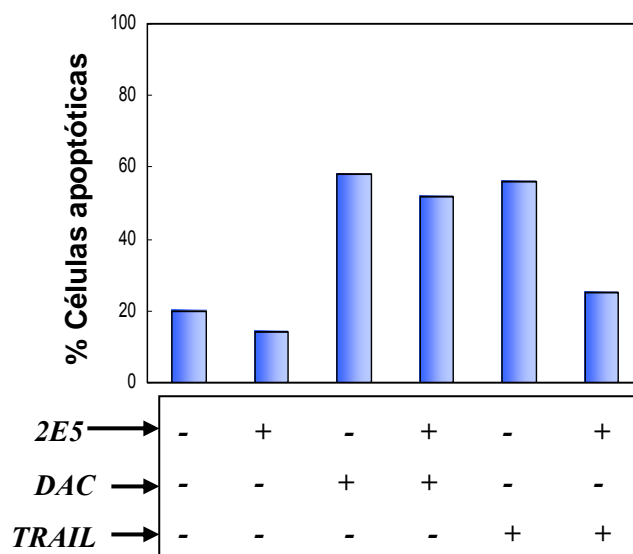
Nuestros resultados anteriores muestran que células de cáncer de mama son en general más resistentes a decitabine que células T leucémicas y que su sensibilidad a TRAIL no se modula tras el tratamiento con este inhibidor de metilación. Otros autores han estudiado también la respuesta de células de cáncer de mama a decitabine y han demostrado que dicho agente desmetilante aumenta la expresión de TRAIL, siendo este ligando el responsable de la muerte celular observada en respuesta al tratamiento con decitabine (*Xu et al, 2007*). Para comprobar si esto ocurre en nuestro modelo celular, hemos tratado células Jurkat con decitabine y hemos analizado la expresión de TRAIL.



**Figura 33.** Expresión del ligando de muerte TRAIL en células Jurkat tratadas con decitabine. Células Jurkat fueron tratadas durante 48h con decitabine (1 y 5  $\mu$ M). La expresión de TRAIL se determinó mediante citometría de flujo. La línea de isotipo corresponde a la fluorescencia del anticuerpo secundario.

Como se observa en la figura 33, no hay expresión basal de TRAIL en células Jurkat, ni tampoco en respuesta al tratamiento con el agente desmetilante.

Con el fin de confirmar que TRAIL no participa en la inducción de apoptosis por decitabine en nuestro modelo de células T leucémicas, hemos utilizado un anticuerpo neutralizante de TRAIL (2E5), que bloquea la interacción de este ligando de muerte con sus receptores. Cuando pretratamos células Jurkat con dicho anticuerpo antes de incubar con decitabine, encontramos que la inducción de apoptosis es similar a la que ocurre en las células no pretratadas con el anticuerpo anti-TRAIL (Fig. 34). Como control de que el anticuerpo está funcionando correctamente, analizamos la inducción de apoptosis en células Jurkat tratadas con TRAIL recombinante en presencia y en ausencia del anticuerpo neutralizante. En este caso sí se observa una clara inhibición de la apoptosis inducida por TRAIL en las células incubadas simultáneamente con el anticuerpo bloqueante.



**Figura 34.** La apoptosis inducida por decitabine en células Jurkat no está mediada por TRAIL. Células Jurkat pretratadas durante 1 hora con el anticuerpo anti-TRAIL 2E5 (1 $\mu$ g/ml) se incubaron durante 48 horas con decitabine (5 $\mu$ M) o durante 24 horas con TRAIL (100ng/ml). El porcentaje de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo.

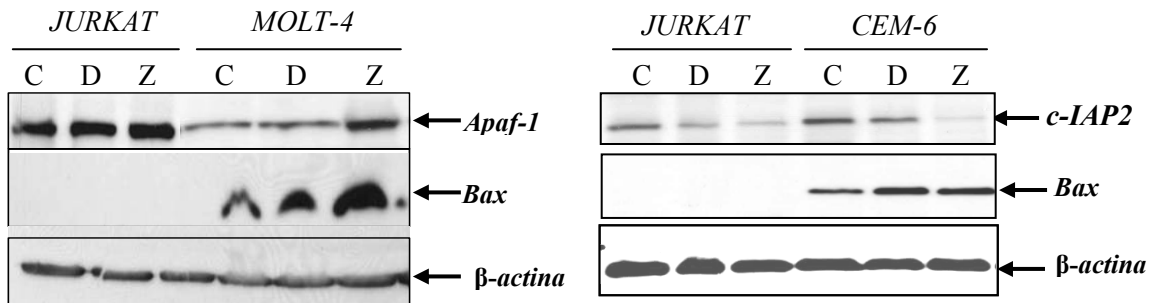
### ***5. Regulación por decitabine y zebularine de la expresión de proteínas involucradas en la inducción de apoptosis en células T leucémicas.***

Los cambios en el patrón epigenético de células tumorales pueden dar lugar al silenciamiento en la expresión de proteínas supresoras de tumores o pro-apoptóticas, como es el caso de Apaf-1 en células de melanoma (*Soengas et al, 2001*), o bien a la reactivación de proteínas oncogénicas que se encuentran normalmente silenciadas en las células sanas, como es el caso de H-Ras y Bcl-2 (*Ehrlich, 2002; Feinberg & Tycko, 2004*). La alteración en la expresión de unas u otras va a favorecer el crecimiento y desarrollo del tumor.

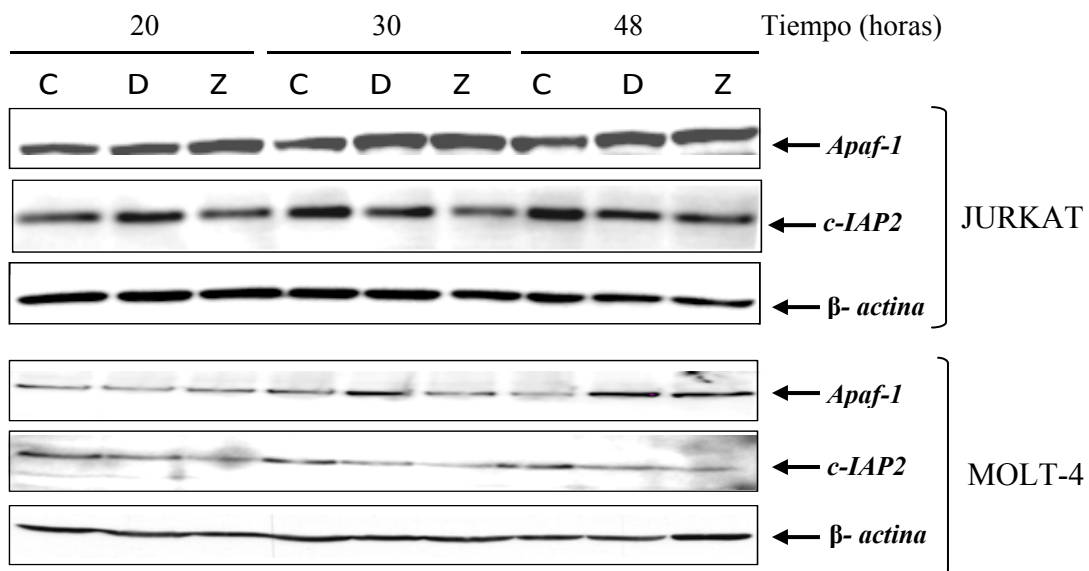
En nuestro modelo de células T leucémicas, hemos analizado si los agentes desmetilantes decitabine y zebularine regulan la expresión de diversas proteínas implicadas en las rutas de inducción de apoptosis. En concreto, determinamos la expresión de Bid, Bim, Bax, Bcl-2, XIAP, c-IAP2, Smac y Apaf-1 en las tres líneas celulares T leucémicas, Jurkat, CEM-6 y MOLT-4, tras 48 horas de tratamiento con las dosis establecidas de 5  $\mu$ M decitabine y 50  $\mu$ M zebularine. Los resultados de este estudio indican que la mayor parte de las proteínas analizadas no sufren cambios en su expresión en respuesta al tratamiento con los agentes desmetilantes. Sólo observamos en algunos casos un cierto incremento en la expresión de Apaf-1 y de Bax y especialmente una disminución en los niveles de c-IAP2 (Fig. 35 y datos no mostrados).

Basándonos en nuestros resultados anteriores, en los que observamos que a tiempos cortos de tratamiento (20-24 horas) los inhibidores de DNMTs ya inducen la activación de caspasas, la caída del potencial de membrana mitocondrial o la producción de ROS, hemos analizado la cinética de regulación de Apaf-1 y c-IAP2. Centramos nuestro interés en estas dos proteínas puesto que la línea de células Jurkat usada en este trabajo no expresan Bax, ni basal ni en respuesta a decitabine o zebularine. Encontramos que los cambios en la expresión de Apaf-1 y de c-IAP2 son apreciables a partir de las 30 horas de tratamiento, tanto en células Jurkat como en células MOLT-4 (Fig. 36), lo que

cuestiona la posible importancia de dichos cambios en la inducción de apoptosis por los inhibidores de DNMTs.



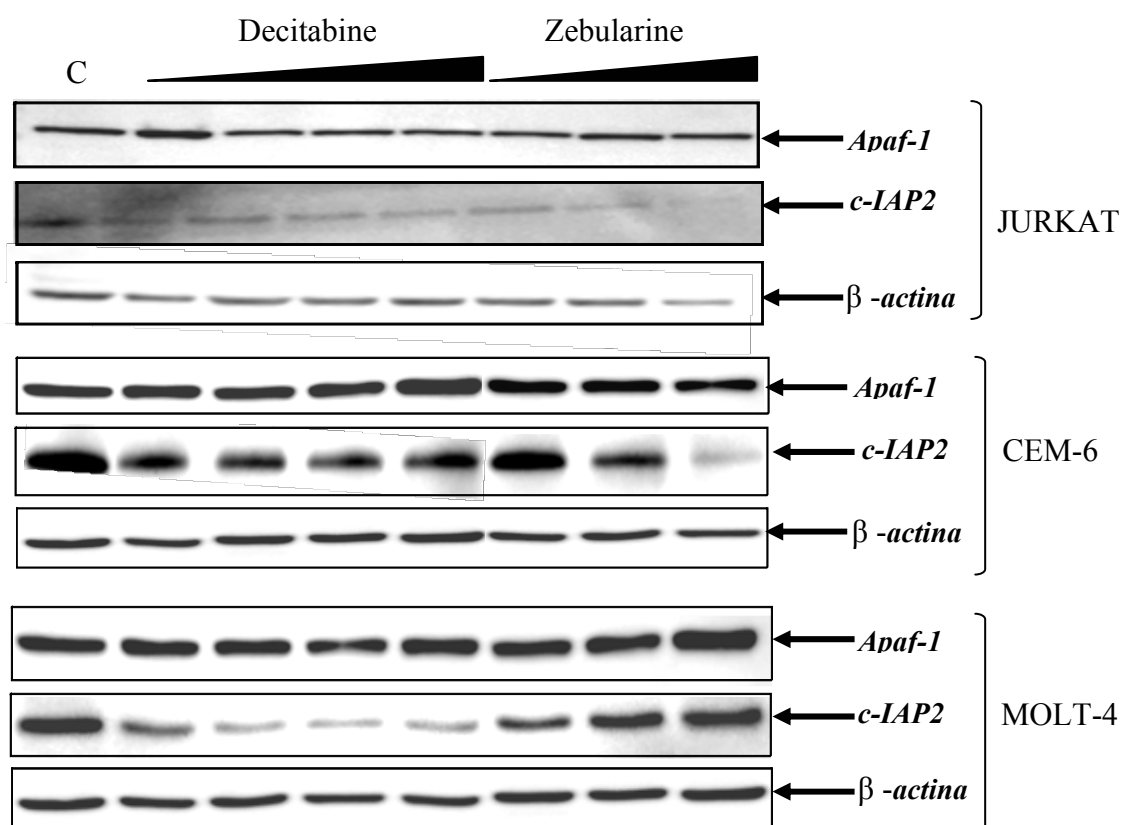
**Figura 35.** Expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas en células Jurkat, CEM-6 y MOLT-4 tratadas con decitabine y zebularine. Células Jurkat, CEM-6 y MOLT-4 fueron tratadas o no (C) durante 48 horas con decitabine 5 $\mu$ M (D) o zebularine 50 $\mu$ M (Z). La expresión de Bax, Apaf-1 y c-IAP2 se determinó mediante Western-blot. Como control de carga se determinó la expresión de  $\beta$ -actina.



**Figura 36.** Cinética de expresión de Apaf-1 y c-IAP2 en células Jurkat y MOLT-4 tratadas con decitabine y zebularine. La expresión de las proteínas indicadas se determinó mediante Western-blot en células Jurkat y MOLT-4 no tratadas (C) o tratadas durante 20, 30 y 48 horas con decitabine 5  $\mu$ M (D) ó zebularine 50  $\mu$ M (Z). Como control de carga se analizó la expresión de  $\beta$ -actina.



Concentraciones de decitabine inferiores a 5  $\mu\text{M}$  y de zebularine iguales o menores de 100  $\mu\text{M}$  son las que están descritas como las más efectivas por su acción desmetilante, mientras que concentraciones más elevadas inducen un mayor daño al ADN. Nuestros resultados sobre el daño al ADN inducido por zebularine y decitabine en células T leucémicas confirman que dicho daño es dosis-dependiente y además correlaciona con la inducción de apoptosis. Para conocer las concentraciones más efectivas en la regulación de las proteínas anteriormente mencionadas (Apaf-1 y c-IAP2), hemos realizado una dosis-respuesta, a 48 horas de tratamiento, en las distintas líneas estudiadas.

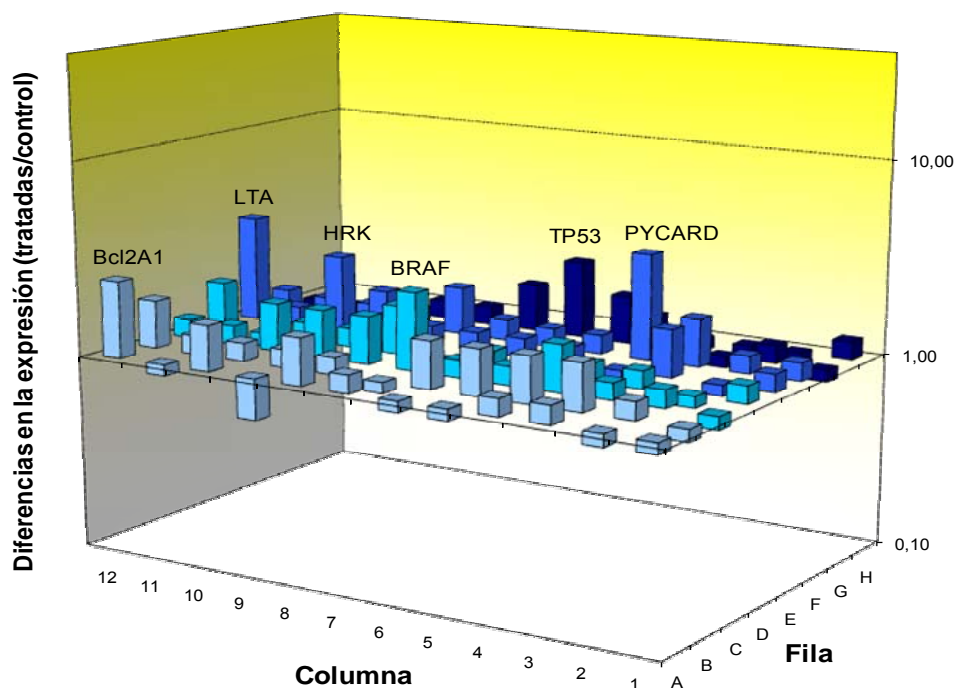


**Figura 37.** Expresión de Apaf-1 y c-IAP2 en células T leucémicas tratadas con diferentes dosis de decitabine y zebularine. La expresión de Apaf-1 y c-IAP2 se determinó mediante Western-blot en células Jurkat, CEM-6 y MOLT-4 tras 48 horas de incubación en ausencia (C) o en presencia de decitabine (1, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) ó zebularine (10, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ). Como control de carga se determinó la expresión de  $\beta$ -actina.

Aunque existe cierta variabilidad entre líneas, en general observamos que los cambios más significativos en la expresión de Apaf-1 y de c-IAP2 se producen a las concentraciones más elevadas de decitabine y zebularine (Fig. 37). Además, tanto la cinética de expresión como el ensayo de dosis-respuesta indican que los cambios en los niveles de c-IAP2 son mayores y más contundentes que los de Apaf-1.

Para ampliar el análisis sobre los posibles genes relacionados con apoptosis regulados en células T leucémicas en respuesta al tratamiento con los inhibidores de DNMTs, hemos realizado un array de PCR, utilizando un kit que permite determinar la expresión de 84 genes diferentes que están implicados en este proceso de muerte celular. Dicho array lo hemos llevado a cabo sobre células Jurkat tratadas con el agente desmetilante zebularine durante 24 horas, tiempo en el que, como ya hemos descrito anteriormente, se empiezan a observar las primeras señales de apoptosis. Hemos utilizado zebularine porque consideramos que es el más interesante de estudiar. Su acción parece ser más rápida y efectiva que la del decitabine sobre las diferentes líneas de células T leucémicas utilizadas en este estudio, presentando al mismo tiempo menor toxicidad para las células normales.

El resultado de la expresión de los genes analizados se representa en forma de barras en la figura 38. Este resultado es la media de dos experimentos independientes. De los 84 genes que se han analizado, encontramos un incremento en la expresión de Bcl2A1, BRAF, HRK (Harakiri), LTA, PYCARD y TP53, en respuesta al tratamiento con zebularine. Dicho incremento es en todos los casos del orden de dos y media o tres veces y media con respecto a la expresión del gen en las células control. Curiosamente, a este tiempo no encontramos cambios en la expresión de Apaf-1, Bax o c-IAP2, lo que sugiere que, al igual que ocurre con los cambios en proteína, los cambios a nivel de ARNm requieren un tiempo más largo de incubación para ser apreciables, o bien que las alteraciones en los niveles de proteína se deban a algún tipo de regulación postraduccional.



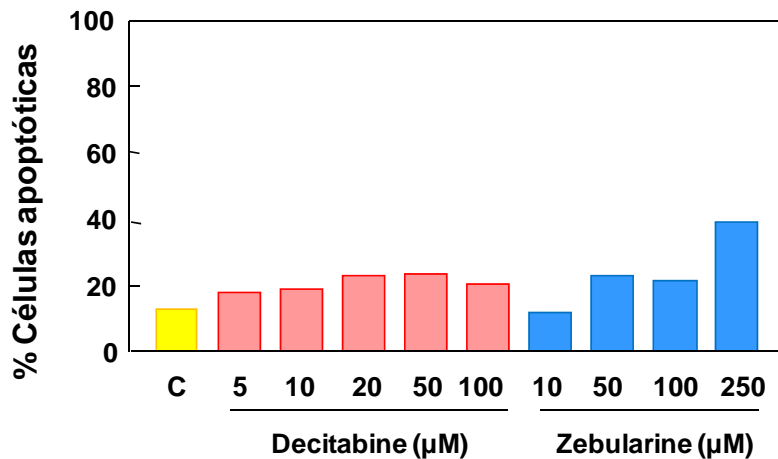
**Figura 38.** Array de expresión de genes en células Jurkat en respuesta al tratamiento con zebularine. Células Jurkat fueron incubadas durante 24 horas con zebularine (50 $\mu$ M), se extrajo el ARNm y se llevó a cabo un array de expresión génica. Los resultados, expresados como la relación entre la expresión en las células tratadas y la expresión en las células control, se representan en forma de barras. Se señalan los genes en los que los cambios son significativos (relación  $\geq 2$ ).

## 6. Inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en leucemias primarias

Una vez estudiada la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en líneas de células T leucémicas, y conocida la baja toxicidad que ambas drogas presentan para linfocitos primarios de donantes sanos, analizamos la capacidad de inducción de apoptosis de estos inhibidores de metilación *ex vivo* sobre muestras de leucemias primarias obtenidas de pacientes con leucemias T y comparamos dicho efecto con el que ejercen sobre otras neoplasias hematológicas.

### 6.1. Respuesta de distintos modelos de neoplasias de células T al tratamiento con decitabine y zebularine.

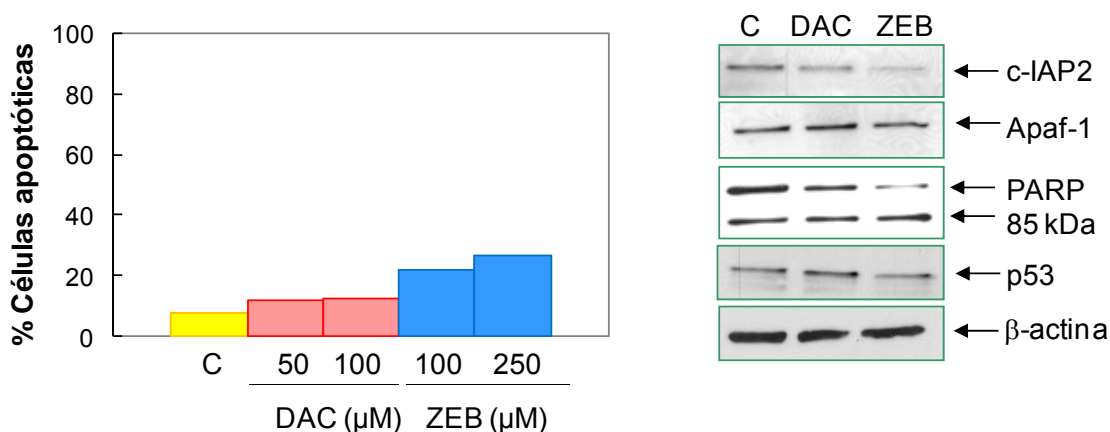
Hemos analizado la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en linfocitos T de muestras de sangre de pacientes diagnosticados con algún tipo de neoplasia de células T. La figura 39 muestra los resultados obtenidos en una leucemia T precursora. Esta leucemia es bastante resistente a la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine, observándose solo un claro efecto en respuesta al tratamiento con la dosis más elevada de zebularine (250 $\mu$ M).



**Figura 39. Inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en células de leucemia T precursora.** Células T fueron obtenidas a partir de sangre de paciente siguiendo el protocolo que se indica en materiales y métodos. A continuación se incubaron durante 48 horas en ausencia (C) o en presencia de las dosis indicadas de decitabine o zebularine y la proporción de células en la fase sub-G1 del ciclo celular se determinó mediante citometría de flujo.

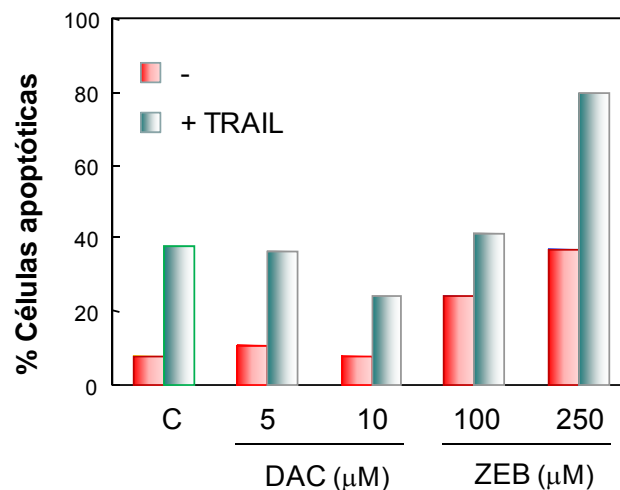
Resultados similares se han obtenido con una muestra de leucemia linfoblástica T, aunque en este caso el efecto de zebularine se aprecia no solo a la dosis más elevada sino también a la de 100 $\mu$ M (Fig. 40, panel izquierdo). Gracias a la elevada cantidad de células obtenidas tras el procesamiento de la muestra de

este paciente, hemos podido realizar un análisis de expresión de proteínas mediante Western-blot (Fig. 40, panel derecho). En concreto, analizamos la expresión de aquellas que sufren cambios en las líneas celulares en respuesta al tratamiento con los inhibidores de metilación, como son c-IAP2 y Apaf-1, observando de nuevo en este caso la pérdida de c-IAP2, aunque no se aprecian cambios en Apaf-1. También analizamos la degradación de PARP, observando un mayor procesamiento de este sustrato de caspasas en respuesta al tratamiento con zebularine, lo que corrobora los resultados obtenidos mediante determinación del porcentaje de células en la fase sub-G1 del ciclo celular. Y finalmente determinamos la expresión de p53, no observándose variaciones en su expresión lo que sugiere que este gen puede estar mutado, como en las líneas celulares con las que hemos trabajado, y confirma la inducción de apoptosis por zebularine en células T leucémicas de manera independiente de p53.



**Figura 40. Inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en células de leucemia linfoblástica T.** Células T se obtuvieron a partir de sangre de paciente y se incubaron durante 48 horas sin (C) o con las dosis indicadas de decitabine (DAC) o zebularine (ZEB), para la determinación de células en la fase sub-G1 del ciclo celular, o con decitabine 100μM y zebularine 250μM para el análisis de expresión de proteínas. Como control de carga se determinó la β-actina. .

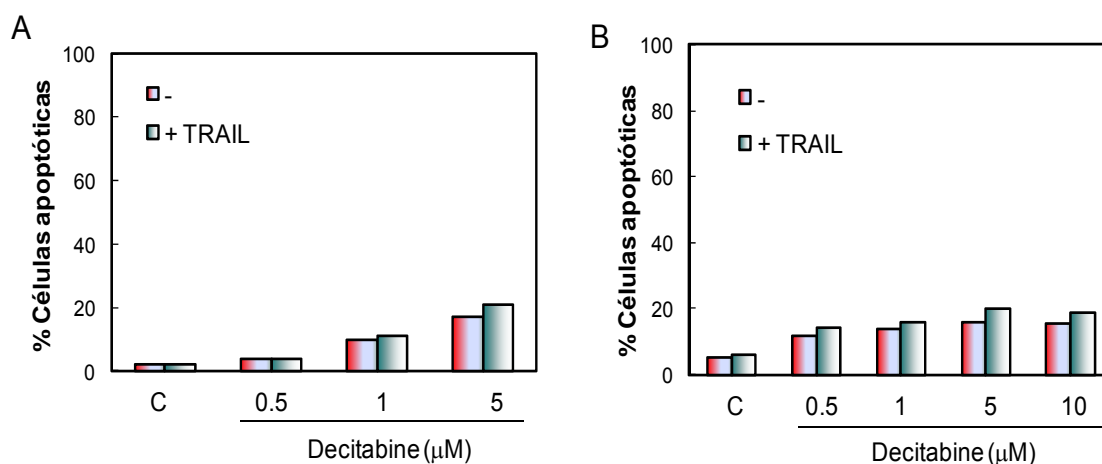
Analizamos una tercera muestra procedente de un paciente con una leucemia T aguda. En este caso hemos llevado a cabo un tratamiento simultáneo con los inhibidores de DNMTs y TRAIL, para conocer la sensibilidad a este ligando y el efecto de la combinación de ambos tipos de drogas. Observamos de nuevo que las células son más sensibles a la inducción de apoptosis por zebularine que por decitabine (Fig. 41). Además, son sensibles al ligando de muerte TRAIL. Cuando combinamos este ligando con decitabine, el porcentaje de células apoptóticas es similar al que induce el ligando por sí solo. Únicamente la combinación de TRAIL con la dosis más elevada de zebularine induce un claro efecto aditivo de los efectos de ambos fármacos (Fig. 41).



**Figura 41. Inducción de apoptosis por decitabine y zebularine combinados con TRAIL en células de leucemia T aguda.** Células T se obtuvieron a partir de sangre de paciente y se incubaron durante 48 horas en ausencia (C) o en presencia de las dosis indicadas de decitabine o zebularine. Durante las últimas 24 horas de tratamiento se añadió en algunos casos TRAIL (100 ng/ml) al cultivo. La proporción de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo.

En la figura 42, se representan los resultados obtenidos tras el tratamiento con decitabine de células correspondientes a un linfoma T cutáneo de un paciente recién diagnosticado. Observamos que a partir de dosis del orden de 1 μM, se

produce una leve inducción de apoptosis en estas células (Fig. 42 A). En este caso, también hemos combinado al inhibidor de DNMT decitabine con el ligando de muerte TRAIL, y el resultado obtenido indica que estas células son muy resistentes a TRAIL y prácticamente no se producen cambios significativos en el porcentaje de células apoptóticas en relación al tratamiento solo con decitabine. Los resultados obtenidos con este linfoma se han corroborado analizando una nueva muestra del mismo paciente al mes del diagnóstico (Fig. 42 B).

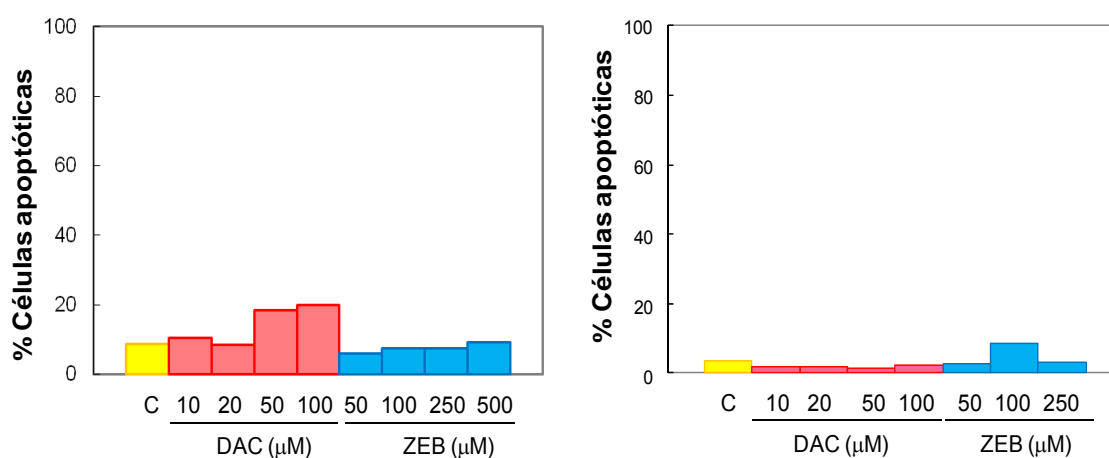


**Figura 42. Inducción de apoptosis por decitabine y TRAIL en células de linfoma T cutáneo.** Se obtuvieron células de sangre de paciente recién diagnosticado (A) o al mes del diagnóstico (B). Tras su obtención, las células se incubaron con las dosis indicadas de decitabine y a las 24 horas se añadió TRAIL (100 ng/ml) durante 24 horas más. La proporción de células en la fase sub-G1 del ciclo celular se determinó mediante citometría de flujo.

## 6.2. Respuesta de distintos modelos de leucemias B al tratamiento con decitabine y zebularine.

Actualmente en clínica se está empezando a investigar cómo responden las leucemias de células B al tratamiento con agentes inhibidores de la metilación. Nosotros hemos podido obtener muestras de este tipo de leucemias y las hemos analizado, con objeto de comparar el efecto de decitabine y zebularine sobre este

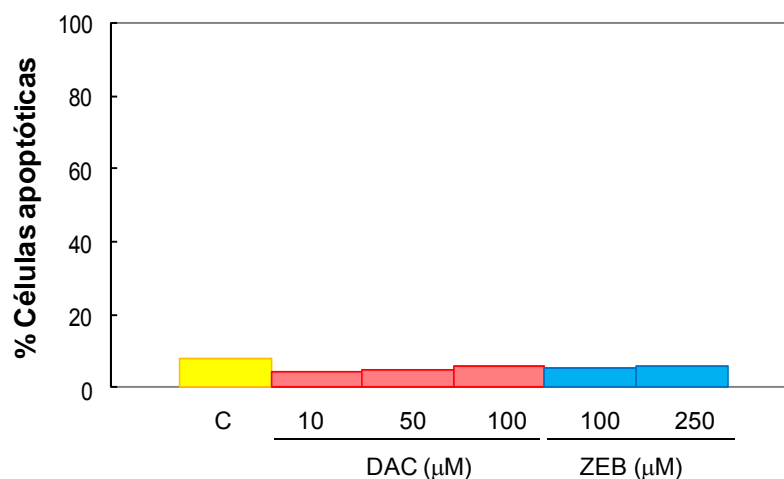
modelo con el que presentan dichas drogas sobre nuestro modelo de células T, y determinar si ambos tipos de leucemias difieren en la sensibilidad a estas drogas. En la figura 43 se muestran los resultados obtenidos tras el análisis de dos muestras de leucemia linfoblástica B. Como se observa en dicha figura, estas células, en general, son muy resistentes a decitabine y zebularine, detectándose solo un pequeño porcentaje de células apoptóticas tras el tratamiento con dosis elevadas de decitabine en uno de los casos (Fig. 43, panel izquierdo).



**Figura 43. Inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en células de leucemia linfoblástica B.** Se obtuvieron células de leucemia linfoblástica B a partir de sangre de dos pacientes diferentes siguiendo el protocolo que se indica en materiales y métodos. Las células fueron incubadas durante 48 horas sin (C) o con las dosis indicadas de decitabine o zebularine y la proporción de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo.

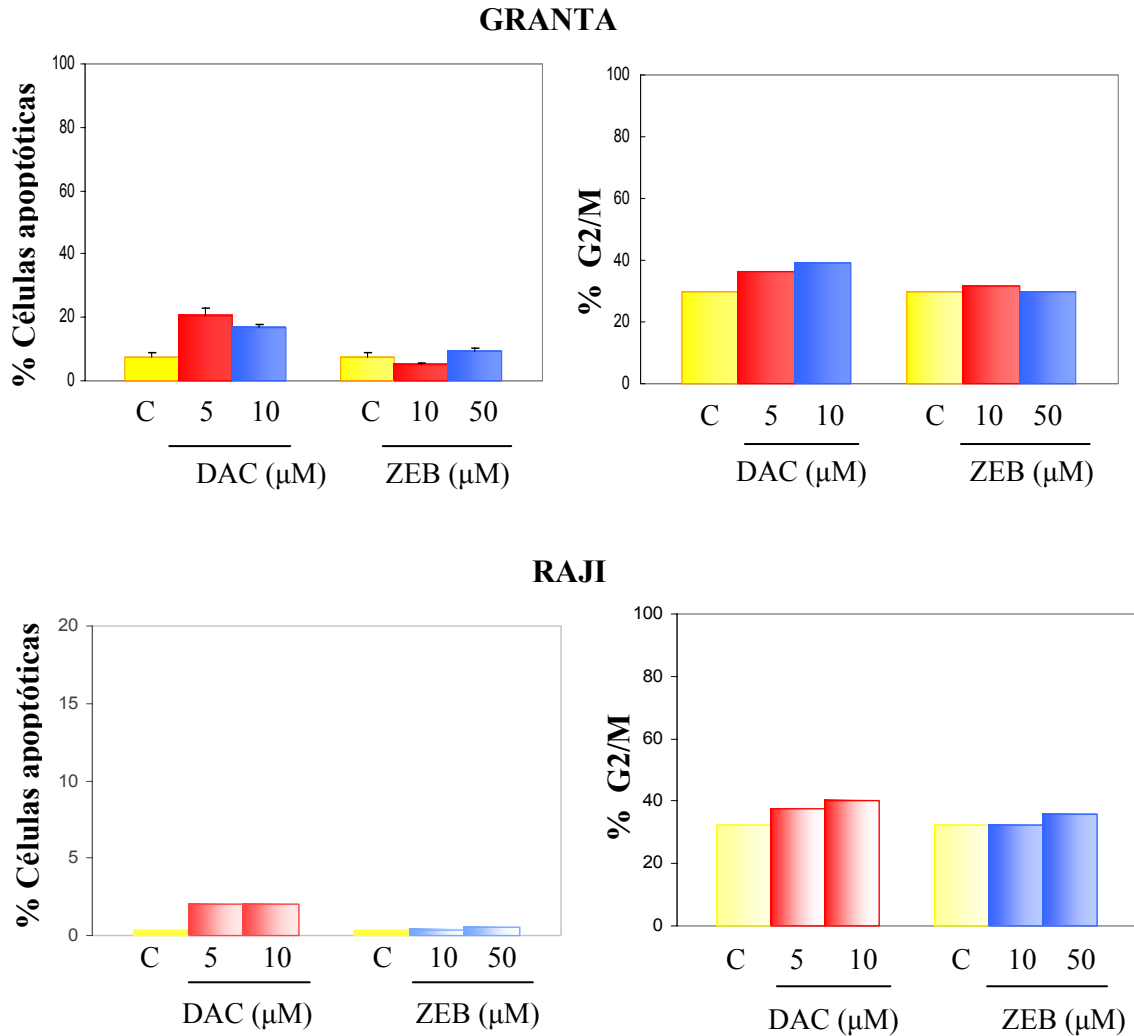
Analizamos también células de una muestra de un paciente con leucemia linfática crónica B, obteniendo resultados similares a los de los dos casos anteriores, es decir, que presentan una resistencia muy elevada a decitabine y zebularine (Fig. 44).





**Figura 44. Inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en células de leucemia linfática crónica B.** Células B se obtuvieron a partir de sangre de paciente y fueron incubadas durante 48 horas con las dosis indicadas de decitabine o zebularine. La proporción de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo.

Nuestros datos sobre el efecto de decitabine y zebularine en células T leucémicas indican que las líneas celulares muestran una mayor sensibilidad que las leucemias primarias, al menos a las dosis y tiempos estudiados. Para determinar si la resistencia que muestran las células analizadas procedentes de muestras de pacientes con leucemia de tipo B es un fenómeno particular de dichas muestras o, por el contrario, ocurre en general en neoplasias linfoides de este tipo, hemos analizado el efecto de decitabine y zebularine sobre dos líneas tuorales de células B: Granta (linfoma de células de manto) y Raji (linfoma de Burkkit). Los resultados que hemos obtenido nos indican que ambas líneas son muy resistentes a la inducción de apoptosis por zebularine y presentan una sensibilidad muy baja a decitabine (Fig. 45), coincidiendo por tanto con los derivados del estudio de las muestras primarias de leucemias B y confirmando la mayor resistencia de este tipo de neoplasias a decitabine, pero especialmente a zebularine, en comparación con las neoplasias de células T.



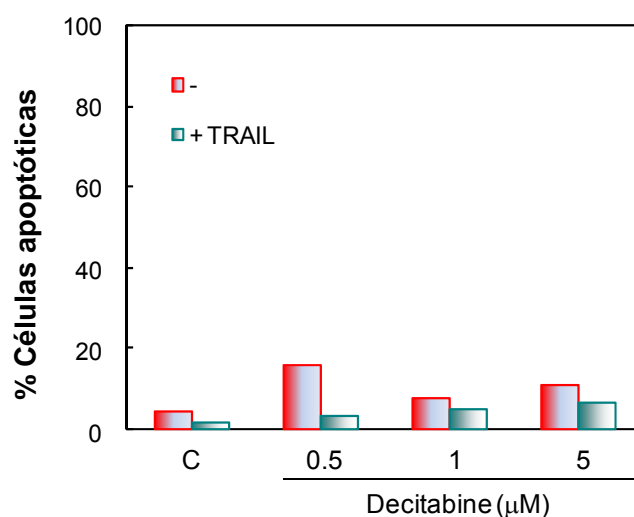
**Figura 45. Efecto de decitabine y zebularine en las líneas tumorales de tipo B Granta y Raji.** Células Raji y Granta, fueron no tratadas (C) o tratadas durante 48 horas con las dosis indicadas de decitabine o zebularine. La proporción de células en las fases sub-G1 o G2/M del ciclo celular se determinó mediante citometría de flujo, utilizando escalas de amplificación logarítmica o lineal, respectivamente. Las barras de error muestran el SEM de tres experimentos independientes.

Al mismo tiempo que analizamos el porcentaje de células apoptóticas, analizamos también la posible parada del ciclo celular en la fase G2/M, como ocurría en células Jurkat y CEM tratadas con decitabine. Tanto en el caso de células Raji como de Granta se observa un leve incremento en la proporción de

células en dicha fase del ciclo en respuesta al tratamiento con decitabine, pero no con zebularine (Fig.- 45).

### ***6.3. Respuesta de células de leucemia mieloide aguda al tratamiento con el agente desmetilante decitabine.***

Se están llevando a cabo ensayos clínicos para el uso de decitabine en el modelo de leucemia mieloide aguda, con resultados bastante satisfactorios. Nosotros hemos analizado la respuesta a este agente desmetilante en una muestra procedente de un paciente con este tipo de leucemia, para comparar el efecto con el observado en nuestro modelo de células T leucémicas.



***Figura 46. Inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en células de leucemia mieloide aguda.*** Se obtuvieron las células de sangre de paciente y a continuación se incubaron 48 horas en ausencia (C) o en presencia de las dosis indicadas de decitabine. Durante las últimas 24 horas de tratamiento se añadió TRAIL (100ng/ml) en algunos cultivos. La proporción de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo.

Como se observa en la figura 46, hay una débil inducción de apoptosis en células primarias de leucemia mieloide tratadas con decitabine, incluso menor que la observada en células primarias de leucemia T en respuesta a zebularine.

---

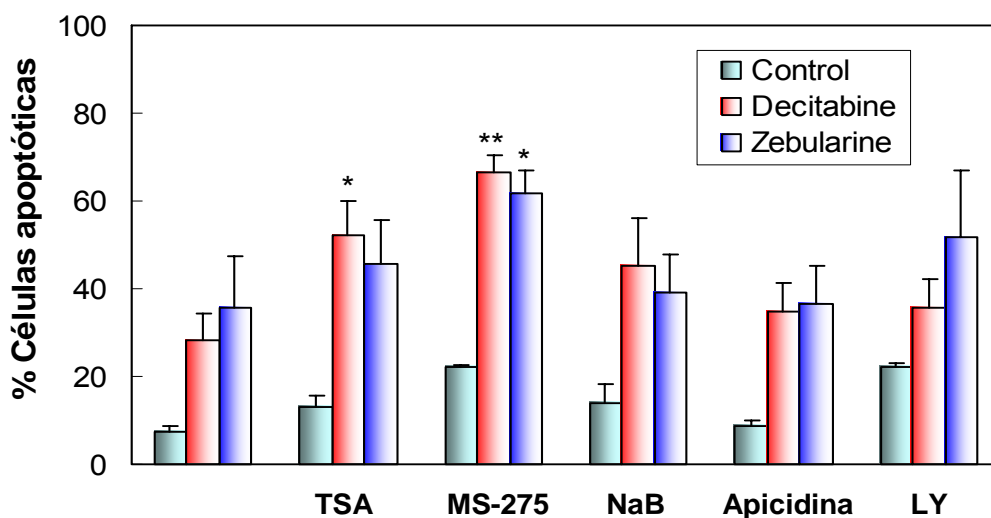
Curiosamente, cuando analizamos el efecto de TRAIL, solo o en combinación con decitabine, sobre estas células leucémicas de origen mieloide, encontramos que no solo son muy resistentes al ligando de muerte sino que éste inhibe o reduce la inducción de apoptosis por decitabine.

### ***7. Inducción de apoptosis en células T leucémicas en respuesta al tratamiento combinado con inhibidores de metilación del ADN y otras drogas quimioterapéuticas.***

La gran cantidad de datos generados en los últimos años, tanto *in vitro* como *in vivo*, sobre la acción de las drogas epigenéticas en el tratamiento de tumores ha demostrado que, en determinados casos, estos agentes presentan una baja efectividad cuando se utilizan en monoterapia. Este hecho ha provocado un gran interés en la búsqueda de estrategias combinadas que permitan mejorar el efecto de estas drogas en la terapia antitumoral. Por ejemplo, se ha demostrado que el uso combinado de los inhibidores de DNMTs con inhibidores de HDAC da mejores resultados que la utilización de dichas drogas de forma individual (*Gore et al, 2006*).

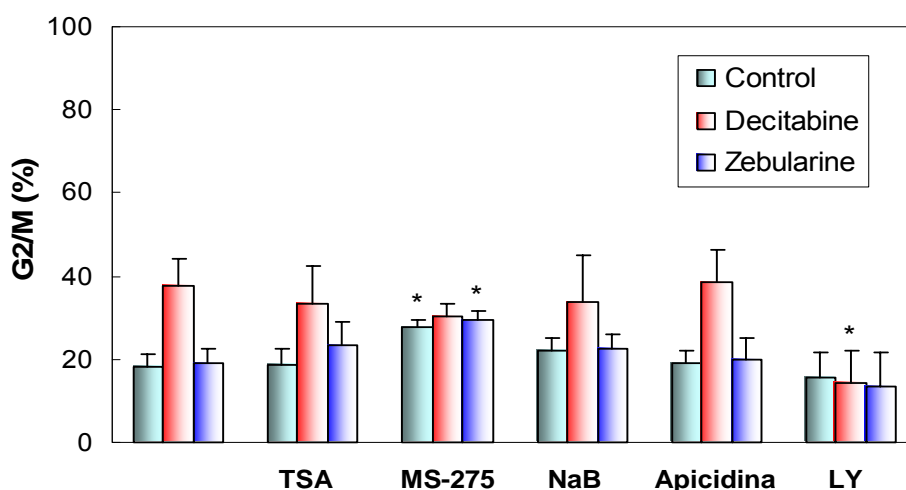
Hemos analizado el efecto sobre células T leucémicas de decitabine y zebularine cuando se combinan con inhibidores de HDAC, como TSA, MS-275, butirato sódico y apicidina. También hemos combinado los agentes desmetilantes con un inhibidor de PI3K, enzima relacionada con crecimiento, proliferación y supervivencia, cuya ruta se encuentra sobreactivada en muchos tumores, disminuyendo así la apoptosis celular. Para ensayar estas combinaciones preincubamos células Jurkat con los inhibidores de metilación y a las 24 horas añadimos los inhibidores de HDAC o de PI3K, analizando la inducción de apoptosis 24 horas más tarde. Como se observa en la figura 47, los distintos inhibidores de HDAC inducen débilmente apoptosis en células Jurkat a las concentraciones utilizadas, con excepción de la apicidina. También el compuesto

LY-294002, inhibidor de PI3K, induce muerte celular. Cuando se incuban células Jurkat con estos inhibidores durante 48 horas el porcentaje de células apoptóticas es mucho más elevado (datos no mostrados), de ahí que se añadan a los cultivos celulares solo durante las últimas 24 horas en estos experimentos de combinación. El tratamiento combinado con los inhibidores de HDAC, TSA y MS-275, origina una cierta potenciación de la apoptosis mediada por los inhibidores de DNMTs, especialmente significativa en el caso de decitabine. Por el contrario, no encontramos cambios estadísticamente significativos en la apoptosis inducida por los agentes desmetilantes cuando se combinan con butirato sódico, apicidina o con el inhibidor de PI3K.



**Figura 47. Inducción de apoptosis en respuesta al tratamiento combinado con inhibidores de HDAC o de PI3K y decitabine o zebularine.** Células Jurkat fueron pretratadas o no durante 24 horas con 5 $\mu$ M decitabine ó 50 $\mu$ M zebularine. Tras el pretratamiento, las células fueron incubadas otras 24 horas en presencia de TSA (10ng/ml), MS-275 (1 $\mu$ M), NaB (butirato sódico 0,5mM), apicidina (50nM) ó LY-294002 (10 $\mu$ M). El porcentaje de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error nos muestran el SEM de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , en relación al tratamiento solo con decitabine o zebularine.

Al mismo tiempo que analizamos el porcentaje de células en sub-G1, se ha comprobado si se produce parada de ciclo en G2 o se potencia la parada inducida por decitabine cuando se combinan los distintos fármacos. Como se observa en la figura 48, los inhibidores de HDAC, a excepción del MS-275, no inducen parada en G2, como tampoco afectan de manera significativa al porcentaje de células en G2 tras el tratamiento con decitabine o zebularine. Por el contrario, el MS-275 induce una clara parada en G2, tanto solo como en combinación con zebularine, y curiosamente reduce de forma leve (no estadísticamente significativa) la parada en G2 inducida por decitabine. Con el inhibidor de PI3K LY-294002 también encontramos una reducción, en este caso completa, de la parada en G2 inducida por decitabine, aunque este inhibidor por si solo no afecta al ciclo celular.

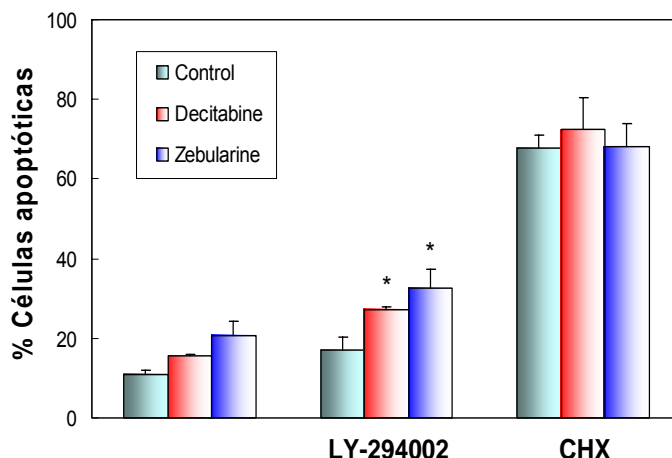


**Figura 48.** Efectos sobre el ciclo celular del tratamiento combinado con inhibidores de HDAC o de PI3K y decitabine o zebularine. Células Jurkat fueron tratadas o no durante 48 horas con 5 $\mu$ M decitabine o 50 $\mu$ M zebularine. Durante las últimas 24 horas se añadió TSA (10ng/ml), MS-275 (1 $\mu$ M), NaB (butirato sódico 0,5mM), apicidina (50nM) ó LY-294002 (10 $\mu$ M). El porcentaje de células en la fase G2 del ciclo celular se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error nos muestran el SEM de tres experimentos independientes.\*  $p < 0.05$ , en relación al control sin tratar o al tratamiento solo con decitabine o zebularine.

Los resultados de este estudio de nuevo sugieren que no existe correlación entre el efecto sobre la progresión del ciclo celular y la inducción de apoptosis en respuesta al tratamiento con los inhibidores de DNMTs.

Además de los inhibidores de HDAC y el de PI3K, hemos probado el compuesto bisindolilmaleimida, un inhibidor de la proteína quinasa C que por si solo induce apoptosis en determinadas células tumorales. El resultado de los experimentos de combinación es que dicho inhibidor no afecta a la apoptosis inducida por los agentes desmetilantes. Igualmente, la droga genotóxica doxorubicina no potencia ni modula la inducción de apoptosis por los inhibidores de DNMTs en células Jurkat (datos no mostrados).

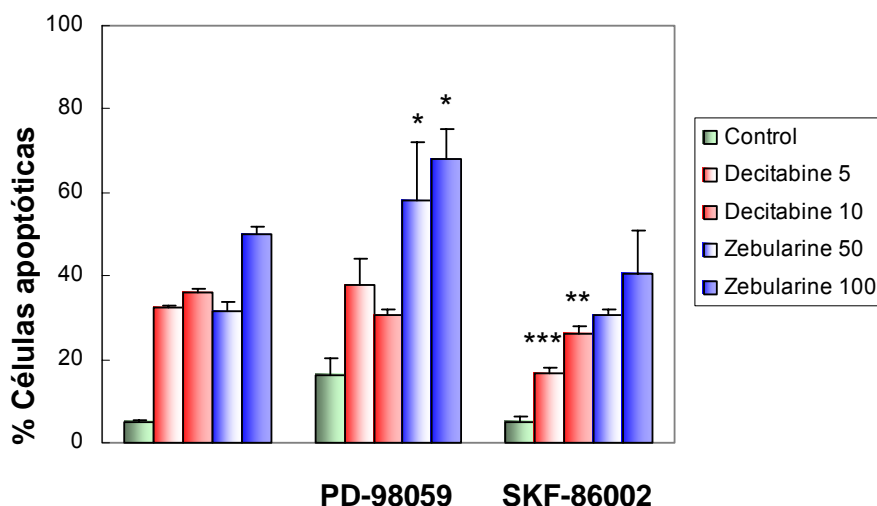
Resulta interesante conocer el efecto del inhibidor de síntesis de proteínas cicloheximida, dado que podría bloquear la apoptosis inducida por decitabine y zebularine si consideramos que la acción de los agentes desmetilantes depende de la regulación de la expresión de proteínas silenciadas. La cicloheximida por si sola induce un porcentaje tan elevado de células en apoptosis que no se observa ningún efecto tras la combinación con los inhibidores de metilación (Fig. 49). Debido a la toxicidad de la cicloheximida, en estos experimentos hemos analizado el porcentaje de células en apoptosis tras 24 horas de co-incubación. Simultáneamente, hemos estudiado también el efecto del inhibidor de PI3K a este tiempo, observando que a las 24 horas de co-tratamiento hay una cierta potenciación de la apoptosis inducida por decitabine y zebularine (Fig. 49), aunque al añadir el inhibidor 24 horas después de iniciar el tratamiento con los agentes desmetilantes no se apreciase ningún efecto (Fig. 48). El análisis de las diferentes fases del ciclo celular en estos experimentos de co-incubación de 24 horas nos revela que a este tiempo ninguno de los inhibidores, ni solos ni en combinación, producen cambios significativos en la progresión del ciclo celular (datos no mostrados).



**Figura 49.** Efecto de la combinación de cicloheximida o LY-249002 con decitabine o zebularine sobre la inducción de apoptosis en células Jurkat. Células Jurkat fueron tratadas o no durante 24 horas con 5 $\mu$ M decitabine o 50 $\mu$ M zebularine en ausencia o en presencia de cicloheximida (CHX 1 $\mu$ g/ml) ó LY-294002 (10 $\mu$ M). La proporción de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error nos muestran el SEM de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ , en relación al tratamiento solo con decitabine o zebularine.

Finalmente, hemos analizado el efecto de diferentes inhibidores de la ruta de MAPKs sobre la inducción de apoptosis por los agentes desmetilantes ya que, como se ha mencionado en la introducción, esta familia de quinasas está relacionada con señales de proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte celular. En concreto, utilizamos el inhibidor de MEK PD-98059, el inhibidor de p38MAPK SKF-86002 y el inhibidor de JNK SP-600125. Cuando analizamos en células Jurkat la respuesta al tratamiento combinado con el inhibidor de MEK (PD-98059), vemos que se potencia la apoptosis inducida por zebularine mientras que no se observan cambios significativos en la muerte celular mediada por decitabine (Fig. 50). Por el contrario, el inhibidor de p38MAPK (SKF-86002) produce una importante disminución del porcentaje de células apoptóticas que se originan en respuesta al tratamiento con decitabine, aunque no afecta a la apoptosis inducida por zebularine (Fig. 50).



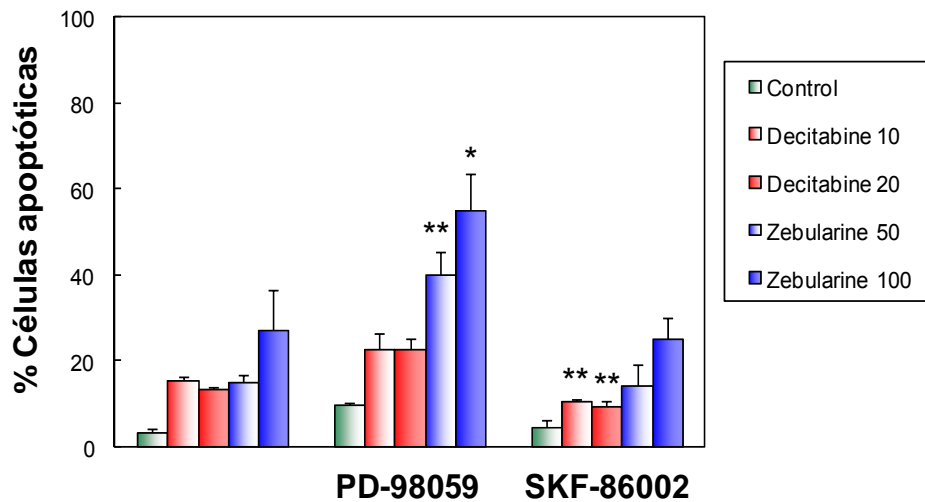


**Figura 50. Efecto de los inhibidores de MAPKs sobre la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en células Jurkat.** Células Jurkat fueron tratadas o no durante 48 horas con las dosis indicadas de decitabine o zebularine (en ambos casos del orden  $\mu\text{M}$ ) en presencia o en ausencia de los inhibidores PD-98059 ( $50\mu\text{M}$ ) ó SKF-86002 ( $10\mu\text{M}$ ). La proporción de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error nos muestran el SEM de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $< 0.01$ ; \*\*\*  $< 0.00.1$ , en relación al tratamiento solo con decitabine o zebularine.

El inhibidor de JNK, SP-600125, por sí solo induce apoptosis en células Jurkat, y cuando se combina con decitabine o zebularine lo que se observa es una suma de los efectos de ambos tipos de inhibidores en la inducción de apoptosis (datos no mostrados).

Los resultados con los inhibidores de MAPKs vuelven a corroborar que existen diferencias en el mecanismo de acción de decitabine y zebularine, y en este caso en concreto dichas diferencias radican en su interacción o relación con determinadas vías de supervivencia celular. Para confirmar si los efectos observados con los inhibidores MAPKs se deben a alguna peculiaridad de las células Jurkat o por el contrario constituyen un fenómeno más general, analizamos la inducción de apoptosis en células CEM-6 tratadas con las mismas

combinaciones de inhibidores. Como se observa en la figura 51, también en esta línea celular el inhibidor de MEK potencia la apoptosis inducida por zebularine y el inhibidor de p38MAPK reduce la apoptosis mediada por decitabine.



**Figura 51. Inducción de apoptosis en células CEM-6 en respuesta al tratamiento combinado con inhibidores de MAPKs e inhibidores de DNMTs.** Células CEM-6 fueron tratadas o no durante 48 horas con las dosis indicadas de decitabine o zebularine (en ambos casos del orden  $\mu\text{M}$ ) en presencia o en ausencia de los inhibidores PD-98059 ( $50\mu\text{M}$ ) ó SKF-86002 ( $10\mu\text{M}$ ). La proporción de células en sub-G1 se determinó mediante citometría de flujo. Las barras de error nos muestran el SEM de tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , en relación al tratamiento solo con decitabine o zebularine.

## ***V. DISCUSIÓN***



La metilación del ADN es un proceso que aparece tanto en células eucariotas como procariotas (*Noyer-Weidner & Trautner, 1993*) y sirve para regular la expresión de los genes. Además, juega un papel importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica y el inicio de la carcinogénesis (*Baylin & Herman, 2000; Colot & Rossignol, 1999*). Hoy en día sabemos que la tumorigénesis es un proceso en el que intervienen numerosos componentes, entre los que adquieren una gran importancia las alteraciones epigenéticas, principalmente las que van a dar lugar al silenciamiento de genes que son elementos clave para la regulación del cáncer. De ahí que el papel de las alteraciones epigenéticas en el desarrollo del cáncer, esté siendo actualmente foco de numerosas investigaciones, con el fin de desarrollar fármacos que puedan revertir esas alteraciones y así lograr una terapia efectiva en la lucha contra el cáncer.

Dentro de los fármacos que pueden revertir las modificaciones epigenéticas se encuentran los análogos de nucleósidos, que han sido recientemente propuestos como drogas efectivas para ciertas neoplasias hematológicas. El agente desmetilante decitabine, se ha probado en numerosos ensayos clínicos en pacientes con síndromes mielodisplásicos, leucemia mieloide crónica o leucemia mieloide aguda, induciendo un mayor porcentaje de supervivencia y una reducción de las células tumorales (*Wijermans et al, 2000*). Aunque el mecanismo exacto de actuación paralelo a su actividad clínica se desconoce (*Fandy et al, 2009; Kuendgen & Lubbert, 2008; Jabbour et al, 2008*), el decitabine ha sido aprobado recientemente por la FDA para el tratamiento de síndromes mielodisplásicos. Igualmente, se han demostrado los efectos desmetilantes y la inducción de apoptosis en respuesta al tratamiento con zebularine en leucemia linfoblástica aguda en niños y en leucemia mieloide aguda (*Scott et al, 2007; Stumpel et al, 2009*).

La capacidad de estos inhibidores de DNMTs para reactivar la expresión de genes supresores de tumores e inducir apoptosis parece depender no solo de su actividad desmetilante sino también de su capacidad de inducir daño al ADN. Por otro lado, no se conoce con exactitud la ruta apoptótica que se activa tras el tratamiento con dichos inhibidores. En este estudio hemos querido examinar en detalle la capacidad de decitabine y zebularine para inducir apoptosis de forma selectiva en células T leucémicas y el mecanismo por el cual estos agentes desmetilantes inducen dicho proceso de muerte celular.

Estudios recientes sobre la efectividad del tratamiento con decitabine han demostrado que este agente desmetilante induce apoptosis de manera específica en leucemias, mientras que las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos presentan una resistencia significativa a entrar en apoptosis tras la incubación con dicho agente (*Schmelz et al, 2005; Yan et al, 2009*). Estos estudios plantean que el hecho de usar PBMCs como células *ex vivo*, que no están proliferando, puede ser la causa de su resistencia a la apoptosis en respuesta al tratamiento con decitabine. Sin embargo, en este trabajo hemos analizado el efecto de decitabine y zebularine tanto en linfocitos T en reposo como en linfocitos T activados y que por tanto están proliferando, demostrando que en ambos casos presentan una elevada resistencia a la apoptosis mediada por dichos agentes.

Utilizando dosis de decitabine y zebularine que no muestran una toxicidad significativa para linfocitos T normales, observamos que en células T leucémicas se induce apoptosis dependiente de caspasas mediante la activación de la ruta mitocondrial. De estos experimentos hay que destacar los resultados obtenidos con zebularine ya que no existen estudios previos sobre la ruta por la cual este inhibidor induce apoptosis. El zebularine se utilizó en un principio porque es un inhibidor de la citidin deaminasa y por ello, al ser combinado con decitabine, evitaría la degradación de la droga por este enzima (*Driscoll et al, 1991*). Algunos años después se comprobó que también ejercía su acción como agente desmetilante. Hay que destacar el gran potencial que el zebularine tiene como

---

agente terapéutico debido a su estabilidad, baja toxicidad en las células normales tanto *in vivo* como *in vitro* y su elevada selectividad para ejercer su acción en células tumorales (Yoo *et al*, 2004). Esta selectividad por las células tumorales puede ser debida a las diferencias entre el metabolismo de una célula normal y el de una célula tumoral y a los niveles de la uridin/citidin quinasa 2 (UCK2), enzima que juega un papel importante en la incorporación al ADN del zebularine y que presenta un nivel de expresión mucho más elevado en células tumorales (Cheng *et al*, 2004).

En el caso del decitabine, existen diversos estudios sobre la inducción de apoptosis en respuesta al tratamiento con este agente desmetilante, aunque muestran cierta controversia sobre la activación e implicación de caspasas. Hay autores que describen la activación de caspasa-3 sin observar activación de caspasas iniciadoras y otros que postulan una apoptosis independiente de caspasas por lo que, en general, la participación de las caspasas en la inducción de apoptosis tras el tratamiento con decitabine no está clara (Schmelz *et al*, 2005;. Deng & Zhang, 2009; Hoglund *et al*, 2009; Khan *et al*, 2008). Los resultados de nuestro trabajo demuestran que tras el tratamiento de células T leucémicas con decitabine y zebularine se produce la activación de las caspasas-8 y -9 iniciadoras, así como la de caspasas efectoras que degradan el sustrato PARP. Además, para confirmar que la apoptosis que se produce en respuesta al tratamiento con estos agentes desmetilantes es dependiente de caspasas, y la importancia de estas, demostramos que el inhibidor general de caspasas Z-VAD-FMK produce una inhibición total de la apoptosis, al igual que ocurre en células deficientes de caspasa-9.

En paralelo a la inducción de apoptosis, nuestros resultados revelan que el tratamiento con decitabine produce una parada en la fase G2 del ciclo celular en algunas células T leucémicas, de manera similar a como se ha descrito en otros modelos tumorales (Jiemjit *et al*, 2008; Lavelle *et al*, 2003), lo que sugiere que este inhibidor de metilación también presenta efectos antiproliferativos en estas células tumorales. Dicho efecto antiproliferativo se confirma al observar la

inhibición de la proliferación celular a tiempos largos de tratamiento. Al contrario de lo que ocurre con decitabine, en respuesta al tratamiento con zebularine no se observa acumulación de células en la fase G2, ni en ninguna otra fase del ciclo celular. En células de cáncer de mama se ha descrito que el zebularine induce parada en la fase S del ciclo, posiblemente debido a la inestabilidad genómica que se produce cuando esta droga atrapa a la DNMT1 (*Billam et al, 2010*)(*Billam, et al, 2009*). Las diferencias observadas en nuestro modelo entre la capacidad de decitabine y zebularine para inducir parada en G2 nos indican que el mecanismo de acción de ambas drogas, aunque es similar en lo que se refiere a la inducción de apoptosis, difiere en otros aspectos. Sin embargo, también hay que señalar que el zebularine, a pesar de que no induce una parada significativa en ninguna de las fases del ciclo celular, presenta un efecto inhibitor de la proliferación a tiempos largos similar al que muestra el decitabine, efecto muy importante a la hora de utilizar estas drogas en terapia antitumoral.

En cuanto a la participación de la mitocondria en la inducción de apoptosis, algunos autores han demostrado que tras el tratamiento con decitabine se produce liberación del citocromo c al citoplasma y caída del potencial de membrana mitocondrial (*Schmelz et al, 2005*). Nosotros hemos obtenido resultados similares, observando la pérdida del potencial de membrana en respuesta el tratamiento con decitabine y también con zebularine. Además, hemos demostrado que tras el tratamiento con los dos inhibidores de DNMTs se produce activación de la proteína pro-apoptótica Bak y producción de ROS. Por otro lado, los resultados obtenidos con células Jurkat en las que se encuentran sobre-expresadas las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 ó Bcl-x<sub>L</sub>, y así inhibidas las señales mitocondriales, muestran que estas células son completamente resistentes a la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine. Todos estos datos, junto con la resistencia observada en células Jurkat deficientes en caspasa-9, confirman la gran importancia de la mitocondria en la apoptosis inducida por los inhibidores de DNMTs análogos de nucleósidos. Estudios previos con células que no tienen caspasa-9, han demostrado que la caída del potencial de membrana en respuesta



---

al estrés genotóxico, depende de la activación de la caspasa-9 (*Samraj et al, 2007*). Nuestros resultados coinciden con los publicados, demostrando que en ausencia de caspasa-9 no se van a producir los eventos apoptóticos mitocondriales activados en respuesta al tratamiento con los inhibidores de DNMTs, con excepción de una débil activación de la proteína pro-apoptótica Bak. Estos datos han llevado a postular un modelo según el cual la permeabilización inicial de la membrana externa mitocondrial, mediada por la activación de miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 como Bak, va a permitir la liberación de proteínas del espacio intermembrana mitocondrial y a continuación la activación de la caspasa-9 y de caspasas efectoras. Una vez activadas, las caspasas pueden originar un fenómeno de retroalimentación positiva, incrementando la permeabilización de la membrana mitocondrial y promoviendo la completa alteración de la función mitocondrial (*Franklin & Robertson, 2007; Ricci et al, 2004; Samraj et al, 2007*).

Hemos demostrado también que, en células T leucémicas tratadas con decitabine y zebularine, la caída del potencial de membrana mitocondrial precede a la liberación de ROS. Sin embargo, cuando tratamos con un mimético de la superóxido dismutasa, que impide la acumulación de ROS, las células son rescatadas de la apoptosis inducida por estos dos agentes desmetilantes lo que sugiere que la producción de ROS, a pesar de que en este modelo es un evento mitocondrial secundario y dependiente de la activación de caspasas, tiene un papel crucial en el desmantelamiento celular.

En conjunto, los datos anteriores nos llevan a pensar que el mecanismo por el cual decitabine y zebularine inducen la muerte de la célula es similar al que media la apoptosis en respuesta al estrés genotóxico. De hecho, cuando las células T leucémicas son expuestas a decitabine y zebularine, se induce daño en el ADN, como hemos determinado mediante ensayo cometa, acumulación de  $\gamma$ -H2AX y activación de proteínas implicadas en la respuesta al daño al ADN, como Nbs1 y Chk1. La inducción de daño al ADN por los análogos de nucleósidos es un hecho ya demostrado principalmente en modelos de tumores

sólidos. Otros autores han publicado que tanto ATM como ATR y otras proteínas que actúan como sustratos de ambas, son activadas en respuesta a los agentes desmetilantes (*Palii et al, 2008*). Por otro lado, está descrito que tras su incorporación en el ADN recién sintetizado, los inhibidores de metilación análogos de nucleósidos atrapan a las DNMTs y conllevan una pérdida en la expresión de estas enzimas. Los estudios sobre la disminución de la expresión de DNMT1, enzima principalmente afectado por la acción de decitabine y de zebularine, han confirmado que los niveles de ARNm de este enzima no cambian en respuesta al tratamiento con estos agentes, mientras que la expresión de la proteína se ve alterada. Esto es debido a que se induce la degradación de la DNMT1 por el proteosoma, aunque el mecanismo por el cual el enzima atrapado es degradado aún no está claro (*Patel et al, 2010*). En nuestro estudio también hemos analizado la pérdida de expresión de DNMT1, apreciándose con posterioridad a la activación de caspasas y los eventos mitocondriales. Por el contrario, la cinética de aparición de estas señales apoptóticas sí correlaciona con la de activación de proteínas relacionadas con el daño al ADN lo que sugiere la importancia de dicho daño en el mecanismo de acción antitumoral de los análogos de nucleósidos sobre células T leucémicas.

En la determinación de daño al ADN mediante ensayo cometa hemos observado que, en general, el daño producido por decitabine es menor que el inducido por zebularine. Sin embargo, la activación de proteínas implicadas en reparación del daño, como es Nbs1, es mayor. Además, observamos una mayor activación de Chk1, proteína implicada en el control del ciclo celular ya que inhibe a CDC25C induciendo parada del ciclo en fase G2/M. El arresto del ciclo celular favorece la reparación del daño al ADN y así la supervivencia celular. De acuerdo a nuestros resultados, Palii, S. et al, demuestran en sus experimentos que, en células tratadas con decitabine, se produce una colocalización de  $\gamma$ -H2AX con el enzima DNMT1 y con proteínas que tienen como objetivo reparar el ADN, como ATR y ATM, dando lugar a la activación de Chk1 (*Palii et al. 2008*). DNMT1 también colocaliza con Chk1 y parece jugar un papel activo en la respuesta de reparación del ADN dañado, además de mediar la formación de

---

aductos decitabine-ADN-DNMT1 que originan las roturas de doble cadena del ADN (Palii *et al*, 2008). En células tratadas con zebularine, por el contrario, observamos una menor activación de proteínas de respuesta al daño producido por este agente desmetilante, lo que puede provocar la mayor acumulación de roturas no reparadas y en consecuencia una mayor inducción de apoptosis. Está descrito en la literatura que el tratamiento con zebularine inhibe el proceso de reparación del ADN en célula irradiadas, incrementando así su radiosensibilidad (Dote *et al*, 2005), aunque el mecanismo por el que esto ocurre no se conoce. Este fenómeno parece estar relacionado con el hecho de que las células tratadas con zebularine no detengan el ciclo celular en la fase G2, como se observa con el decitabine, y al no parar el ciclo, no reparan el ADN dañado.

Hay varios artículos que coinciden con nuestros resultados, indicando que diversos mecanismos moleculares dan lugar a la reexpresión de genes y contribuyen a la actividad antitumoral de decitabine, siendo uno de ellos la inducción de daño al ADN (Jiemjit *et al*, 2008; Pulukuri & Rao, 2005; Schmelz *et al*, 2005). Es interesante destacar que estos autores proponen que los efectos del decitabine en la viabilidad y la proliferación celular están mediados por la activación de p21 dependiente de p53 (Jiemjit *et al*, 2008; Pulukuri & Rao, 2005), aunque también hay otros trabajos que sugieren que la activación de p21 en respuesta al tratamiento con decitabine es independiente de p53 (Lavelle *et al*, 2003). En las líneas celulares T leucémicas que hemos utilizado en nuestro estudio, p53 se encuentra mutado y no hemos observado cambios en la expresión de p21 en respuesta a los inhibidores de las DNMTs (datos no mostrados). Resultados similares han sido descritos por Nieto y colaboradores demostrando que fibroblastos embrionarios de ratón deficientes en p53, tanto primarios como transformados, responden muy notablemente a la inducción de apoptosis por decitabine (Nieto *et al*, 2004). Esto puede deberse a que existen otras moléculas, como p73, que pueden sustituir la acción de p53 (Schmelz *et al*, 2005). En este sentido, se ha demostrado que líneas celulares epiteliales en las que p73 no está metilado, no responden a la inducción de apoptosis por decitabine mientras que en líneas celulares de leucemia mieloide aguda, en las que el promotor de p73 se

encuentra metilado, decitabine aumenta la expresión de p21 e induce apoptosis (*Schmelz et al, 2005*), sugiriendo que la capacidad de decitabine para revertir la metilación e inducir la reexpresión de p73 se correlaciona con el efecto inductor de apoptosis de este agente desmetilante. Así, p73 puede funcionar como p53 en cuanto a control del ciclo celular y la inducción de apoptosis.

Por otro lado, en células T leucémicas con p53 mutado, como es el caso de células Jurkat, se ha descrito previamente su sensibilidad a drogas genotóxicas sugiriendo que, al menos en este modelo celular, los inhibidores de DNMTs pueden inducir una apoptosis de manera independiente de p53 similar a la que se produce tras someter a la célula a estrés genotóxico (*Franklin & Robertson, 2007; Samraj et al, 2007*). Sería interesante estudiar más en profundidad el papel que otras proteínas de la familia de p53, como p73 ó p63, pueden jugar en la apoptosis mediada por inhibidores de metilación del ADN en este modelo de células T leucémicas con p53 mutado.

El ligando de muerte TRAIL ha despertado un gran interés en los últimos años en el campo de la terapia antitumoral debido a su baja toxicidad para células normales. La resistencia que presentan algunos tumores a la inducción de apoptosis mediada por TRAIL, ha dado lugar a numerosos estudios sobre los mecanismos responsables de dicha resistencia y a la búsqueda de nuevas terapias que sensibilicen a dichos tumores a este ligando de muerte. Así, la resistencia a TRAIL de algunos tumores se ha relacionado con una disminución de los niveles de expresión de caspasa-8 por hipermetilación de su promotor, de manera que cuando estas células se tratan con decitabine se produce un incremento de su sensibilidad a TRAIL (*Fulda et al, 2001; Grotzer et al, 2000*). Nosotros no hemos encontrado ningún efecto potenciador de la apoptosis mediada por TRAIL en células T leucémicas tratadas con zebularine o decitabine. Por el contrario, solo observamos un efecto aditivo en la respuesta al tratamiento conjunto con estos agentes desmetilantes y el ligando de muerte, resultado de la activación simultánea de las rutas intrínseca y extrínseca de inducción de apoptosis.

---

En nuestro modelo celular no hemos observado regulación de la expresión de la caspasa-8, como tampoco hemos visto regulación en la expresión de los receptores de TRAIL, al contrario de lo que demuestran en trabajos realizados con distintas líneas de cáncer de ovario, glioma y melanoma (*Bae et al, 2008; Elias et al, 2009; Horak et al, 2005b*), lo que explica la ausencia de sensibilización a este ligando de muerte. Además, hemos utilizado otros modelos tumorales, como líneas de cáncer de mama y células Hela, pero en ningún caso hemos encontrado sensibilización a TRAIL en respuesta al tratamiento con decitabine. Por otro lado, tampoco observamos un aumento en la expresión del propio ligando de muerte TRAIL en células T leucémicas tratadas con decitabine, al contrario de lo publicado por Xu, J. and Zhou, M.H et al, 2007 en células de cáncer de mama (*Xu et al, 2007*). En general, y como resumen de todos estos datos, podemos decir que la inducción de apoptosis por agentes desmetilantes en células T leucémicas no está relacionada en modo alguno con la vía de señalización de TRAIL, es decir, que estos inhibidores no regulan factores implicados en la ruta de inducción de apoptosis por TRAIL.

La sobre-expresión de proteínas anti-apoptótica y el silenciamiento de proteínas pro-apoptóticas son causa de resistencia de muchos tumores a la inducción de apoptosis por quimioterapia y radioterapia. En la regulación de la expresión de dichas proteínas puede jugar un papel importante la hipermetilación de las regiones promotoras de los genes que codifican para las mismas (*Ehrlich, 2002; Feinberg & Tycko, 2004; Lund & van Lohuizen, 2004*). Este es el caso de la proteína pro-apoptótica Apaf-1, cuya expresión está silenciada en leucemias agudas por hipermetilación de su promotor (*Furukawa et al, 2005*), y tras el tratamiento con decitabine se restaura dicha expresión. De manera similar, nosotros hemos observado que al tratar las líneas tumorales MOLT-4, Jurkat y CEM-6 con los inhibidores decitabine y zebularine se origina un cierto incremento de Apaf-1, apreciable a partir de las 30 horas de tratamiento. Sin embargo, en el ensayo de PCR-Array no encontramos regulación del gen, aunque hay que tener en cuenta que dicho ensayo se ha realizado tras 24 horas de

tratamiento. Es posible que se necesite más tiempo para observar el efecto de estos inhibidores a nivel de regulación de los niveles de ARNm.

Además de Apaf-1, también hemos encontrado ciertos cambios en la expresión de las proteínas Bax y c-IAP2. Los miembros de la familia de Bcl-2 juegan un papel clave en la apoptosis activada mediante la ruta mitocondrial; este es el caso de Bax que está implicada en la permeabilización de la membrana externa mitocondrial por lo que un incremento de su expresión tras el tratamiento con ambos agentes desmetilantes favorecería la inducción de apoptosis. Pero al igual que en el caso de Apaf-1, no se han visto cambios en los niveles de ARNm en el array realizado tras 24 horas de tratamiento con zebularine. Además, no está descrito que Bax esté silenciado por metilación en estas líneas celulares, aunque sí se regula en respuesta al daño al ADN, tras la activación de p53 o de p73. En cualquier caso, las células Jurkat deficientes en Bax muestran una sensibilidad similar a las células MOLT-4 y mayor que la de células CEM-6, lo que sugiere que la regulación de Bax no debe jugar un papel crítico en la apoptosis mediada por decitabine y zebularine.

En relación con la proteína anti-apoptótica c-IAP2, resulta más complejo entender su regulación en respuesta al tratamiento con decitabine y zebularine, puesto que observamos una disminución de su expresión. XAF-1 (XIAP-associated factor 1) es una proteína que interacciona con c-IAP2 y otros miembros de la familia de proteínas anti-apoptóticas IAPs, bloqueando su acción inhibidora de caspasas e induciendo su degradación (*Liston et al, 2001; Arora et al, 2007*). Distintos estudios sugieren que la pérdida de expresión de XAF-1 es un evento importante en la supervivencia de células tumorales, de modo que se ha llegado a considerar como una proteína supresora de tumores. Sus bajos niveles en células tumorales se deben a hipermetilación de su promotor. Así, se ha descrito en células de leucemia mieloide que el tratamiento con decitabine induce un incremento en la expresión de XAF-1 que a su vez provoca una pérdida de expresión de IAPs (*Valdez et al, 2010*). Entre los genes analizados mediante PCR-Array no se encontraba XAF-1, de modo que no tenemos

---

información sobre su posible regulación en nuestro modelo de células T leucémicas, pero es posible que tenga lugar de forma similar a lo observado en leucemia mieloide. Sería interesante analizarlo en un futuro próximo. También cabe mencionar que c-IAP2 sí se encuentra entre los genes analizados en el array, pero no observamos cambios en su expresión lo que apoya la idea de que la reducción en los niveles de proteína se debe a modificaciones post-transcripcionales.

De los 82 genes analizados mediante PCR-Array, solo encontramos un incremento en la expresión de Bcl2A1, BRAF, HRK (Harakiri), LTA, PYCARD y TP53.

LTA, es el gen que codifica para la linfotoxina- $\alpha$ . Esta citoquina tiene una importante actividad pro-inflamatoria y es producida por células T y otras células del sistema inmunitario. Se une a los receptores de TNF, mediando así funciones similares a las de esta citoquina. Tiene por tanto actividad citotóxica, capaz de matar células tumorales. El hecho de que se incremente la expresión de este gen en respuesta al tratamiento con zebularine sugiere la posibilidad de que la linfotoxina- $\alpha$  favorezca la inducción de apoptosis por este agente desmetilante y se relaciona con los resultados anteriormente mencionados sobre la regulación del ligando de muerte TRAIL por inhibidores de DNMTs en otros modelos tumorales. Por otro lado, los resultados de expresión de ARNm de TRAIL mediante el array de PCR confirman los obtenidos mediante análisis de expresión de la proteína por citometría de flujo, que en nuestro modelo de células T leucémicas no hay modulación de este ligando de muerte por inhibidores de metilación del ADN. Bcl2A1, es una proteína anti-apoptótica y BRAF una serín-trreonín-kinasa que media la señalización de la ruta de ERK, es decir, que está implicada en señales de supervivencia, por lo que resulta complicado establecer la importancia de la regulación positiva de la expresión de ambos genes en los efectos mediados por zebularine en células T leucémicas. Por el contrario, los genes HRK y PYCARD, al igual que ocurre con LTA, sí pueden estar implicados directamente en la apoptosis inducida por zebularine en células Jurkat. El gen

HRK, codifica la proteína Harakiri ó DP5 que pertenece a la familia de Bcl-2. Es miembro de los denominados “solo-BH3-”, y se ha descrito que induce apoptosis en células B cuando son sometidas a estrés del retículo endoplasmático, interaccionando con miembros anti-apoptóticos como Bcl-2 y Bcl-xL y facilitando así la liberación de citocromo c mitocondrial. Dado que, como hemos caracterizado, decitabine y zebularine inducen apoptosis por la vía mitocondrial, el hecho de que estos inhibidores incrementen la expresión de Harakiri puede ayudar a la activación de dicha vía. También se ha demostrado su silenciamiento por hipermetilación de islas CpG en su promotor (*Nakamura et al, 2008*).

En relación con PYCARD, se sabe que este gen está silenciado en numerosos tipos de tumores (*Conway et al, 2000*), como en linfomas T cutáneos (*Zain et al, 2010*). Produce una proteína pro-apoptótica denominada ASC o TMS1 (target of methylation-induced silencing-1), que contiene un dominio PYD y un dominio CARD (reclutador de caspasas) y actúa como proteína adaptadora por interacción proteína-proteína. El promotor de TMS1 se caracteriza porque está alojado en una isla CpG no metilada en células normales, pero que aparece metilada de manera aberrante en células tumorales, provocando así el silenciamiento del gen (*Lucas et al, 2009*). Está muy expresado en células como monocitos y macrófagos, jugando un papel importante en la respuesta inmunitaria innata (*Shiohara et al, 2002; Stehlik et al, 2003*), donde se ha implicado en la activación de caspasa-1 y así en la producción de citoquinas, en la regulación de la respuesta inflamatoria y en la piroptosis, muerte celular asociada a inflamación y activación de caspasa-1 (*Fernandes-Alnemri et al, 2007; Fernandes-Alnemri et al, 2009*). TMS1 se induce en ciertos modelos tras el tratamiento con ligandos de muerte como TNF- $\alpha$  y TRAIL (*Parsons & Vertino, 2006*) y también en respuesta a la anoikis o apoptosis inducida por la pérdida de adhesión al sustrato en células de cáncer de mama (*Parsons et al, 2009*). En la apoptosis mediada por TMS1 se ha comprobado la importancia de la mitocondria, ya que esta apoptosis se inhibe en células sin caspasa-9 y además es dependiente de Bax (*Ohtsuka et al, 2004*). De nuevo, como ocurre en el caso de Harakiri, la regulación de TMS1 puede contribuir a la activación de la ruta



---

mitochondrial de apoptosis en respuesta al tratamiento con los inhibidores de DNMTs. En cualquier caso, es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos del array son preliminares, de manera que habría que confirmar la regulación de la expresión de los genes encontrados, así como la de las proteínas codificadas por dichos genes, y demostrar si se encuentran metilados en nuestro modelo de células T leucémicas.

Finalmente, en lo que se refiere a TP53, aunque aparece regulado positivamente en el ensayo de PCR-Array, el gen se encuentra mutado en células Jurkat, y no observamos acumulación de la proteína tras el tratamiento con decitabine y zebularine por lo que esta regulación no va a afectar a la inducción de apoptosis.

Teniendo en cuenta los múltiples mecanismos que interactúan en el silenciamiento de genes, cabe pensar que la combinación de distintas drogas que afectan a dicho silenciamiento pueda dar como resultado una mejor respuesta en los pacientes con cáncer. Se ha confirmado que el uso combinado de inhibidores de DNMTs e inhibidores de HDACs, da mejores resultados que cuando se utilizan dichos inhibidores de manera individual (*Gore et al, 2006*), de manera que su combinación presenta efectos sinérgicos o cooperativos en la reactivación de la expresión de genes y en la inducción de apoptosis (*Klisovic et al, 2003; Walton et al, 2008; Grimwade et al, 1998; Luszczyk et al, 2010*). Esta cooperación entre ambos tipos de drogas no se debe exclusivamente a los efectos que ellas tienen sobre las modificaciones epigenéticas sino que también se ha descrito un efecto sinérgico en relación con su capacidad para inducir daño al ADN (*Luszczyk et al, 2010; Chai et al, 2008*)

Nuestros resultados demuestran que la combinación de decitabine y zebularine con los HDACi apicidina y butirato, induce apoptosis en células T leucémicas, siendo el resultado de esta combinación la suma de los efectos de los distintos inhibidores por separado. Sin embargo, la combinación de decitabine

con TSA y MS-275 origina una cierta potenciación en la inducción de apoptosis. Igual ocurre cuando se combina zebularine con ambos inhibidores de HDAC, aunque el efecto sinérgico observado en este caso es un poco más leve. Inhibidores de HDAC pertenecientes a diferentes categorías estructurales presentan diferente capacidad de inhibición sobre distintas HDACs. Esto puede explicar las diferencias observadas en la respuesta a la combinación de decitabine y zebularine con los diferentes HDACi. Igualmente, observamos efectos diversos en la parada del ciclo celular en G2/M en respuesta al tratamiento con los diferentes HDACi en células Jurkat, de modo que solo el MS-275 induce parada significativa en dicha fase del ciclo celular (*Beamish et al, 2004*), a pesar de que, curiosamente, reduce la inducida por decitabine tras el tratamiento combinado con ambos fármacos. Este último efecto puede explicarse en base al posible sinergismo a nivel de daño al ADN, de modo que un mayor daño podría provocar una activación mayor de las señales de apoptosis que de las señales y moléculas implicadas en reparación, entre las que se encuentran las que provocan la parada del ciclo celular para permitir dicha reparación. Sería interesante analizar el daño al ADN y la respuesta a dicho daño en células tratadas simultáneamente con inhibidores de DNMTs y HDACi, y profundizar en el mecanismo implicado en el sinergismo observado entre ambos tipos de inhibidores.

En cuanto a la combinación de decitabine con el inhibidor de PI3K, LY-294002, no observamos ningún efecto significativo en la inducción de apoptosis tras 48 horas de tratamiento pero sí cuando analizamos la muerte celular a las 24 horas, lo que sugiere que la inhibición de PI3K facilita o acelera el efecto inductor de apoptosis de los inhibidores de metilación en etapas tempranas. También hay que resaltar que el LY-294002 por si sólo no afecta al ciclo celular pero rescata completamente a las células de la parada en G2 inducida por decitabine, lo que puede contribuir a una menor reparación del ADN dañado y así al mayor efecto observado en la inducción de apoptosis.

Dado que los agentes desmetilantes decitabine y zebularine inducen apoptosis, inhibición del crecimiento y en algunos casos parada de ciclo, nos ha

---

parecido interesante analizar el efecto de la combinación de estos inhibidores de DNMTs con inhibidores de las rutas de MAPKs, relacionadas con supervivencia celular, proliferación, parada de ciclo, diferenciación, apoptosis y migración. Estas rutas aparecen frecuentemente alteradas en tumores y en concreto la vía de ERK1/2 se encuentra hiperactivada en un porcentaje considerable de leucemias (*Platanias, 2003*). Precisamente, la vía de señalización de ERK regula la expresión de DNMTs de manera que inhibidores de dicha ruta inducen la expresión de genes silenciados por metilación mediante reducción de los niveles de DNMT1 (*Lu et al, 2007*). Por otro lado, Nishioka y colaboradores han demostrado que, cuando se combina decitabine con un inhibidor de MEK (AZD6244) en líneas celulares de leucemia promielocítica se potencia la acción del decitabine en la inducción de apoptosis y en la regulación de p21. Este efecto potenciador se debe, entre otros mecanismos, a que el inhibidor de MEK incrementa el daño al ADN inducido por decitabine (*Nishioka et al, 2009*). Nosotros hemos demostrado que, en nuestro modelo de células leucémicas T, el tratamiento combinado con PD-98059 potencia la apoptosis inducida por zebularine aunque no por decitabine. Dado que el zebularine está descrito como un inhibidor menos potente de metilación del ADN que el decitabine, es posible que una disminución en la expresión de DNMT, inducida por el inhibidor de MEK, favorezca de forma significativa la acción del zebularine, mientras que no afecte a la acción del decitabine en nuestro modelo celular.

También en nuestros resultados hemos demostrado que el inhibidor de p38 SKF-86002 rescata a las células de la apoptosis inducida por decitabine y no por zebularine. Se ha descrito en la bibliografía que el decitabine activa la fosforilación de p38 MAPK en líneas celulares linfoblásticas y de mieloma, y que dicha activación de p38 media la parada en G2/M inducida por decitabine (*Lavelle et al, 2003*). Aunque en nuestro caso no hemos encontrado cambios en la parada en G2/M mediada por decitabine en células coincubadas con el inhibidor de p38 (datos no mostrados), sabemos que esta quinasa induce una gran variedad de efectos biológicos, entre ellos la muerte celular por apoptosis. Diferentes drogas quimioterapéuticas inducen apoptosis de manera dependiente

de p38, observándose un bloqueo de la apoptosis en presencia de inhibidores de esta quinasa (*Deacon et al, 2003*).

Al igual que ocurre con los resultados de la combinación con el inhibidor de MEK, estos datos son muy interesantes ya que sugieren diferencias importantes en el mecanismo de acción de decitabine y zebularine. Son sólo resultados preliminares y tenemos que profundizar en un futuro en el estudio de los efectos de estas combinaciones, ya que nos van a dar información muy importante sobre dicho mecanismo de acción y además nos pueden guiar para proponer combinaciones de fármacos más efectivas en el tratamiento de la leucemia de células T.

La leucemia aguda es una enfermedad maligna caracterizada por una proliferación clonal de precursores mieloides o linfoides. Es el tipo de leucemia más común en la infancia y en la adolescencia. Actualmente la probabilidad de curar esta enfermedad está alrededor de un 80% en el caso de leucemia linfoblástica aguda (LLA) y de un 50% en el caso de leucemia mieloide aguda (LMA) (*Masetti et al, 2011*). Sin embargo, un 20% de los casos de LLA y LMA presentan recaídas, y estos pacientes tienen un peor pronóstico clínico (*Abrahamsson et al, 2007; Tallen et al, 2010*). Además, en numerosas ocasiones los enfermos presentan serios efectos secundarios debido a estar sometidos a una quimioterapia muy intensa. Por eso, es interesante encontrar nuevas estrategias terapéuticas que disminuyan los efectos secundarios y tengan más especificidad sobre las células tumorales.

Dentro del grupo de fármacos que se utilizan actualmente en el tratamiento de la leucemia se encuentran los análogos de citosinas como la citarabina, antibióticos antineoplásicos como la daunorrubicina y la doxorrubicina, inhibidores de la síntesis del ADN como el metotrexato y otras drogas que paran el crecimiento celular. De todos los tipos de tumores hematológicos existentes, en los únicos donde se ha aprobado el uso de inhibidores de DNMTs son los síndromes mielodisplásicos, donde se usa el decitabine (Dacogen) y la

---

azacitidina. Además existen numerosos ensayos clínicos para el posible uso del decitabine en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y los resultados que se están obteniendo son esperanzadores. Nosotros hemos analizado una muestra de un paciente con este tipo de leucemia en la que encontramos una leve inducción de apoptosis con la dosis más baja de decitabine, lo que puede deberse a que en este modelo sea más importante la acción desmetilante de esta droga, mayor a dosis bajas, que su efecto inductor de daño al ADN, mayor a dosis más elevadas. Además, llama la atención que el tratamiento simultáneo con TRAIL reduce el efecto de decitabine, lo que podría responder a una activación de NF- $\kappa$ B por TRAIL, y así a la inducción de señales de supervivencia, como ya se ha descrito en otros tipos tumorales (*Franco et al, 2001*).

En un intento de aproximación a la posible utilización de los inhibidores de DNMTs en el tratamiento de la leucemia de células T, hemos analizado el efecto de decitabine y zebularine en células primarias de distintos pacientes con esta patología. Los resultados obtenidos sugieren que el zebularine es más efectivo que el decitabine en el tratamiento de leucemias T, mostrando un efecto dosis-dependiente. En la muestra en la que determinamos los niveles de algunas proteínas relacionadas con la acción de estos agentes desmetilantes hemos encontrado una reducción de c-IAP2 similar a la observada en las líneas celulares, que demuestra la consistencia en la regulación de esta proteína en nuestro modelo. Además, no encontramos cambios en los niveles de p53, lo que sugiere que esta leucemia primaria también presenta p53 mutado y confirma la capacidad de decitabine y especialmente de zebularine para inducir apoptosis en células con p53 no funcional. Por otro lado, no encontramos potenciación en la inducción de apoptosis cuando estas drogas se combinan con TRAIL en leucemias T primarias, aunque tampoco hay inhibición a diferencia de lo observado en la muestra de leucemia mieloide. La combinación de TRAIL con dosis elevadas de zebularine da como resultado un efecto aditivo que conlleva a una inducción de apoptosis muy significativa en la muestra analizada, lo que sugiere la eficacia de esta combinación como estrategia terapéutica en nuestro modelo celular.

Es importante tener en cuenta que estas drogas necesitan que las células estén proliferando para poder incorporarse al ADN y ejercer su mecanismo de acción. No conocemos con exactitud el grado de proliferación en cultivo de las células de leucemia primaria que hemos analizado y esto podría afectar a los resultados obtenidos. Sería interesante realizar tratamientos a tiempos más largos y determinar el porcentaje de células apoptóticas al mismo tiempo que el ritmo o la velocidad de proliferación, para obtener resultados más concluyentes.

En cuanto a las muestras analizadas de leucemia de tipo B, tanto los resultados con las células primarias como los obtenidos con las líneas celulares sugieren que este modelo es menos sensible a la acción de los inhibidores de metilación del ADN que las leucemias de células T.

Con todos los resultados obtenidos en este trabajo, podemos decir que decitabine y zebularine inducen apoptosis en líneas tumorales T leucémicas, aunque el efecto observado en muestras de leucemias primarias es menor, por lo que es necesario pensar en tratamientos combinados de estas drogas con otras drogas quimioterapéuticas, para así conseguir una mayor inducción de apoptosis, ya sea mediante suma de efectos de los agentes combinados, o bien por una potenciación de dichos efectos. En cualquiera de los casos, la estrategia de terapia combinada va a permitir utilizar concentraciones más bajas de cada uno de los estímulos apoptóticos que por tanto presentarán menores efectos adversos o tóxicos sobre las células normales.

## ***V. CONCLUSIONES***





1.- Los inhibidores de metilación análogos de nucleósidos decitabine y zebularine inducen apoptosis dependiente de caspasas e independiente de p53 en células T leucémicas, sin ejercer toxicidad sobre linfocitos T normales.

2.- La activación de señales mitocondriales y la producción de especies reactivas de oxígeno son necesarias para la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine en células T leucémicas.

3.- Decitabine y zebularine inducen daño en el ADN y activación de la respuesta a dicho daño de forma paralela a la inducción de apoptosis en células T leucémicas. También inducen cambios en la expresión de proteínas relacionadas con apoptosis, siendo dichos cambios apreciables con cierta posterioridad a la señalización de apoptosis.

4.- Inhibidores de HDAC, PI3K, MEK y p38MAPK pueden modular los efectos de decitabine y/o zebularine en células T leucémicas.

5.- El mecanismo de acción de decitabine y zebularine no es idéntico. Ambos inhibidores muestran diferencias en su capacidad para inducir parada del ciclo celular; en su cinética y eficiencia para inducir apoptosis en células T leucémicas y activar proteínas implicadas en la respuesta al daño al ADN; y en sus efectos cuando se combinan con inhibidores de MEK y de p38MAPK.



## ***VII. BIBLIOGRAFÍA***



- Aapola U, Liiv I, Peterson P (2002) Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. *Nucleic Acids Res* **30**(16): 3602-3608
- Abele R, Clavel M, Dodion P, Brunsch U, Gundersen S, Smyth J, Renard J, van Glabbeke M, Pinedo HM (1987) The EORTC Early Clinical Trials Cooperative Group experience with 5-aza-2'-deoxycytidine (NSC 127716) in patients with colo-rectal, head and neck, renal carcinomas and malignant melanomas. *Eur J Cancer Clin Oncol* **23**(12): 1921-1924
- Abrahamsson J, Clausen N, Gustafsson G, Hovi L, Jonmundsson G, Zeller B, Forestier E, Heldrup J, Hasle H (2007) Improved outcome after relapse in children with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **136**(2): 229-236
- Almasan A, Ashkenazi A (2003) Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**(3-4): 337-348
- Alladina SJ, Song JH, Davidge ST, Hao C, Easton AS (2005) TRAIL-induced apoptosis in human vascular endothelium is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt through the short form of cellular FLIP and Bcl-2. *J Vasc Res* **42**(4): 337-347
- Amato RJ (2007) Inhibition of DNA methylation by antisense oligonucleotide MG98 as cancer therapy. *Clin Genitourin Cancer* **5**(7): 422-426
- Ammanamanchi S, Brattain MG (2004) Restoration of transforming growth factor-beta signaling through receptor RI induction by histone deacetylase activity inhibition in breast cancer cells. *J Biol Chem* **279**(31): 32620-32625
- Antequera F, Bird A (1993) CpG islands. *EXS* **64**: 169-185
- Aoki K, Meng G, Suzuki K, Takashi T, Kameoka Y, Nakahara K, Ishida R, Kasai M (1998) RP58 associates with condensed chromatin and mediates a sequence-specific transcriptional repression. *J Biol Chem* **273**(41): 26698-26704

Aparicio A, Eads CA, Leong LA, Laird PW, Newman EM, Synold TW, Baker SD, Zhao M, Weber JS (2003) Phase I trial of continuous infusion 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol* **51**(3): 231-239

Araujo FD, Croteau S, Slack AD, Milutinovic S, Bigey P, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M, Szyf M (2001) The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus. *J Biol Chem* **276**(10): 6930-6936

Arora V, Cheung HH, Plenchette S, Micali OC, Liston P, Korneluk RG (2007) Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex. *J Biol Chem* **282**(36): 26202-26209

Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokhi Z, Schwall RH (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* **104**(2): 155-162

Auerkari EI (2006) Methylation of tumor suppressor genes p16(INK4a), p27(Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis. *Oral Oncol* **42**(1): 5-13

Bachman KE, Rountree MR, Baylin SB (2001) Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J Biol Chem* **276**(34): 32282-32287

Bae SI, Cheriya V, Jacobs BS, Reu FJ, Borden EC (2008) Reversal of methylation silencing of Apo2L/TRAIL receptor 1 (DR4) expression overcomes resistance of SK-MEL-3 and SK-MEL-28 melanoma cells to interferons (IFNs) or Apo2L/TRAIL. *Oncogene* **27**(4): 490-498

Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**(5383): 1674-1677

Bao S, Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Fang Y, Richardson DA, Ali A, Chen SM, Abraham RT, Wang XF (2001) ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature* **411**(6840): 969-974

- 
- Barlow C, Brown KD, Deng CX, Tagle DA, Wynshaw-Boris A (1997) Atm selectively regulates distinct p53-dependent cell-cycle checkpoint and apoptotic pathways. *Nat Genet* **17**(4): 453-456
- Basseres DS, Baldwin AS (2006) Nuclear factor-kappaB and inhibitor of kappaB kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* **25**(51): 6817-6830
- Baylin SB (2005) DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **2 Suppl 1**: S4-11
- Baylin SB, Herman JG (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* **16**(4): 168-174
- Beamish H, Warrener R, Gabrielli BG (2004) Analysis of checkpoint responses to histone deacetylase inhibitors. *Methods Mol Biol* **281**: 245-259
- Beisler JA, Abbasi MM, Driscoll JS (1979) Synthesis and antitumor activity of 5-azacytosine arabinoside. *J Med Chem* **22**(10): 1230-1234
- Belinsky SA (1998) Role of the cytosine DNA-methyltransferase and p16INK4a genes in the development of mouse lung tumors. *Exp Lung Res* **24**(4): 463-479
- Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **9**(16): 2395-2402
- Billam M, Sobolewski MD, Davidson NE Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **120**(3): 581-592
- Billam M, Sobolewski MD, Davidson NE (2010) Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* **120**(3): 581-592
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**(1): 6-21

Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, Ricci JE, Edris WA, Sutherlin DP, Green DR, Salvesen GS (2003) A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* **11**(2): 529-541

Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* **27**(1): 19-26

Brueckner B, Garcia Boy R, Siedlecki P, Musch T, Kliem HC, Zielenkiewicz P, Suhai S, Wiessler M, Lyko F (2005) Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Res* **65**(14): 6305-6311

Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* **21**(1): 103-107

Carrozza MJ, Utey RT, Workman JL, Cote J (2003) The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. *Trends Genet* **19**(6): 321-329

Colot V, Rossignol JL (1999) Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *Bioessays* **21**(5): 402-411

Conway KE, McConnell BB, Bowring CE, Donald CD, Warren ST, Vertino PM (2000) TMS1, a novel proapoptotic caspase recruitment domain protein, is a target of methylation-induced gene silencing in human breast cancers. *Cancer Res* **60**(22): 6236-6242

Cha SS, Sung BJ, Kim YA, Song YL, Kim HJ, Kim S, Lee MS, Oh BH (2000) Crystal structure of TRAIL-DR5 complex identifies a critical role of the unique frame insertion in conferring recognition specificity. *J Biol Chem* **275**(40): 31171-31177

Chai G, Li L, Zhou W, Wu L, Zhao Y, Wang D, Lu S, Yu Y, Wang H, McNutt MA, Hu YG, Chen Y, Yang Y, Wu X, Otterson GA, Zhu WG (2008) HDAC inhibitors act with 5-aza-2'-deoxycytidine to inhibit cell proliferation by suppressing removal of incorporated abases in lung cancer cells. *PLoS One* **3**(6): e2445



- Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L (1997) Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* **7**(6): 821-830
- Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, Jones PA, Selker EU (2003) Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst* **95**(5): 399-409
- Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, Marquez VE, Greer S, Orntoft TF, Thykjaer T, Jones PA (2004) Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell* **6**(2): 151-158
- Chuang JC, Yoo CB, Kwan JM, Li TW, Liang G, Yang AS, Jones PA (2005) Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Cancer Ther* **4**(10): 1515-1520
- Deacon K, Mistry P, Chernoff J, Blank JL, Patel R (2003) p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest. *Mol Biol Cell* **14**(5): 2071-2087
- Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin RG, Smith CA (1997) Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* **186**(7): 1165-1170
- Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003) A decade of caspases. *Oncogene* **22**(53): 8543-8567
- Deng T, Zhang Y (2009) Possible involvement of activation of P53/P21 and demethylation of RUNX 3 in the cytotoxicity against Lovo cells induced by 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Life Sci* **84**(9-10): 311-320
- Dewson G, Kratina T, Czabotar P, Day CL, Adams JM, Kluck RM (2009) Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their alpha6 helices. *Mol Cell* **36**(4): 696-703

Dote H, Cerna D, Burgan WE, Carter DJ, Cerra MA, Hollingshead MG, Camphausen K, Tofilon PJ (2005) Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by the DNA methylation inhibitor zebularine. *Clin Cancer Res* **11**(12): 4571-4579

Driscoll JS, Marquez VE, Plowman J, Liu PS, Kelley JA, Barchi JJ, Jr. (1991) Antitumor properties of 2(1H)-pyrimidinone riboside (zebularine) and its fluorinated analogues. *J Med Chem* **34**(11): 3280-3284

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**(1): 33-42

Duvic M, Talpur R, Ni X, Zhang C, Hazarika P, Kelly C, Chiao JH, Reilly JF, Ricker JL, Richon VM, Frankel SR (2007) Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood* **109**(1): 31-39

Easwaran HP, Schermelleh L, Leonhardt H, Cardoso MC (2004) Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases. *EMBO Rep* **5**(12): 1181-1186

Ehrlich M (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21**(35): 5400-5413

Elias A, Siegelin MD, Steinmuller A, von Deimling A, Lass U, Korn B, Mueller W (2009) Epigenetic silencing of death receptor 4 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in gliomas. *Clin Cancer Res* **15**(17): 5457-5465

Eramo A, Pallini R, Lotti F, Sette G, Patti M, Bartucci M, Ricci-Vitiani L, Signore M, Stassi G, Larocca LM, Crino L, Peschle C, De Maria R (2005) Inhibition of DNA methylation sensitizes glioblastoma for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated destruction. *Cancer Res* **65**(24): 11469-11477

Esteller M (2000) Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer* **36**(18): 2294-2300

---

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* **61**(8): 3225-3229

Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG (1998) MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* **17**(18): 2413-2417

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**(7): 2207-2216

Fandy TE, Herman JG, Kerns P, Jiemjit A, Sugar EA, Choi SH, Yang AS, Aucott T, Dausies T, Odchimar-Reissig R, Licht J, McConnell MJ, Nasrallah C, Kim MK, Zhang W, Sun Y, Murgo A, Espinoza-Delgado I, Oteiza K, Owoeye I, Silverman LR, Gore SD, Carraway HE (2009) Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies. *Blood* **114**(13): 2764-2773

Fatemi M, Hermann A, Gowher H, Jeltsch A (2002) Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *Eur J Biochem* **269**(20): 4981-4984

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* **7**(1): 21-33

Feinberg AP, Tycko B (2004) The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* **4**(2): 143-153

Ferguson AT, Lapidus RG, Baylin SB, Davidson NE (1995) Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression. *Cancer Res* **55**(11): 2279-2283

Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, Jankowski W, Rosenberg S, Zhang J, Alnemri ES (2007) The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ* **14**(9): 1590-1604

Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, Alnemri ES (2009) AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* **458**(7237): 509-513

Follows GA, Tagoh H, Lefevre P, Hodge D, Morgan GJ, Bonifer C (2003) Epigenetic consequences of AML1-ETO action at the human c-FMS locus. *EMBO J* **22**(11): 2798-2809

Franco AV, Zhang XD, Van Berkel E, Sanders JE, Zhang XY, Thomas WD, Nguyen T, Hersey P (2001) The role of NF-kappa B in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of melanoma cells. *J Immunol* **166**(9): 5337-5345

Franklin EE, Robertson JD (2007) Requirement of Apaf-1 for mitochondrial events and the cleavage or activation of all procaspases during genotoxic stress-induced apoptosis. *Biochem J* **405**(1): 115-122

Frisch SM, Screaton RA (2001) Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* **13**(5): 555-562

Fu NY, Sukumaran SK, Kerk SY, Yu VC (2009) Baxbeta: a constitutively active human Bax isoform that is under tight regulatory control by the proteasomal degradation mechanism. *Mol Cell* **33**(1): 15-29

Fulda S, Kufer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM (2001) Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* **20**(41): 5865-5877

Fulda S, Meyer E, Debatin KM (2002) Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* **21**(15): 2283-2294

Furukawa Y, Sutheesophon K, Wada T, Nishimura M, Saito Y, Ishii H (2005) Methylation silencing of the Apaf-1 gene in acute leukemia. *Mol Cancer Res* **3**(6): 325-334

Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Zhao Y, Robertson KD (2004) DNMT3B interacts with hSNF2H chromatin remodeling enzyme, HDACs 1 and 2, and

---

components of the histone methylation system. *Biochem Biophys Res Commun* **318**(2): 544-555

Giles FJ, Bellamy WT, Estrov Z, O'Brien SM, Verstovsek S, Ravandi F, Beran M, Bycott P, Pithavala Y, Steinfeldt H, Reich SD, List AF, Yee KW (2006) The anti-angiogenesis agent, AG-013736, has minimal activity in elderly patients with poor prognosis acute myeloid leukemia (AML) or myelodysplastic syndrome (MDS). *Leuk Res* **30**(7): 801-811

Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **363**: 15-23

Goffin J, Eisenhauer E (2002) DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. *Ann Oncol* **13**(11): 1699-1716

Golay J, Cuppini L, Leoni F, Mico C, Barbui V, Domenghini M, Lombardi L, Neri A, Barbui AM, Salvi A, Pozzi P, Porro G, Pagani P, Fossati G, Mascagni P, Introna M, Rambaldi A (2007) The histone deacetylase inhibitor ITF2357 has anti-leukemic activity in vitro and in vivo and inhibits IL-6 and VEGF production by stromal cells. *Leukemia* **21**(9): 1892-1900

Gollob JA, Sciambi CJ, Peterson BL, Richmond T, Thoreson M, Moran K, Dressman HK, Jelinek J, Issa JP (2006) Phase I trial of sequential low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine plus high-dose intravenous bolus interleukin-2 in patients with melanoma or renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **12**(15): 4619-4627

Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z (1994) A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* **218**(2): 314-319

Gore SD, Baylin S, Sugar E, Carraway H, Miller CB, Carducci M, Grever M, Galm O, Dausen T, Karp JE, Rudek MA, Zhao M, Smith BD, Manning J, Jiemjit A, Dover G, Mays A, Zwiebel J, Murgu A, Weng LJ, Herman JG (2006) Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res* **66**(12): 6361-6369

Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**(5684): 626-629

Griffith TS, Lynch DH (1998) TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* **10**(5): 559-563

Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* **92**(7): 2322-2333

Grotzer MA, Eggert A, Zuzak TJ, Janss AJ, Marwaha S, Wiewrodt BR, Ikegaki N, Brodeur GM, Phillips PC (2000) Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene* **19**(40): 4604-4610

Gruss HJ, Dower SK (1995) Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* **85**(12): 3378-3404

Gupta A, Godwin AK, Vanderveer L, Lu A, Liu J (2003) Hypomethylation of the synuclein gamma gene CpG island promotes its aberrant expression in breast carcinoma and ovarian carcinoma. *Cancer Res* **63**(3): 664-673

Hanafusa T, Yumoto Y, Nouse K, Nakatsukasa H, Onishi T, Fujikawa T, Taniyama M, Nakamura S, Uemura M, Takuma Y, Yumoto E, Higashi T, Tsuji T (2002) Reduced expression of insulin-like growth factor binding protein-3 and its promoter hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* **176**(2): 149-158

Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, Gartler SM (1999) The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14412-14417

Harms K, Nozell S, Chen X (2004) The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci* **61**(7-8): 822-842

- 
- Hashimshony T, Zhang J, Keshet I, Bustin M, Cedar H (2003) The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development. *Nat Genet* **34**(2): 187-192
- Herman JG, Baylin SB (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* **349**(21): 2042-2054
- Hermann A, Gowher H, Jeltsch A (2004a) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* **61**(19-20): 2571-2587
- Hermann A, Goyal R, Jeltsch A (2004b) The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem* **279**(46): 48350-48359
- Herranz M, Martin-Caballero J, Fraga MF, Ruiz-Cabello J, Flores JM, Desco M, Marquez V, Esteller M (2006) The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of murine T-cell lymphoma. *Blood* **107**(3): 1174-1177
- Hiebert SW, Reed-Inderbitzin EF, Amann J, Irvin B, Durst K, Linggi B (2003) The t(8;21) fusion protein contacts co-repressors and histone deacetylases to repress the transcription of the p14ARF tumor suppressor. *Blood Cells Mol Dis* **30**(2): 177-183
- Hoglund A, Nilsson LM, Forshell LP, Maclean KH, Nilsson JA (2009) Myc sensitizes p53-deficient cancer cells to the DNA-damaging effects of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine. *Blood* **113**(18): 4281-4288
- Horak P, Pils D, Haller G, Pribill I, Roessler M, Tomek S, Horvat R, Zeillinger R, Zielinski C, Krainer M (2005a) Contribution of epigenetic silencing of tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand receptor 1 (DR4) to TRAIL resistance and ovarian cancer. *Mol Cancer Res* **3**(6): 335-343
- Horak P, Pils D, Roessler M, Tomek S, Elandt K, Zeillinger R, Zielinski C, Krainer M (2005b) Common death receptor 4 (DR4) polymorphisms do not predispose to ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **97**(2): 514-518

Hu E, Dul E, Sung CM, Chen Z, Kirkpatrick R, Zhang GF, Johanson K, Liu R, Lago A, Hofmann G, Macarron R, de los Frailes M, Perez P, Krawiec J, Winkler J, Jaye M (2003) Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. *J Pharmacol Exp Ther* **307**(2): 720-728

Hu S, Vincenz C, Ni J, Gentz R, Dixit VM (1997) I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* **272**(28): 17255-17257

Hung MS, Karthikeyan N, Huang B, Koo HC, Kiger J, Shen CJ (1999) Drosophila proteins related to vertebrate DNA (5-cytosine) methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(21): 11940-11945

Issa JP (2004) CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**(12): 988-993

Issa JP, Byrd JC (2005) Decitabine in chronic leukemias. *Semin Hematol* **42**(3 Suppl 2): S43-49

Issa JP, Gharibyan V, Cortes J, Jelinek J, Morris G, Verstovsek S, Talpaz M, Garcia-Manero G, Kantarjian HM (2005) Phase II study of low-dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib mesylate. *J Clin Oncol* **23**(17): 3948-3956

Jabbour E, Issa JP, Garcia-Manero G, Kantarjian H (2008) Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies. *Cancer* **112**(11): 2341-2351

Jiemjit A, Fandy TE, Carraway H, Bailey KA, Baylin S, Herman JG, Gore SD (2008) p21(WAF1/CIP1) induction by 5-azacytosine nucleosides requires DNA damage. *Oncogene* **27**(25): 3615-3623

Johnson CA, Turner BM (1999) Histone deacetylases: complex transducers of nuclear signals. *Semin Cell Dev Biol* **10**(2): 179-188

Johnstone RW (2002) Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* **1**(4): 287-299



- 
- Jones PA (2002) DNA methylation and cancer. *Oncogene* **21**(35): 5358-5360
- Jones PA, Taylor SM (1980) Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* **20**(1): 85-93
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**(6828): 549-554
- Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J (1998) Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* **8**(18): 1001-1008
- Karpf AR, Moore BC, Ririe TO, Jones DA (2001) Activation of the p53 DNA damage response pathway after inhibition of DNA methyltransferase by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Mol Pharmacol* **59**(4): 751-757
- Katzenellenbogen RA, Baylin SB, Herman JG (1999) Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood* **93**(12): 4347-4353
- Kelley SK, Harris LA, Xie D, Deforge L, Totpal K, Bussiere J, Fox JA (2001) Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. *J Pharmacol Exp Ther* **299**(1): 31-38
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**(4): 239-257
- Khan R, Schmidt-Mende J, Karimi M, Gogvadze V, Hassan M, Ekstrom TJ, Zhivotovsky B, Hellstrom-Lindberg E (2008) Hypomethylation and apoptosis in 5-azacytidine-treated myeloid cells. *Exp Hematol* **36**(2): 149-157
- Kim TY, Bang YJ, Robertson KD (2006) Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. *Epigenetics* **1**(1): 14-23

Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* **12**(6): 611-620

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**(4): 403-407

Klisovic MI, Maghraby EA, Parthun MR, Guimond M, Sklenar AR, Whitman SP, Chan KK, Murphy T, Anon J, Archer KJ, Rush LJ, Plass C, Grever MR, Byrd JC, Marcucci G (2003) Depsipeptide (FR 901228) promotes histone acetylation, gene transcription, apoptosis and its activity is enhanced by DNA methyltransferase inhibitors in AML1/ETO-positive leukemic cells. *Leukemia* **17**(2): 350-358

Klose RJ, Bird AP (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* **31**(2): 89-97

Kramer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzl T, Gottlicher M (2003) The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J* **22**(13): 3411-3420

Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S (2001) Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **276**(23): 20633-20640

Kuendgen A, Lubbert M (2008) Current status of epigenetic treatment in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* **87**(8): 601-611

Kuendgen A, Strupp C, Aivado M, Bernhardt A, Hildebrandt B, Haas R, Germing U, Gattermann N (2004) Treatment of myelodysplastic syndromes with valproic acid alone or in combination with all-trans retinoic acid. *Blood* **104**(5): 1266-1269

Lamhamedi-Cherradi SE, Zheng SJ, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH (2003) Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL<sup>-/-</sup> mice. *Nat Immunol* **4**(3): 255-260

- 
- Lavelle D, DeSimone J, Hankewych M, Kousnetzova T, Chen YH (2003) Decitabine induces cell cycle arrest at the G1 phase via p21(WAF1) and the G2/M phase via the p38 MAP kinase pathway. *Leuk Res* **27**(11): 999-1007
- Leibowitz B, Yu J (2010) Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther* **9**(6): 417-422
- Li E (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* **3**(9): 662-673
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**(5308): 1943-1947
- Li Q, Ahuja N, Burger PC, Issa JP (1999) Methylation and silencing of the Thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene* **18**(21): 3284-3289
- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA (2002) Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* **22**(2): 480-491
- Lindsten T, Ross AJ, King A, Zong WX, Rathmell JC, Shiels HA, Ulrich E, Waymire KG, Mahar P, Frauwirth K, Chen Y, Wei M, Eng VM, Adelman DM, Simon MC, Ma A, Golden JA, Evan G, Korsmeyer SJ, MacGregor GR, Thompson CB (2000) The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* **6**(6): 1389-1399
- Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig CG, McBurney MW, Korneluk RG (2001) Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol* **3**(2): 128-133
- Liu S, Yu Y, Zhang M, Wang W, Cao X (2001) The involvement of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN-beta-stimulated human dendritic cells to tumor cells. *J Immunol* **166**(9): 5407-5415

Liu X, Zou H, Widlak P, Garrard W, Wang X (1999) Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J Biol Chem* **274**(20): 13836-13840

Lomonosova E, Chinnadurai G (2008) BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene* **27 Suppl 1**: S2-19

Lu R, Wang X, Chen ZF, Sun DF, Tian XQ, Fang JY (2007) Inhibition of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway decreases DNA methylation in colon cancer cells. *J Biol Chem* **282**(16): 12249-12259

Lucas ME, Crider KS, Powell DR, Kapoor-Vazirani P, Vertino PM (2009) Methylation-sensitive regulation of TMS1/ASC by the Ets factor, GA-binding protein- $\alpha$ . *J Biol Chem* **284**(22): 14698-14709

Luczak MW, Jagodzinski PP (2006) The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol* **44**(3): 143-154

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**(6648): 251-260

Lund AH, van Lohuizen M (2004) Epigenetics and cancer. *Genes Dev* **18**(19): 2315-2335

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**(4): 481-490

Luszczek W, Cheriya V, Mekhail TM, Borden EC (2010) Combinations of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors induce DNA damage in small cell lung cancer cells: correlation of resistance with IFN-stimulated gene expression. *Mol Cancer Ther* **9**(8): 2309-2321

Lyko F, Ramsahoye BH, Jaenisch R (2000) DNA methylation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **408**(6812): 538-540

- 
- Mariani SM, Krammer PH (1998) Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur J Immunol* **28**(5): 1492-1498
- Marson CM, Mahadevan T, Dines J, Sengmany S, Morrell JM, Alao JP, Joel SP, Vigushin DM, Charles Coombes R (2007) Structure-activity relationships of aryloxyalkanoic acid hydroxyamides as potent inhibitors of histone deacetylase. *Bioorg Med Chem Lett* **17**(1): 136-141
- Martinez R, Setien F, Voelter C, Casado S, Quesada MP, Schackert G, Esteller M (2007) CpG island promoter hypermethylation of the pro-apoptotic gene caspase-8 is a common hallmark of relapsed glioblastoma multiforme. *Carcinogenesis* **28**(6): 1264-1268
- Masetti R, Serravalle S, Biagi C, Pession A (2011) The Role of HDACs Inhibitors in Childhood and Adolescence Acute Leukemias. *J Biomed Biotechnol* **2011**: 148046
- Mattson MP, Kroemer G (2003) Mitochondria in cell death: novel targets for neuroprotection and cardioprotection. *Trends Mol Med* **9**(5): 196-205
- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D (1995) 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* **1**(7): 686-692
- Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasler JM, Bestor TH (1998) Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* **125**(5): 889-897
- Momparler RL, Bovenzi V (2000) DNA methylation and cancer. *J Cell Physiol* **183**(2): 145-154
- Monleon I, Martinez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasierra P, Taules M, Iturralde M, Pineiro A, Larrad L, Alava MA, Naval J, Anel A (2001) Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells. *J Immunol* **167**(12): 6736-6744

Morales JC, Ruiz-Magana MJ, Ruiz-Ruiz C (2007) Regulation of the resistance to TRAIL-induced apoptosis in human primary T lymphocytes: role of NF-kappaB inhibition. *Mol Immunol* **44**(10): 2587-2597

Moyers SB, Kumar NB (2004) Green tea polyphenols and cancer chemoprevention: multiple mechanisms and endpoints for phase II trials. *Nutr Rev* **62**(5): 204-211

Nakamura M, Shimada K, Konishi N (2008) The role of HRK gene in human cancer. *Oncogene* **27 Suppl 1**: S105-113

Nakamura N, Takenaga K (1998) Hypomethylation of the metastasis-associated S100A4 gene correlates with gene activation in human colon adenocarcinoma cell lines. *Clin Exp Metastasis* **16**(5): 471-479

Nakata S, Yoshida T, Horinaka M, Shiraishi T, Wakada M, Sakai T (2004) Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene* **23**(37): 6261-6271

Nam JS, Ino Y, Kanai Y, Sakamoto M, Hirohashi S (2004) 5-aza-2'-deoxycytidine restores the E-cadherin system in E-cadherin-silenced cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis* **21**(1): 49-56

Nieto M, Samper E, Fraga MF, Gonzalez de Buitrago G, Esteller M, Serrano M (2004) The absence of p53 is critical for the induction of apoptosis by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Oncogene* **23**(3): 735-743

Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Komatsu N, Koeffler HP, Yokoyama A (2009) Blockade of MEK signaling potentiates 5-Aza-2'-deoxycytidine-induced apoptosis and upregulation of p21(waf1) in acute myelogenous leukemia cells. *Int J Cancer* **125**(5): 1168-1176

Noyer-Weidner M, Trautner TA (1993) Methylation of DNA in prokaryotes. *EXS* **64**: 39-108

Ocker M, Schneider-Stock R (2007) Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *Int J Biochem Cell Biol* **39**(7-8): 1367-1374

- 
- Ohtsuka T, Ryu H, Minamishima YA, Macip S, Sagara J, Nakayama KI, Aaronson SA, Lee SW (2004) ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. *Nat Cell Biol* **6**(2): 121-128
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**(3): 247-257
- Okano M, Xie S, Li E (1998) Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* **26**(11): 2536-2540
- Pakneshan P, Xing RH, Rabbani SA (2003) Methylation status of uPA promoter as a molecular mechanism regulating prostate cancer invasion and growth in vitro and in vivo. *FASEB J* **17**(9): 1081-1088
- Palii SS, Van Emburgh BO, Sankpal UT, Brown KD, Robertson KD (2008) DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol* **28**(2): 752-771
- Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM (1997a) An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* **277**(5327): 815-818
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM (1997b) The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **276**(5309): 111-113
- Park JW, Yoon JY, Kim YJ, Kyung SY, Lee SP, Jeong SH, Moon C (2010) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibition attenuates cigarette smoke extract (CSE) induced-death inducing signaling complex (DISC) formation in human lung fibroblasts (MRC-5) cells. *J Toxicol Sci* **35**(1): 33-39
- Park OJ, Surh YJ (2004) Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies. *Toxicol Lett* **150**(1): 43-56

Parsons MJ, Patel P, Brat DJ, Colbert L, Vertino PM (2009) Silencing of TMS1/ASC promotes resistance to anoikis in breast epithelial cells. *Cancer Res* **69**(5): 1706-1711

Parsons MJ, Vertino PM (2006) Dual role of TMS1/ASC in death receptor signaling. *Oncogene* **25**(52): 6948-6958

Patel K, Dickson J, Din S, Macleod K, Jodrell D, Ramsahoye B Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acids Res* **38**(13): 4313-4324

Patel K, Dickson J, Din S, Macleod K, Jodrell D, Ramsahoye B (2010) Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acids Res* **38**(13): 4313-4324

Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A (2004) Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol* **24**(1): 306-319

Perlman H, Pagliari LJ, Nguyen N, Bradley K, Liu H, Pope RM (2001) The Fas-FasL death receptor and PI3K pathways independently regulate monocyte homeostasis. *Eur J Immunol* **31**(8): 2421-2430

Piekarz RL, Sackett DL, Bates SE (2007) Histone deacetylase inhibitors and demethylating agents: clinical development of histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. *Cancer J* **13**(1): 30-39

Pinto A, Attadia V, Fusco A, Ferrara F, Spada OA, Di Fiore PP (1984) 5-Aza-2'-deoxycytidine induces terminal differentiation of leukemic blasts from patients with acute myeloid leukemias. *Blood* **64**(4): 922-929

Pistritto G, Jost M, Srinivasula SM, Baffa R, Poyet JL, Kari C, Lazebnik Y, Rodeck U, Alnemri ES (2002) Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia. *Cell Death Differ* **9**(9): 995-1006

Platanias LC (2003) Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* **101**(12): 4667-4679



- 
- Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, Kaye SB, Brown R (2000) Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* **60**(21): 6039-6044
- Posfai J, Bhagwat AS, Posfai G, Roberts RJ (1989) Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Res* **17**(7): 2421-2435
- Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* **274**(46): 33002-33010
- Pradhan S, Esteve PO (2003) Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. *Clin Immunol* **109**(1): 6-16
- Pulukuri SM, Rao JS (2005) Activation of p53/p21Waf1/Cip1 pathway by 5-aza-2'-deoxycytidine inhibits cell proliferation, induces pro-apoptotic genes and mitogen-activated protein kinases in human prostate cancer cells. *Int J Oncol* **26**(4): 863-871
- Qin T, Jelinek J, Si J, Shu J, Issa JP (2009) Mechanisms of resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in human cancer cell lines. *Blood* **113**(3): 659-667
- Razin A (1998) CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J* **17**(17): 4905-4908
- Reed JC (1996) A day in the life of the Bcl-2 protein: does the turnover rate of Bcl-2 serve as a biological clock for cellular lifespan regulation? *Leuk Res* **20**(2): 109-111
- Ricci JE, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, Scheffler IE, Ellisman MH, Green DR (2004) Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* **117**(6): 773-786
- Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA (2000) Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 10014-10019
- Robertson AK, Geiman TM, Sankpal UT, Hager GL, Robertson KD (2004) Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA

methyltransferases DNMT1 and Dnmt3a in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **322**(1): 110-118

Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Downward J (1996) Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. *EMBO J* **15**(10): 2442-2451

Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**: 81-120

Sakajiri S, Kumagai T, Kawamata N, Saitoh T, Said JW, Koeffler HP (2005) Histone deacetylase inhibitors profoundly decrease proliferation of human lymphoid cancer cell lines. *Exp Hematol* **33**(1): 53-61

Salvesen GS (1999) Caspase 8: igniting the death machine. *Structure* **7**(10): R225-229

Samraj AK, Sohn D, Schulze-Osthoff K, Schmitz I (2007) Loss of caspase-9 reveals its essential role for caspase-2 activation and mitochondrial membrane depolarization. *Mol Biol Cell* **18**(1): 84-93

Santi DV, Norment A, Garrett CE (1984) Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(22): 6993-6997

Santini V, Gozzini A, Ferrari G (2007) Histone deacetylase inhibitors: molecular and biological activity as a premise to clinical application. *Curr Drug Metab* **8**(4): 383-393

Santini V, Gozzini A, Scappini B, Grossi A, Rossi Ferrini P (2001) Searching for the magic bullet against cancer: the butyrate saga. *Leuk Lymphoma* **42**(3): 275-289

Sasaki M, Dharia A, Oh BR, Tanaka Y, Fujimoto S, Dahiya R (2001) Progesterone receptor B gene inactivation and CpG hypermethylation in human uterine endometrial cancer. *Cancer Res* **61**(1): 97-102

Sato N, Maehara N, Su GH, Goggins M (2003) Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. *J Natl Cancer Inst* **95**(4): 327-330

---

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* **17**(6): 1675-1687

Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ (2004) The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* **4**: 1

Scott SA, Lakshimikuttysamma A, Sheridan DP, Sanche SE, Geyer CR, DeCoteau JF (2007) Zebularine inhibits human acute myeloid leukemia cell growth in vitro in association with p15INK4B demethylation and reexpression. *Exp Hematol* **35**(2): 263-273

Schmelz K, Wagner M, Dorken B, Tamm I (2005) 5-Aza-2'-deoxycytidine induces p21WAF expression by demethylation of p73 leading to p53-independent apoptosis in myeloid leukemia. *Int J Cancer* **114**(5): 683-695

Sebolt-Leopold JS (2000) Development of anticancer drugs targeting the MAP kinase pathway. *Oncogene* **19**(56): 6594-6599

Secchiero P, Zerbinati C, Rimondi E, Corallini F, Milani D, Grill V, Forti G, Capitani S, Zauli G (2004) TRAIL promotes the survival, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cell Mol Life Sci* **61**(15): 1965-1974

Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, Mendez R, Traversari C, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2001) Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer* **94**(2): 243-251

Sharma D, Saxena NK, Davidson NE, Vertino PM (2006) Restoration of tamoxifen sensitivity in estrogen receptor-negative breast cancer cells: tamoxifen-bound reactivated ER recruits distinctive corepressor complexes. *Cancer Res* **66**(12): 6370-6378

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**(6735): 483-487

Shiohara M, Taniguchi S, Masumoto J, Yasui K, Koike K, Komiyama A, Sagara J (2002) ASC, which is composed of a PYD and a CARD, is up-regulated by inflammation and apoptosis in human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* **293**(5): 1314-1318

Sigalotti L, Fratta E, Coral S, Cortini E, Covre A, Nicolay HJ, Anzalone L, Pezzani L, Di Giacomo AM, Fonsatti E, Colizzi F, Altomonte M, Calabro L, Maio M (2007) Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: biomolecular aspects and clinical applications. *J Cell Physiol* **212**(2): 330-344

Singh RK, Varney ML, Buyukberber S, Ino K, Ageitos AG, Reed E, Tarantolo S, Talmadge JE (1999) Fas-FasL-mediated CD4+ T-cell apoptosis following stem cell transplantation. *Cancer Res* **59**(13): 3107-3111

Sirchia SM, Ren M, Pili R, Sironi E, Somenzi G, Ghidoni R, Toma S, Nicolo G, Sacchi N (2002) Endogenous reactivation of the RARbeta2 tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer. *Cancer Res* **62**(9): 2455-2461

Soengas MS, Capodieci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW (2001) Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* **409**(6817): 207-211

Spotswood HT, Turner BM (2002) An increasingly complex code. *J Clin Invest* **110**(5): 577-582

Stehlik C, Lee SH, Dorfleutner A, Stassinopoulos A, Sagara J, Reed JC (2003) Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain is a regulator of procaspase-1 activation. *J Immunol* **171**(11): 6154-6163

Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F (2006) Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res* **66**(5): 2794-2800

Stumpel DJ, Schneider P, van Roon EH, Boer JM, de Lorenzo P, Valsecchi MG, de Menezes RX, Pieters R, Stam RW (2009) Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options. *Blood* **114**(27): 5490-5498

---

Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**(3): 613-621

Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K (2002) Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* **195**(2): 161-169

Tallen G, Ratei R, Mann G, Kaspers G, Niggli F, Karachunsky A, Ebell W, Escherich G, Schrappe M, Klingebiel T, Fengler R, Henze G, von Stackelberg A (2010) Long-term outcome in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia after time-point and site-of-relapse stratification and intensified short-course multidrug chemotherapy: results of trial ALL-REZ BFM 90. *J Clin Oncol* **28**(14): 2339-2347

Tang X, Wu W, Sun SY, Wistuba, II, Hong WK, Mao L (2004) Hypermethylation of the death-associated protein kinase promoter attenuates the sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Res* **2**(12): 685-691

Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**(6624): 517-521

Ting AH, Jair KW, Suzuki H, Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE (2004) Mammalian DNA methyltransferase 1: inspiration for new directions. *Cell Cycle* **3**(8): 1024-1026

Toyooka KO, Toyooka S, Virmani AK, Sathyanarayana UG, Euhus DM, Gilcrease M, Minna JD, Gazdar AF (2001) Loss of expression and aberrant methylation of the CDH13 (H-cadherin) gene in breast and lung carcinomas. *Cancer Res* **61**(11): 4556-4560

Tschopp J, Martinon F, Hofmann K (1999) Apoptosis: Silencing the death receptors. *Curr Biol* **9**(10): R381-384

Tweedie S, Charlton J, Clark V, Bird A (1997) Methylation of genomes and genes at the invertebrate-vertebrate boundary. *Mol Cell Biol* **17**(3): 1469-1475

Valdez BC, Li Y, Murray D, Corn P, Champlin RE, Andersson BS (2010) 5-Aza-2'-deoxycytidine sensitizes busulfan-resistant myeloid leukemia cells by regulating expression of genes involved in cell cycle checkpoint and apoptosis. *Leuk Res* **34**(3): 364-372

Vilgelm A, El-Rifai W, Zaika A (2008) Therapeutic prospects for p73 and p63: rising from the shadow of p53. *Drug Resist Updat* **11**(4-5): 152-163

Villa R, De Santis F, Gutierrez A, Minucci S, Pelicci PG, Di Croce L (2004) Epigenetic gene silencing in acute promyelocytic leukemia. *Biochem Pharmacol* **68**(6): 1247-1254

Wagner EF, Nebreda AR (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* **9**(8): 537-549

Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch CT (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* **16**(17): 5386-5397

Walton TJ, Li G, Seth R, McArdle SE, Bishop MC, Rees RC (2008) DNA demethylation and histone deacetylation inhibition co-operate to re-express estrogen receptor beta and induce apoptosis in prostate cancer cell-lines. *Prostate* **68**(2): 210-222

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**(49): 7598-7604

Wang KY, James Shen CK (2004) DNA methyltransferase Dnmt1 and mismatch repair. *Oncogene* **23**(47): 7898-7902

Wang W, Huper G, Guo Y, Murphy SK, Olson JA, Jr., Marks JR (2005) Analysis of methylation-sensitive transcriptome identifies GADD45a as a frequently methylated gene in breast cancer. *Oncogene* **24**(16): 2705-2714

Waterhouse NJ, Goldstein JC, von Ahsen O, Schuler M, Newmeyer DD, Green DR (2001) Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol* **153**(2): 319-328

- 
- Weber J, Salgaller M, Samid D, Johnson B, Herlyn M, Lassam N, Treisman J, Rosenberg SA (1994) Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* **54**(7): 1766-1771
- Wei M, Grushko TA, Dignam J, Hagos F, Nanda R, Sveen L, Xu J, Fackenthal J, Tretiakova M, Das S, Olopade OI (2005) BRCA1 promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced BRCA1 copy number and chromosome 17 aneusomy. *Cancer Res* **65**(23): 10692-10699
- Wijermans P, Lubbert M, Verhoef G, Bosly A, Ravoet C, Andre M, Ferrant A (2000) Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol* **18**(5): 956-962
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, et al. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3**(6): 673-682
- Wolf BB, Green DR (1999) Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* **274**(29): 20049-20052
- Wright CW, Means JC, Penabaz T, Clem RJ (2005) The baculovirus anti-apoptotic protein Op-IAP does not inhibit Drosophila caspases or apoptosis in Drosophila S2 cells and instead sensitizes S2 cells to virus-induced apoptosis. *Virology* **335**(1): 61-71
- Wu JC, Santi DV (1987) Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *J Biol Chem* **262**(10): 4778-4786
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**: 251-306
- Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E (1999) Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* **236**(1): 87-95

Xu J, Zhou JY, Tainsky MA, Wu GS (2007) Evidence that tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induction by 5-Aza-2'-deoxycytidine sensitizes human breast cancer cells to adriamycin. *Cancer Res* **67**(3): 1203-1211

Yan P, Qu Z, Ishikawa C, Mori N, Xiao G (2009) Human T-cell leukemia virus type I-mediated repression of PDZ-LIM domain-containing protein 2 involves DNA methylation but independent of the viral oncoprotein tax. *Neoplasia* **11**(10): 1036-1041

Yang R, Xu D, Zhang A, Gruber A (2001a) Immature dendritic cells kill ovarian carcinoma cells by a FAS/FASL pathway, enabling them to sensitize tumor-specific CTLs. *Int J Cancer* **94**(3): 407-413

Yang X, Thiele CJ (2003) Targeting the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand path in neuroblastoma. *Cancer Lett* **197**(1-2): 137-143

Yang X, Yan L, Davidson NE (2001b) DNA methylation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **8**(2): 115-127

Yang YL, Li XM (2000) The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* **10**(3): 169-177

Yoder JA, Soman NS, Verdine GL, Bestor TH (1997) DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J Mol Biol* **270**(3): 385-395

Yoo CB, Cheng JC, Jones PA (2004) Zebularine: a new drug for epigenetic therapy. *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 6): 910-912

Yoo CB, Jones PA (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* **5**(1): 37-50

Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* **265**(28): 17174-17179

Youssef EM, Lotan D, Issa JP, Wakasa K, Fan YH, Mao L, Hassan K, Feng L, Lee JJ, Lippman SM, Hong WK, Lotan R (2004) Hypermethylation of the retinoic acid



- receptor-beta(2) gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res* **10**(5): 1733-1742
- Yuecheng Y, Hongmei L, Xiaoyan X (2006) Clinical evaluation of E-cadherin expression and its regulation mechanism in epithelial ovarian cancer. *Clin Exp Metastasis* **23**(1): 65-74
- Zain J, Kaminetzky D, O'Connor OA (2010) Emerging role of epigenetic therapies in cutaneous T-cell lymphomas. *Expert Rev Hematol* **3**(2): 187-203
- Zauli G, Rimondi E, Nicolin V, Melloni E, Celeghini C, Secchiero P (2004) TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) blocks osteoclastic differentiation induced by RANKL plus M-CSF. *Blood* **104**(7): 2044-2050
- Zauli G, Secchiero P (2006) The role of the TRAIL/TRAIL receptors system in hematopoiesis and endothelial cell biology. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**(4): 245-257
- Zerafa N, Westwood JA, Cretney E, Mitchell S, Waring P, Iezzi M, Smyth MJ (2005) Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies. *J Immunol* **175**(9): 5586-5590
- Zhang JQ, Okumura C, McCarty T, Shin MS, Mukhopadhyay P, Hori M, Torrey TA, Naghashfar Z, Zhou JX, Lee CH, Roopenian DC, Morse HC, 3rd, Davidson WF (2004) Evidence for selective transformation of autoreactive immature plasma cells in mice deficient in FasL. *J Exp Med* **200**(11): 1467-1478
- Zhang XD, Franco AV, Nguyen T, Gray CP, Hersey P (2000) Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *J Immunol* **164**(8): 3961-3970
- Zhu WG, Hileman T, Ke Y, Wang P, Lu S, Duan W, Dai Z, Tong T, Villalona-Calero MA, Plass C, Otterson GA (2004) 5-aza-2'-deoxycytidine activates the p53/p21Waf1/Cip1 pathway to inhibit cell proliferation. *J Biol Chem* **279**(15): 15161-15166



## ***VIII. PUBLICACIONES***



# Regulation of the resistance to TRAIL-induced apoptosis in human primary T lymphocytes: Role of NF- $\kappa$ B inhibition

Jorge Carlos Morales, María José Ruiz-Magaña, Carmen Ruiz-Ruiz\*

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 3 e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Avda. de Madrid 11, 18012 Granada, Spain*

Received 17 October 2006; received in revised form 13 December 2006; accepted 14 December 2006  
Available online 25 January 2007

## Abstract

Several combined strategies have been recently proposed to overcome the resistance to tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) showed by some tumor cells, thus improving the use of this death ligand in antitumor therapy. However, the molecular mechanisms of the tumor selective activity of TRAIL are not completely understood and hence the effects of the combined therapy on normal cells are unknown. Here, we have studied the resistance of primary T lymphocytes to TRAIL-mediated apoptosis. No significant differences were found in the expression of proteins involved in TRAIL-mediated apoptosis between resting and activated T cells. The low expression of death receptors TRAIL-R1/R2 as well as the high levels of the antiapoptotic proteins TRAIL-R4 and cellular Fas-associated death domain-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme-inhibitory protein (c-FLIP) may explain the lack of caspase-8 activation observed upon TRAIL treatment in both cell types. We have also analyzed the effect of different sensitizing agents such as genotoxic drugs, phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) inhibitors, proteasome inhibitors, microtubule depolymerizing agents, histone deacetylase inhibitors (HDACi), and NF- $\kappa$ B inhibitors. Although some of them induced T cell death, only NF- $\kappa$ B inhibitors sensitized activated T cells to TRAIL-induced apoptosis, maybe through the regulation of the antiapoptotic proteins TRAIL-R4, c-FLIP<sub>s</sub> and members of the inhibitors of apoptosis proteins (IAP) family. These results question the safety of the combined treatments with TRAIL and NF- $\kappa$ B inhibitors against tumors.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Apoptosis; TRAIL; T lymphocytes; Antitumor therapy

## 1. Introduction

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/APO-2L) and CD95 ligand (CD95L or FasL/APO-1L) are type II transmembrane proteins that belong to the tumour necrosis factor (TNF) superfamily. They are potent inducers of apoptosis upon binding to their respective death domain-containing receptors, also known as death receptors (Suda et al., 1993; Wiley et al., 1995). Cytoplasmic death domains serve to recruit intracellular adapter molecules such as Fas-associated death domain protein (FADD) that in turn engage procaspase-8, thereby forming the death-inducing signalling complex (DISC). Caspase-8 is activated in the DISC allowing the initiation of a cascade of events that leads to apoptotic cell death (Chinnaiyan et al., 1995; Sprick et al., 2000). Such direct connection to the cell's death machin-

ery suggests a therapeutic potential for CD95L and TRAIL in cancer treatment. Concerning CD95L, although it can efficiently induce apoptosis in a variety of tumour cells, its administration may not be a useful strategy as it is associated with severe liver toxicity (Ogasawara et al., 1993). In contrast, TRAIL has no systemic toxicity in preclinical studies with mice and non-human primates when administered at doses that inhibit the growth of breast and colon cancer xenografts (Walczak et al., 1999).

TRAIL can bind to four specific type I membrane receptors. TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5 are death receptors, as they contain the intracellular death domain essential for transmitting the apoptotic signals (MacFarlane et al., 1997; Pan et al., 1997b; Walczak et al., 1997). TRAIL-R3/DcR1 and TRAIL-R4/DcR2 are known as antiapoptotic or decoy receptors because they do not contain an intact death domain. They act as non-functional binding partners for TRAIL, thereby attenuating its apoptotic activity (Degli-Esposti et al., 1997; MacFarlane et al., 1997; Pan et al., 1997a). TRAIL receptors appear to be ubiquitously expressed with transcripts detected in most human

\* Corresponding author. Tel.: +34 958 24 35 22; fax: +34 958 24 90 15.  
E-mail address: [mcarmenr@ugr.es](mailto:mcarmenr@ugr.es) (C. Ruiz-Ruiz).

tissues as well as in tumor cell lines of different lineages. Moreover, unlike CD95L, TRAIL is expressed constitutively and it is widely distributed in normal organs and tissues (Wiley et al., 1995), which is in relation with its lack of toxicity to normal cells. Even though a recombinant form of human TRAIL has been shown to cause apoptosis in human hepatocytes (Jo et al., 2000), more recent data have demonstrated that different recombinant versions of TRAIL vary considerably in toxicity towards normal human cells, but all of them maintain their antitumor properties (Lawrence et al., 2001).

To date, the mechanisms of TRAIL resistance in normal cells and some tumor cells are not completely understood. As regulation of TRAIL-mediated apoptosis is exerted at several stages along the signalling pathway, resistance can occur by different means. Initially, the degree of TRAIL sensitivity or resistance was proposed to be dependent on the levels of expression, localization and function of death and decoy receptors (Sheridan et al., 1997; Zhang et al., 2000). However, a correlation between cell survival and the expression of decoy or death receptors has not been conclusively demonstrated. On the other hand, several intracellular molecules can block the apoptotic effect of TRAIL. The cellular Fas-associated death domain-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme-inhibitory protein (c-FLIP) modulates the apoptotic pathway right at the beginning because it competes with caspase-8 for binding to FADD (MacFarlane et al., 2002; Siegmund et al., 2002). Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> impede the activation of the mitochondrial pathway thereby blocking the release of cytochrome *c* from mitochondria to cytosol (Ruiz de Almodovar et al., 2001). The inhibitors of apoptotic proteins XIAP, c-IAP1 and c-IAP2 act by inhibiting active caspases (Cummins et al., 2004; Li et al., 2004). The antiapoptotic signals induced by NF- $\kappa$ B (Ravi et al., 2001), protein kinase B (PKB)/Akt (Whang et al., 2004), protein kinase C (PKC) or mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Ortiz-Ferron et al., 2006; Sarker et al., 2001) have also been involved in the resistance to TRAIL-induced apoptosis of different types of cells.

Despite the controversial results about the physiological role of TRAIL *in vivo*, several studies point to a role for TRAIL in the suppression of autoimmune diseases and the immune surveillance of developing and metastatic tumors (Cretney et al., 2006). In this respect, it has been reported that TRAIL is implicated in the antitumor cytotoxicity of dendritic cells, monocytes, NK cells and even B cells (Fanger et al., 1999; Griffith et al., 1999; Kemp et al., 2004; Takeda et al., 2001). Moreover, TRAIL is induced on the surface of human T lymphocytes upon activation through the T cell antigen receptor (TCR) or treatment with type I interferons, mediating an important part of the cytotoxic activity of T cells (Dorothee et al., 2002; Kayagaki et al., 1999). The resistance of immune cells to TRAIL-induced apoptosis is essential for them to act as mediators of antitumoral response. In this work, we have investigated the mechanisms of TRAIL resistance in resting and activated primary human T lymphocytes. We have analyzed the expression of several proteins involved in the TRAIL signalling pathway, such as TRAIL receptors and components of the DISC, in both cell types. Furthermore, we have studied their susceptibility to TRAIL upon combination with agents that regulate TRAIL sensitivity in tumor cells. Our

results show that NF- $\kappa$ B inhibitors are able to sensitize primary activated T lymphocytes to TRAIL-mediated apoptosis and regulate the expression of several antiapoptotic proteins in these cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and antibodies

Human recombinant TRAIL was prepared as described previously (MacFarlane et al., 1997). Phytohemagglutinin, doxorubicin, LY294002, nocodazole, valproic acid, BAY 11-7085, sulfasalazine and mouse anti- $\alpha$ -tubulin mAb were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Velcade (bortezomib) was from Janssen-Cilag SA (Madrid, Spain). Z-VAD-FMK was provided by Bachem (Bubendorf, Switzerland). Parthenolide, CAPE, anti-cFLIP monoclonal antibody NF6 and mouse anti-human TRAIL receptor antibodies for flow cytometry studies were purchased from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Mouse anti-human CD28 and polyclonal anti-human NF- $\kappa$ B p50 antibodies were from eBioscience (San Diego, CA). Anti-human caspase-8 monoclonal antibody was purchased from Cell Diagnostica (Münster, Germany). Mouse anti-FADD was obtained from Transduction Laboratories (Lexington, KY). Monoclonal antibodies against poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), XIAP and c-IAP2 were obtained from BD Biosciences (San Jose, CA). Mouse anti-p65 was obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Monoclonal antibody anti-Bcl-2 was from Dako (Glostrup, Denmark).

### 2.2. Cells and cell culture

Blood samples were obtained from healthy donors by informed consent and collected into citrate tubes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were prepared by Ficoll–Histopaque density gradient centrifugation (Sigma–Aldrich) and adherent monocytes were depleted by culture on plastic dishes for 1 h at 37 °C. Peripheral blood T lymphocytes were then isolated by negative selection with an indirect magnetic labelling system consisting of a cocktail of biotin-conjugated antibodies against CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, and CD235a (Human Pan T Cells Isolation Kit II, Miltenyi Biotec, GmbH). Purity of T cells was >95% CD3<sup>+</sup> as determined by flow cytometry. Purified resting T lymphocytes were resuspended in RPMI 1640 medium (BioWhittaker Inc.) containing 10% fetal bovine serum, 1 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin and incubated as indicated at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air incubator. For activation, resting T cells were cultured at 2  $\times$  10<sup>6</sup> cells/ml with 5  $\mu$ g/ml PHA and 1  $\mu$ g/ml anti-CD28 for 20 h. After washing, cells were incubated in complete medium supplemented with 25 U/ml IL-2 for an additional 5 days.

The human cell lines Jurkat, CEM and SKBR3 were all maintained in culture in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum, L-glutamine, penicillin and streptomycin at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air incubator.

### 2.3. Determination of apoptotic cells

Hypodiploid apoptotic cells were detected by flow cytometry according to published procedures (Gong et al., 1994). Briefly, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed in cold 70% ethanol, and then stained with propidium iodide while treating with RNase. Quantitative analysis of sub-G<sub>1</sub> cells was carried out in a FACScan cytometer using the Cell Quest software (BD Biosciences).

### 2.4. Cytofluorometric analysis of TRAIL receptors

To detect TRAIL receptors at the cell surface, control or treated cells were incubated with primary antibodies (5 µg/ml) at 4 °C for 30 min. After washing with PBS to remove unbound primary antibody, cells were incubated with goat anti-mouse fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody (Caltag Laboratories) for 30 min at 4 °C. Cells were then washed again, resuspended in PBS and analyzed in a FACScan flow cytometer.

### 2.5. Immunoblot detection of proteins

For detection of cytosolic proteins, cells were lysed in ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 1% NP-40) for 30 min. Proteins of cytosolic supernatants were resolved on 10% SDS-PAGE gels and detected as reported previously (Ruiz-Ruiz and Lopez-Rivas, 1999).

For nuclear proteins extractions, cells were lysed with 300 µl of hypotonic buffer (10 mM HEPES, pH 7.6, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, and protease inhibitors) containing 0.6% of Nonidet P-40. Nuclei were then centrifuged and incubated in 50 µl of high salt-containing buffer (20 mM HEPES, pH 7.6, 0.4 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, and protease inhibitors) for 30 min on a rocking platform at 4 °C. Nuclei were centrifuged at 13,000 × *g* for 10 min, to get the supernatants containing the nuclear extracts. Proteins were then separated through 10% SDS-PAGE gel and detected as described (Ruiz-Ruiz and Lopez-Rivas, 1999).

### 2.6. Reverse transcription (RT)-PCR

Total RNA was extracted from T lymphocytes with Trizol Reagent (Invitrogen) as recommended by the supplier. cDNAs were synthesized from 3 µg of total RNA by using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT) primer in a total volume of 20 µl. Reverse transcription was performed at 37° for 50 min followed by 15 min at 70° for inactivation. PCR reactions were performed with 0, 1–2 µl cDNA (depending on the gene) in a 50-µl volume and using the following primer pairs (fragments size indicated in brackets): TRAIL-R1 (506 bp), forward 5'-CTGAGCAACGCAGACTCGCTGTCCAC-3' and reverse 5'-TCCAAGGACACGGCAGAGCCTGTGCCAT-3'; TRAIL-R2 (502 bp), forward 5'-GCCTCATGGACAATGAGATAAAGGTGGCT-3' and reverse 5'-CCAAATCTCAAAGTACGCACAAACGG-3'; TRAIL-R3 (612 bp), forward 5'-GA-

AGAATTTGGTGCCAATGCCACTG-3' and reverse 5'-CTC-TTGGACTTGGCTGGGAGATGTG-3'; TRAIL-R4 (453 bp), forward 5'-CTTTTCCGGCGGGCGTTCATGTCCTTC-3' and reverse 5'-GTTTCTTCCAGGCTGCTTCCCTTTGTAG-3'; c-FLIP<sub>L</sub> (227 bp), forward 5'-AATTCAAGGCTCAGAAGC-GA-3' and reverse 5'-GGCAGAACTCTGCTGTTCC-3'; c-FLIP<sub>S</sub> (100 bp), forward 5'-AATGTTCTCCAAGCAGCAATC-C-3' and reverse 5'-CCAAGAATTTTCAGATCAGACAAT-3'; Bcl-2 (367 bp), forward 5'-AGATGTCCAGCCAGCTGC-ACCTGAC-3' and reverse 5'-AGATAGGCACCAGGGTGA-GCAAGCT-3'; Bcl-x (257 bp), forward 5'-CATGGCAGCAGT-AAAGCAAGC-3' and reverse 5'-CTGCGATCCGACTCAC-CAATAC-3'; Mcl-1 (211 bp), forward 5'-CTTAGTTGAT-ATTTTGGGCTTGGG-3' and reverse 5'-AGAAGTCAAAAA-GTAGTCACTGGG-3'; XIAP (858 bp), forward 5'-GGCCA-TCTGAGACACATGCAG-3' and reverse 5'-GCATTCATA-GATCTGCAACC-3'; c-IAP1 (171 bp), forward 5'-CCAGTT-CTTTTCTACACTATAAT-3' and reverse 5'-CTTAATCTGT-TTATTTACAAGGG-3'; c-IAP2 (150 bp), forward 5'-CAAC-ATGGAGATTTCGAAATCC-3' and reverse 5'-CACATCACT-CTTCTGTGAAGGG-3'; β-actin (661 bp), forward 5'-TGAC-GGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3' and reverse 5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'. PCR cycle conditions were as follows: 1 min at 95 °C, 1 min at 55 °C and 1 min at 72 °C for TRAIL-R1, TRAIL-R2 and TRAIL-R3; 1 min at 95 °C, 1 min at 60 °C, and 1 min at 72 °C for TRAIL-R4, Bcl-2 and β-actin; 40 seg at 95 °C, 40 seg at 60 °C, and 40 seg at 72 °C for c-FLIP<sub>S</sub> and c-FLIP<sub>L</sub>; 1 min at 95 °C, 1 min at 57 °C, and 1 min at 72 °C for Bcl-x, Mcl-1, XIAP, c-IAP1 and c-IAP2. The number of cycles varied between 30 and 35, depending on the gene analyzed. The products were resolved on a 1% agarose gel and visualized with ethidium bromide.

## 3. Results

### 3.1. Resistance of resting and activated primary human T lymphocytes to TRAIL-mediated apoptosis

The resistance of different peripheral blood cell subpopulations to TRAIL-mediated cytotoxicity has recently been reported (Hasegawa et al., 2004; Mirandola et al., 2004). To further characterize the effect of TRAIL on primary human T lymphocytes we first analyzed the induction of apoptosis on resting and activated T cells from 10 different healthy donors after treatment for 24 h with 250 ng/ml recombinant TRAIL. As shown in Fig. 1A, all of the resting and activated primary T cell samples were resistant to TRAIL-induced apoptosis as assessed by sub-G<sub>1</sub> DNA content. Moreover, we did not observe any effect on primary T cell viability after incubation either for 2 days or with higher doses of TRAIL (data not shown). In this set of experiments, we used TRAIL-sensitive Jurkat cells as a positive control (Fig. 1). We also examined the activation of apical caspase-8 as it is the first biochemical event that occurs upon ligation of TRAIL receptors at the cell surface. To this end, we analyzed the processing of the procaspase into the 43–41 kDa intermediate proteolytic fragments corresponding to the cleavage of

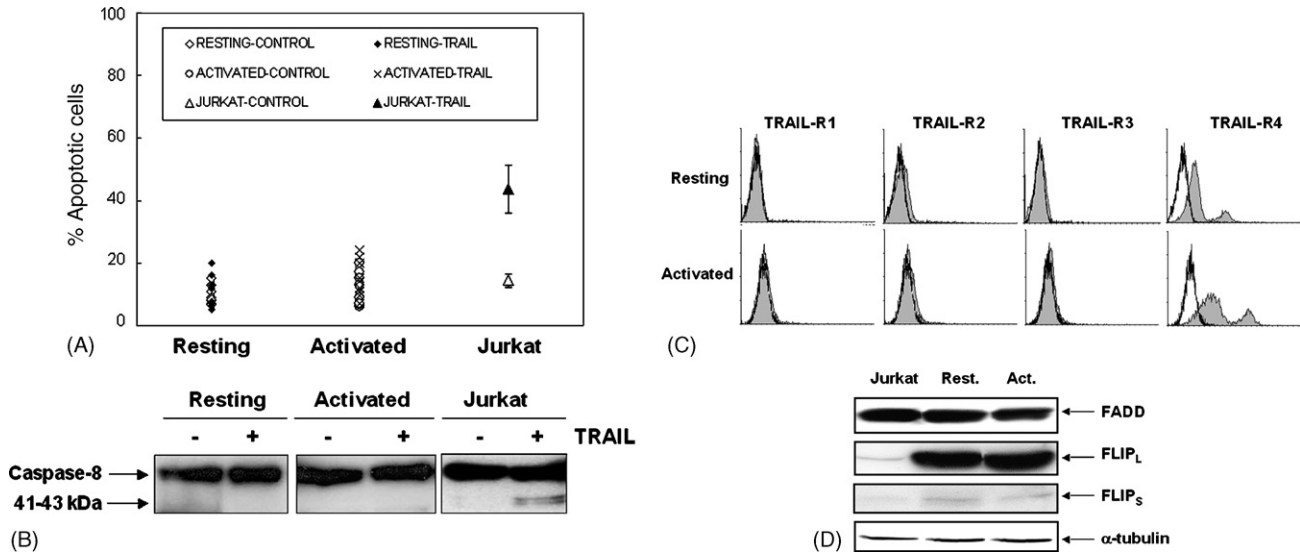


Fig. 1. Primary T cells are resistant to TRAIL-induced apoptosis. (A) Resting and activated T cells from 10 different healthy donors were treated for 24 h with 250 ng/ml recombinant TRAIL. Apoptosis was assessed by analysis of the percentage of cells with sub-G<sub>1</sub> content. (B) Resting and activated T lymphocytes were incubated for 15 h with 250 ng/ml TRAIL and caspase-8 activation was determined by Western blot as described in Section 2. As a positive control, apoptosis (A) and caspase-8 activation (B) were determined in Jurkat T cells after treatment with 100 ng/ml TRAIL. (C) Cell surface TRAIL receptors expression was analyzed by flow cytometry in resting and activated T lymphocytes (shaded peaks). Solid lines represent background fluorescence with secondary antibody alone. (D) Expression of FADD and c-FLIP was determined by Western blot in Jurkat, resting and activated T cells.  $\alpha$ -Tubulin was used as a control of loaded protein. In B–D, results shown are representative of at least three different donors.

procaspase-8a and -8b. Data presented in Fig. 1B shows that TRAIL was not able to induce activation of caspase-8 in either resting or activated primary T lymphocytes, which indicates an apical block of the TRAIL signalling pathway in both types of cells.

These results led us to examine the expression of proteins known to participate in the formation of the DISC and thus in the activation of caspase-8. Firstly, we analyzed the surface expression of TRAIL receptors in resting and activated T lymphocytes. In agreement with previous data (Hasegawa et al., 2004), we observed that the expression of death receptors TRAIL-R1 and -R2, as well as decoy receptor TRAIL-R3, was barely detectable in all analyzed resting T cells, with very weak differences among donors. In contrast, when we examined the expression of TRAIL-R4, two subsets of cells with different fluorescence intensities were detected (Fig. 1C). The highly positive TRAIL-R4 peak seems to correspond to the CD8<sup>+</sup> T cell subpopulation (Hasegawa et al., 2004; Mirandola et al., 2004) while the less fluorescent peak, which varies from very low to moderate intensity among different donors, corresponds to CD4<sup>+</sup> T cells. T cell activation did not change significantly the expression of TRAIL receptors except for TRAIL-R4 (Fig. 1C). For this receptor, we found a slight enhancement in the fluorescence intensity of the two subpopulations, as well as an increase in the percentage of TRAIL-R4 highly positive cells, which is likely due to the observed increment of the CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> ratio within the population of activated T cells compared to the resting one (data not shown). Regarding the expression of intracellular proteins involved in the activation of caspase-8, we observed that the levels of FADD in resting and activated T cells were similar to that found in the TRAIL-sensitive Jurkat cell line (Fig. 1D). However, it is also known that human T lymphocytes express

the inhibitory protein c-FLIP (Bosque et al., 2005; Schmitz et al., 2003). When we compared the expression of this protein between Jurkat and primary T cells we detected a much higher level of the long isoform, c-FLIP<sub>L</sub>, in both resting and activated T lymphocytes than in Jurkat cells. The expression of the c-FLIP<sub>S</sub> isoform was low in primary T cells but barely perceptible in Jurkat cells (Fig. 1D). Taken together, these results suggest that several factors may be responsible for the resistance of resting and activated T lymphocytes to TRAIL-induced apoptosis.

### 3.2. Effect of different modulators of TRAIL sensitivity on the resistance of human primary T lymphocytes

Deregulated expression of TRAIL receptors and intracellular antiapoptotic proteins seem to cause resistance to TRAIL-induced apoptosis in several types of tumor cells, which reduces the effectiveness of TRAIL in cancer therapy. However, most of these TRAIL-resistant cancer cells can be sensitized by several therapeutic approaches such as conventional chemotherapeutic drugs, histone deacetylase inhibitors (HDACi), inhibitors of survival pathways or proteasome inhibitors (Inoue et al., 2004; Kandasamy and Srivastava, 2002; Sayers and Murphy, 2006; Shankar and Srivastava, 2004; Singh et al., 2003). We analyzed the effect of some agents belonging to these functional groups on the resistance of primary T lymphocytes to TRAIL-mediated apoptosis. As shown in Fig. 2, we specifically tested the genotoxic drug doxorubicin, the PI3K inhibitor LY294002, the HDACi valproic acid (VPA), the microtubule depolymerizing agent nocodazole and the proteasome inhibitor Velcade (bortezomib). Working concentrations of these agents were chosen according to previous reports and on the basis of experiments with the T-lymphoblastic leukemic CEM cell line and the breast



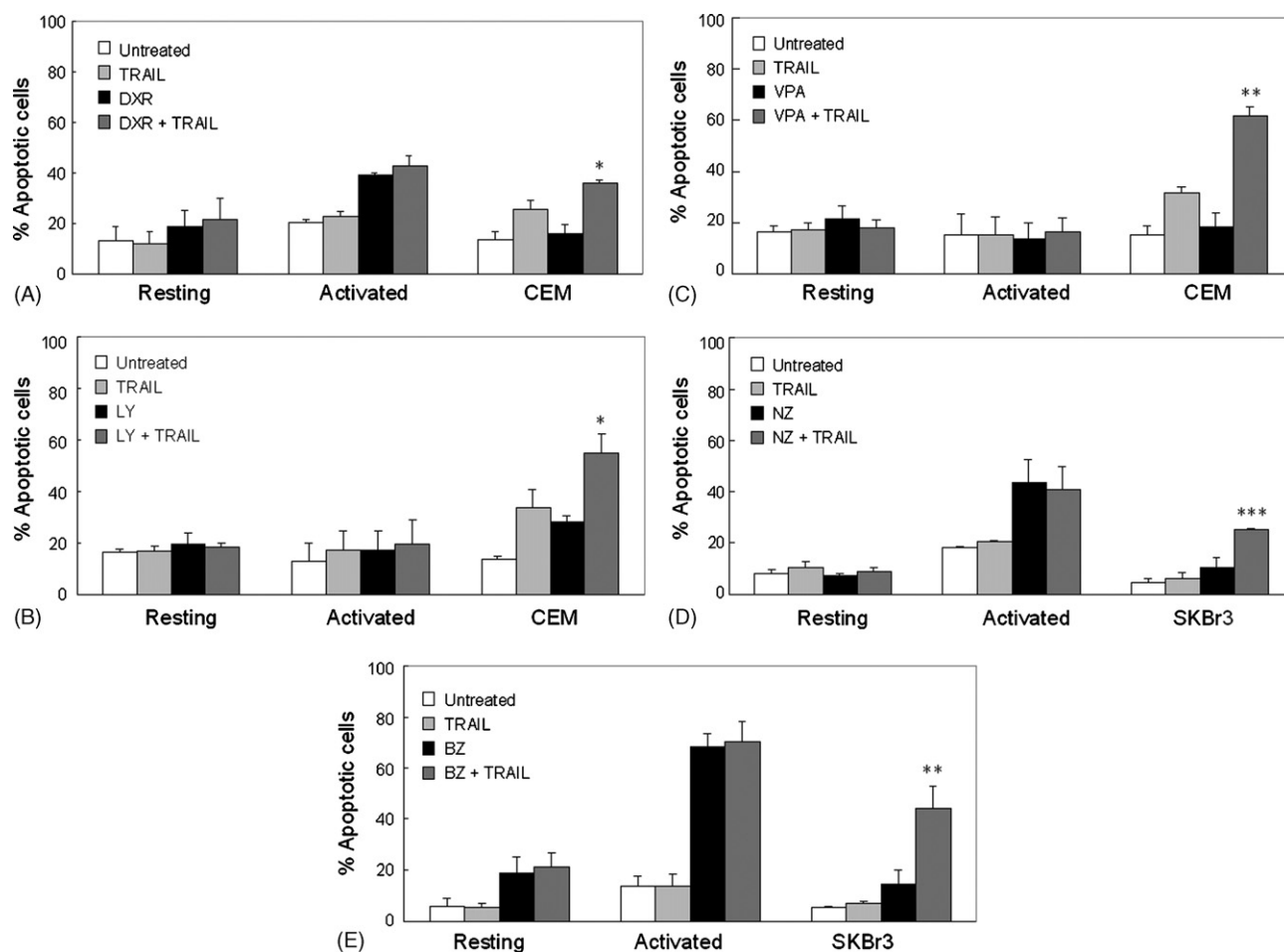


Fig. 2. Primary T lymphocytes remain resistant to TRAIL upon treatment with different sensitizing agents. Resting and activated T lymphocytes were preincubated with (A) 100 ng/ml doxorubicin (DXR), (B) 10  $\mu$ M LY 294002 or (E) 50 nM bortezomib (BZ) for 1 h, or with (C) 1mM valproic acid (VPA) or (D) 400 ng/ml nocodazole (NZ) for 7 h. After preincubation, cells were treated with or without 250 ng/ml recombinant TRAIL for 24 h. CEM (A–C) and SKBr3 (D and E) cells were preincubated in the same conditions before treatment with 50 and 250 ng/ml recombinant TRAIL, respectively, for 20 h. The percentage of sub-G1 apoptotic cells was determined by flow cytometry. Error bars show S.D. from three independent experiments. \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001 by unpaired Student's  $t$ -test (two-tailed).

cancer SKBr3 cell line, which show a moderate sensitivity and a high resistance to TRAIL, respectively. Pretreatment with either doxorubicin, LY294002 or VPA increased the susceptibility of CEM cells to TRAIL while bortezomib and nocodazole clearly sensitized TRAIL-resistant SKBr3 cells. However, we did not find TRAIL sensitization in either resting or activated T cells in response to pretreatment with any of the indicated agents. Interestingly, doxorubicin, nocodazole and bortezomib showed a remarkable toxicity against activated T cells, whereas only bortezomib was slightly toxic to resting ones (Fig. 2A, D and E).

### 3.3. NF- $\kappa$ B inhibitors sensitize human activated T lymphocytes to TRAIL-induced apoptosis

In addition to the above agents, we also analyzed the effect of the NF- $\kappa$ B inhibitor BAY 11-7085. Data presented in Fig. 3A indicates that the response of resting T lymphocytes to this inhibitor varies among different donors. BAY 11-7085 alone was toxic to varying degrees to 9/10 samples. Surprisingly, while

it caused a significant sensitization to TRAIL-induced apoptosis in 4/10 samples, in five different ones the percentage of apoptotic cells decreased following treatment with both BAY 11-7085 and TRAIL compared to cells treated with the NF- $\kappa$ B inhibitor alone. In the case of activated T lymphocytes, a variable toxicity was also found in response to BAY 11-7085 alone (Fig. 3B). However, we observed that preincubation with the NF- $\kappa$ B inhibitor induced a different but substantial sensitization to TRAIL-mediated apoptosis in all donors analyzed, except for one in which the inhibitor alone showed an extreme toxicity.

To further establish that the death process promoted by the NF- $\kappa$ B inhibitor was apoptosis, resting and activated T lymphocytes from donors previously proved to be sensitized to TRAIL (Fig. 3A and B, respectively) were preincubated with the general caspase inhibitor Z-VAD-FMK before treatment with BAY 11-7085 and TRAIL. Representative samples in Fig. 3C and D show that not only TRAIL-mediated cell death but also the cytotoxic effect of BAY 11-7085 were almost completely inhibited by Z-VAD. It is worth mentioning that Z-VAD was

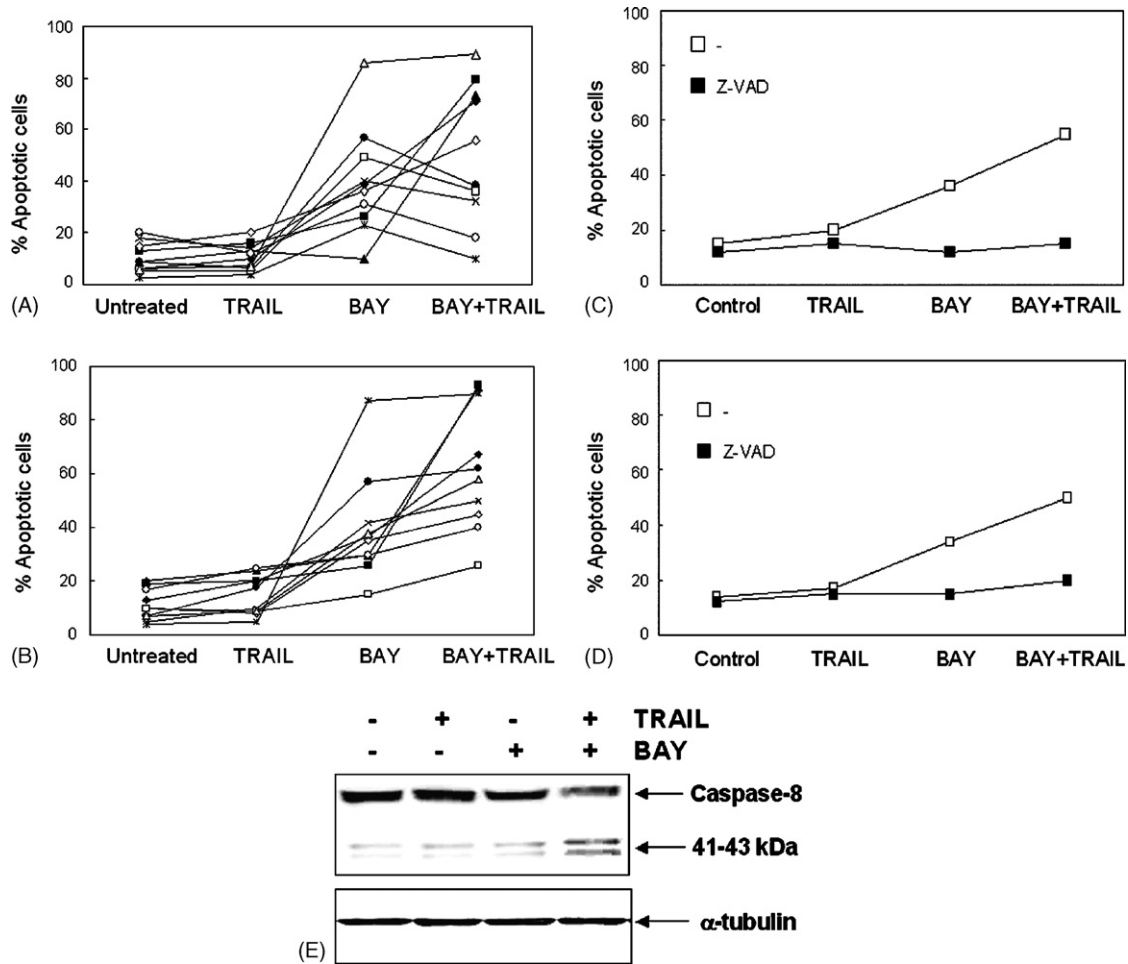


Fig. 3. BAY 11-7085 sensitizes activated T lymphocytes to TRAIL-induced apoptosis. Resting (A and C) and activated (B and D) T lymphocytes from 10 different healthy donors (A and B) and one representative donor (C and D) were preincubated for 1 h with 2.5  $\mu$ M BAY 11-7085 and then treated with or without 250 ng/ml TRAIL for 24 h. In C and D, preincubation was carried out in the presence or in the absence of 50  $\mu$ M Z-VAD. Apoptosis was determined by flow cytometry. Results in C and D are representative of three different experiments. (E) Activation of caspase-8 was determined by Western blot in activated T lymphocytes incubated with or without 250 ng/ml TRAIL for 20 h after pretreatment for 1 h with 2.5  $\mu$ M BAY 11-7085.  $\alpha$ -Tubulin was used as a control of loaded protein. Data shown are representative of three different experiments.

not able to inhibit cell death in the samples in which BAY 11-7085 alone was extremely toxic (data not shown). This suggests that BAY 11-7085 may activate both caspase-dependent and caspase-independent cell death signalling pathways in T lymphocytes. On the other hand, we observed the processing of apical procaspase-8 in response to TRAIL in activated T lymphocytes preincubated with BAY 11-7085 (Fig. 3E), which confirm the induction of the TRAIL signalling pathway in T cells sensitized by treatment with the NF- $\kappa$ B inhibitor.

To determine the specific involvement of NF- $\kappa$ B in the mechanism of BAY 11-7085-induced sensitization, we examined the effects of different NF- $\kappa$ B inhibitors on the resistance of activated T cells to TRAIL-mediated cell death. Sulfasalazine, parthenolide and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) have all been reported to be specific NF- $\kappa$ B inhibitors (Bork et al., 1997; Natarajan et al., 1996; Wahl et al., 1998). We observed that activated T lymphocytes were significantly sensitized to TRAIL-induced apoptosis upon pretreatment with sulfasalazine. However, parthenolide and CAPE showed a very weak and no

effect, respectively, on the resistance to TRAIL (Fig. 4A). We next confirmed that all these compounds effectively inhibited NF- $\kappa$ B at the concentrations used in this study. To this end, we analyzed the presence of the p65 (RelA) and the p50 (NF- $\kappa$ B1) subunits of NF- $\kappa$ B in nuclear extracts of activated T lymphocytes following treatment with the NF- $\kappa$ B inhibitors. Western blot analysis showed that BAY 11-7085, sulfasalazine and parthenolide significantly reduced the levels of p65 and p50 in the nucleus of activated T cells, while CAPE only had a slight effect on the nuclear translocation of the NF- $\kappa$ B subunits (Fig. 4B), which may explain the lack of sensitization to TRAIL-induced apoptosis showed by this agent.

#### 3.4. BAY 11-7085 regulates the expression of TRAIL receptors and antiapoptotic genes in activated T lymphocytes

The transcription factor NF- $\kappa$ B has been reported to regulate the expression of some TRAIL receptors as well as that of

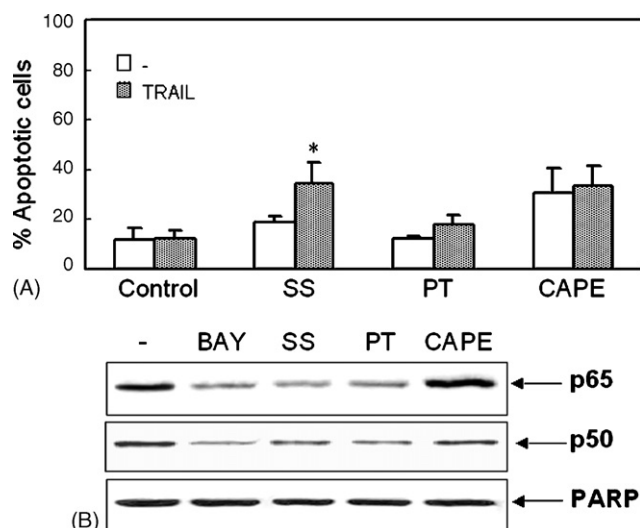


Fig. 4. Effect of different NF- $\kappa$ B inhibitors on the resistance of activated T cells to TRAIL. (A) Activated T cells were preincubated for 1 h with 1.5 mM sulfasalazine (SS), 2.5  $\mu$ M parthenolide (PT) or 50  $\mu$ g/ml CAPE, before treatment with 250 ng/ml TRAIL for 24 h. Sub-G1 apoptotic cells were analyzed by flow cytometry. Error bars show S.D. from three independent experiments. \*  $p < 0.05$  by unpaired Student's *t*-test (two-tailed). (B) Expression of the p50 and p65 subunits of NF- $\kappa$ B was determined by Western blot in nuclear extracts of activated T cells after treatment for 4 h with the indicated inhibitors. PARP was used as control of loaded protein. Results shown are representative of three independent experiments.

several antiapoptotic proteins involved in TRAIL signalling apoptotic pathway (Micheau et al., 2001; Ravi et al., 2001; Stehlik et al., 1998; Wang et al., 1998). In order to understand the mechanism for NF- $\kappa$ B inhibition-induced sensitization of human primary T lymphocytes to TRAIL-mediated apoptosis, we first analyzed the expression of TRAIL-R1, -R2 and -R4 on the surface of activated T lymphocytes upon treatment with BAY 11-7085. As shown in Fig. 5A, we did not observe any change in the expression of death receptors, although the surface level of the antiapoptotic receptor TRAIL-R4 was reduced in response to the NF- $\kappa$ B inhibitor in all samples analyzed. Moreover, when we determined the expression of TRAIL receptors at the mRNA level we observed a clear time-dependent down-regulation of all of them after treatment with BAY 11-7085 (Fig. 5B). TRAIL-R3 expression was undetectable at the mRNA level (data not shown).

We then examined the effects of BAY 11-7085 on the expression of different antiapoptotic genes, namely c-FLIP, Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1, XIAP, c-IAP1 and c-IAP2, in activated T lymphocytes. We found no marked changes in the mRNA levels of c-FLIP<sub>L</sub>, Bcl-x and Mcl-1 for up to 9 h following treatment with BAY 11-7085 (Fig. 5C). In contrast, a significant and time-dependent decrease in the mRNA expression of c-FLIP<sub>S</sub>, Bcl-2, XIAP, c-IAP1 and c-IAP2 was observed in T cells exposed to the NF- $\kappa$ B inhibitor (Fig. 5C). We further analyzed whether the decrease of these antiapoptotic genes was paralleled by changes in the levels of the corresponding proteins. Results in Fig. 5D indicate that all the proteins analyzed, with the exception of Bcl-2, were down-regulated after 24 h of treatment with BAY 11-7085. The absence of down-regulation of Bcl-2 at this time

may be due to the long half-life of the protein (Reed, 1996). Altogether, regulation of these antiapoptotic proteins and changes in the expression of TRAIL-R4, may account for the sensitization of T lymphocytes to TRAIL-mediated apoptosis observed in response to NF- $\kappa$ B inhibition.

#### 4. Discussion

The significance of TRAIL as an anti-cancer therapeutic agent is supported by its known involvement in immune surveillance against tumors. Surface expression of TRAIL is upregulated in virtually all cell types of the immune system in response to activation signals, mediating to a great degree the cytotoxic activity of these cells (Fanger et al., 1999; Griffith et al., 1999; Kayagaki et al., 1999; Kemp et al., 2004, 2005; Takeda et al., 2001). The lack of toxicity to most normal cells is an important feature for TRAIL to act as an anti-tumor agent although the molecular mechanisms of TRAIL resistance in normal cells are not completely understood. Here, we have analyzed the response of resting and activated T lymphocytes to TRAIL. We have shown for the first time that the TRAIL signalling pathway is inhibited at the most apical level in both, resting and activated T cells, as no caspase-8 activation was observed in response to TRAIL. The analysis of the expression of the most important proteins involved in the formation of the DISC indicate that: (1) long-term T cell activation (day 6) does not modulate the expression levels of FADD, caspase-8, c-FLIP and TRAIL receptors, with the exception of TRAIL-R4; (2) when comparison with the TRAIL sensitive Jurkat cells, the expression of the antiapoptotic protein c-FLIP is much higher in T lymphocytes than in this cell line; (3) the levels of expression of TRAIL-R1, -R2 and -R3 receptors on the surface of T cells are barely detectable while the expression of TRAIL-R4 shows two peaks with low and high fluorescence intensity, respectively. From these data we can infer that several factors may be responsible for the lack of caspase-8 activation upon treatment with TRAIL and hence for the resistance of resting and activated T lymphocytes to TRAIL-induced apoptosis. It has been recently described that c-FLIP is involved the resistance of NK cells to TRAIL-induced apoptosis (Mirandola et al., 2004). Our results about the expression of c-FLIP, in agreement with previous reports (Bosque et al., 2005; Mirandola et al., 2004; Schmitz et al., 2003), suggest that this inhibitory protein could also play a role in the resistance of T lymphocytes.

Regarding the expression of TRAIL receptors, there are some discrepancies between authors. Previous studies have reported that resting T cells do not show significant expression of TRAIL receptors, with the exception of TRAIL-R4 on the CD8<sup>+</sup> subpopulation (Hasegawa et al., 2004; Mirandola et al., 2004). However, we have observed that the intensity of the TRAIL-R4 less fluorescence peak, which seems to correspond to the CD4<sup>+</sup> cells, may vary among donors. On the other hand, those reports show that activation of CD8<sup>+</sup> T cells up-regulate the expression of either TRAIL-R1 and -R2 (Hasegawa et al., 2004) or TRAIL-R2, -R3 and -R4 (Mirandola et al., 2004) while no changes are detected in the expression of TRAIL receptors upon activation of CD4<sup>+</sup> T cells (Hasegawa et al., 2004). In contrast to Miran-

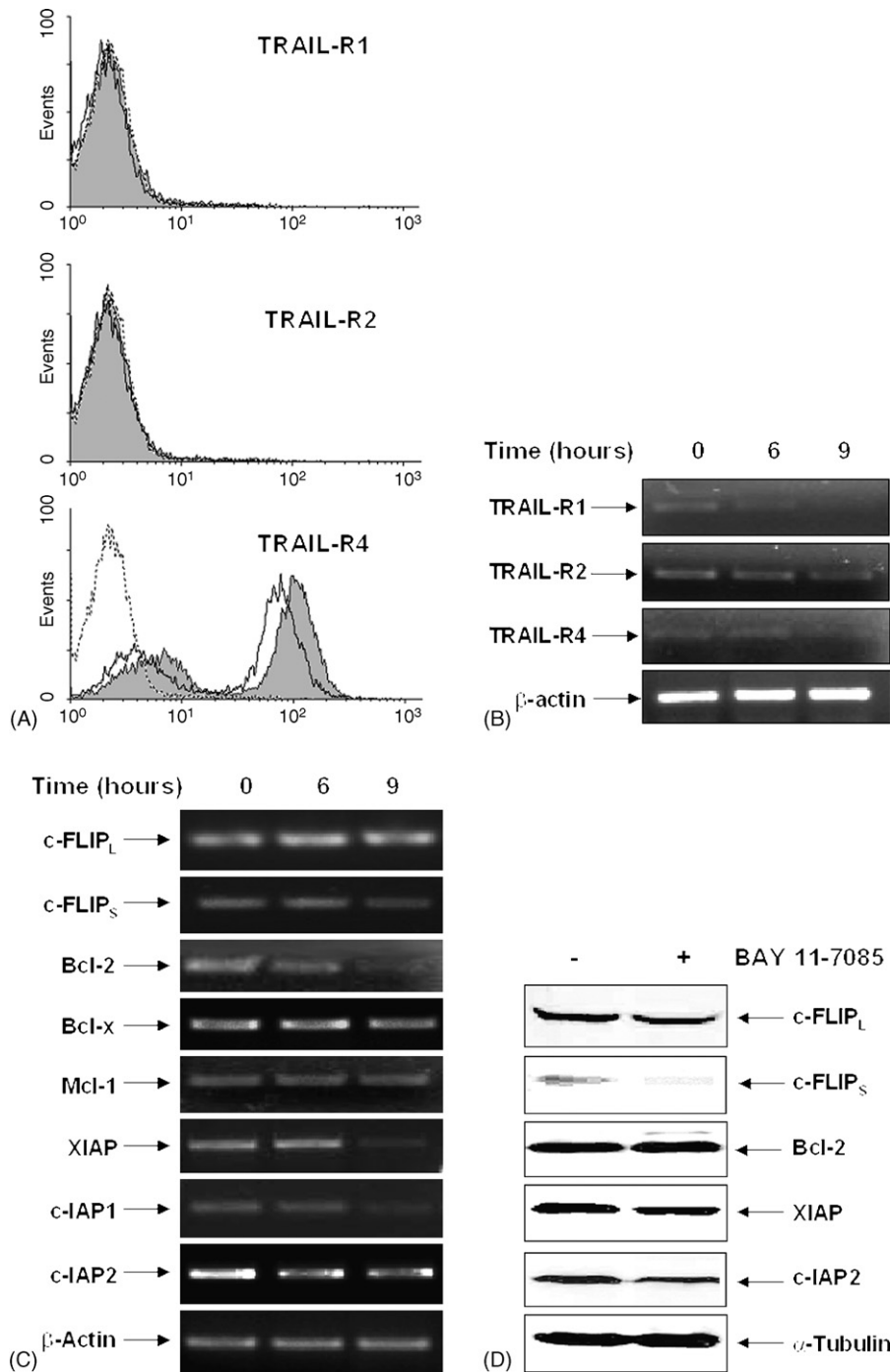


Fig. 5. Expression of TRAIL receptors and antiapoptotic genes in activated T lymphocytes in response to BAY 11-7085. (A) Activated T cells were incubated with (unshaded peaks) or without (shaded peaks) 2.5  $\mu$ M BAY for 15 h and cell surface TRAIL-R1, -R2 and -R4 receptors expression was assessed by flow cytometry. Dashed lines show background fluorescence with secondary antibody. mRNA levels of TRAIL-R1, -R2, -R4 (B), c-FLIP<sub>L</sub>, c-FLIP<sub>S</sub>, Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1, XIAP, c-IAP1 and c-IAP2 (C) were determined in activated T cells after treatment with 2.5  $\mu$ M BAY for 6 and 9 h by RT-PCR as described under Section 2.  $\beta$ -Actin was used as control of RNA input. (D) Expression of c-FLIP<sub>L</sub>, c-FLIP<sub>S</sub>, Bcl-2, XIAP and c-IAP2 was analyzed by Western blot in activated T lymphocytes treated with or without 2.5  $\mu$ M BAY for 24 h.  $\alpha$ -Tubulin was used as control of loaded protein. Data shown are representative of at least three independent experiments with different donors.

dola et al., we have worked with the whole population of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes as CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells subpopulations coexist and may influence each other in physiological conditions. Moreover, not only CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells but also CD4<sup>+</sup> T cells seem to be involved in antitumor immune response via TRAIL (Dorothee et al., 2002; Kayagaki et al., 1999). Contra-

dictory data concerning the expression of TRAIL receptors in activated T lymphocytes may also be due to differences in the way of T cell activation. Independently of the reported profile of TRAIL receptors expression, it is important to emphasize that all studies agree in the resistance of activated T lymphocytes to TRAIL-induced apoptosis.

NF- $\kappa$ B inhibition has been recently proposed as a mechanism for sensitization of some tumor resistant cells to TRAIL-induced apoptosis since this transcription factor is constitutively active in certain tumors modulating the expression of several antiapoptotic proteins (Huerta-Yepez et al., 2004; Karacay et al., 2004; Kasuga et al., 2004). Our findings reveal that several inhibitors of NF- $\kappa$ B are also able to sensitize activated T lymphocytes to TRAIL-mediated apoptosis. Specifically, we have observed a clear sensitization to TRAIL with the NF- $\kappa$ B inhibitors BAY 11-7085 and sulfasalazine while the effect of parthenolide is too low to be significant. As all these agents were able to inhibit the translocation of p65 and p50 subunits to the nucleus, we speculate that the weak sensitization observed with parthenolide may be due to the additional activities that have been reported for this compound, such as JNK activation and STAT3 inhibition (Nakshatri et al., 2004; Sobota et al., 2000), which can interfere in some way with the signals derived from NF- $\kappa$ B inhibition. Interestingly, BAY 11-7085 reduces the mRNA expression of TRAIL-R1 and TRAIL-R2 receptors in activated T lymphocytes, although we could not estimate this decrease at the level of surface protein expression. Despite that the levels of death receptors are too low to be detected by FACS analysis, we have clearly observed activation of the initiator caspase-8 in response to TRAIL upon pretreatment of T lymphocytes with BAY 11-7085. Thus, the above data suggest that TRAIL-R1, TRAIL-R2 or both receptors must be present on the surface of activated T lymphocytes and are able to transmit the apoptotic signals. In addition, we have demonstrated for the first time that NF- $\kappa$ B inhibition not only down-regulates the expression of TRAIL-R4 at the mRNA level but also modestly reduces TRAIL-R4 expression at the cell surface. TRAIL-R4 has been recently proposed to be a regulatory rather than a decoy receptor as it associates with TRAIL-R2 forming a ligand-independent, death-inhibitory complex (Clancy et al., 2005). Moreover, authors demonstrate that this complex regulates the sensitivity of CD8<sup>+</sup> T cells to TRAIL-induced apoptosis. Therefore, down-regulation of TRAIL-R4 by NF- $\kappa$ B inhibition may be involved in the sensitization of activated T lymphocytes to TRAIL. We have further observed that BAY 11-7085 down-regulates the expression levels of some antiapoptotic proteins known to be transcriptionally modulated by NF- $\kappa$ B, such as c-FLIP<sub>S</sub>, XIAP and c-IAP2. Although the contribution of each factor in mediating TRAIL resistance of activated T lymphocytes is unknown, the overall results provide a mechanism for the sensitization of activated T lymphocytes to TRAIL-mediated apoptosis by NF- $\kappa$ B inhibition. Regarding Bcl-2, even though there is a clear decrease of mRNA levels, our findings suggest that this antiapoptotic factor must not be involved in the effect of the NF- $\kappa$ B inhibitor as the protein levels do not change at the time we observe sensitization of T lymphocytes.

Our data indicate that the response of resting T lymphocytes to TRAIL-induced apoptosis upon NF- $\kappa$ B inhibition vary among different donors. While NF- $\kappa$ B is actively involved in T cell proliferation and activation, only low levels of constitutive NF- $\kappa$ B binding activity are usually found in resting T cells. Moreover, homodimeric complexes of the NF- $\kappa$ B p50 subunit, which generally function as transcriptional repressors, have been reported

to bind to the DNA in the nuclei of resting T cells, in sharp contrast with the transcriptionally active p65/p50 heterodimers found in activated T lymphocytes (Algarte et al., 1995; Kang et al., 1992). These special features of NF- $\kappa$ B activity in resting T lymphocytes, together with individual singularities, may influence the effect of BAY 11-7085. Furthermore, TRAIL has been reported to activate NF- $\kappa$ B through TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in many cell types (Franco et al., 2001; Hao et al., 2003; Schneider et al., 1997). Our striking findings about the blockade of cell death observed in some resting T cells upon treatment with both, BAY 11-7085 and TRAIL, might be due to the activation of NF- $\kappa$ B by TRAIL, which could counteract the cytotoxic effect of the NF- $\kappa$ B inhibitor. It would be interesting to determine whether NF- $\kappa$ B activation is the predominant effect of TRAIL receptors engagement in resting T lymphocytes. On the other hand, although we have detected similar levels of pro- and antiapoptotic genes in resting and activated T lymphocytes (Fig. 1 and data not shown) it is known that only the last ones are able to undergo activation-induced cell death (AICD) (Wesselborg et al., 1993) indicating that different mechanisms of apoptosis resistance work in both types of cells, which may also influence the sensitization to TRAIL.

Although proteasome inhibitors block NF- $\kappa$ B activation, we have not observed any effect of either bortezomib or MG132 on the resistance of T lymphocytes to TRAIL-mediated apoptosis (Fig. 2E and data not shown). This is not surprising as the biological effects of proteasome inhibitors are multiple and the final result of all of them may be not suitable for the sensitization of T cells to TRAIL. In spite of that, our results indicate that bortezomib is highly toxic especially for activated T lymphocytes. Similarly, other modulators of TRAIL sensitivity in tumor cells, such as doxorubicin and nocodazole, show a moderate toxicity against activated T cells. In contrast, and in agreement with previous reports, our findings suggest that HDAC inhibitors may be a valuable therapeutic strategy to sensitize tumor cells to TRAIL-induced apoptosis as they seem to be non-toxic and they do not regulate TRAIL resistance in primary T cells (Inoue et al., 2004). PI3K/Akt inhibitors may also be useful in the treatment of tumors with high level of activity of this survival pathway that seems to block the apoptotic signals derived from TRAIL receptors engagement (Nam et al., 2003; Nesterov et al., 2001).

NF- $\kappa$ B activation is essential to numerous physiological processes and plays a crucial role in the immune response, e.g. in lymphocyte proliferation and cytokine production, which suggests that general NF- $\kappa$ B inhibitors will probably produce a myriad of side-effects. In the present study, we have demonstrated that NF- $\kappa$ B inhibitors not only sensitize primary activated T lymphocytes to TRAIL-induced apoptosis but also show a variable toxicity to resting and activated T cells. It is worth mentioning a recent report describing that the mechanism of TRAIL resistance in normal human urothelial cells is mainly dependent on the NF- $\kappa$ B pathway (Steele et al., 2006). Together with these data, our results suggest a likely role for NF- $\kappa$ B in the resistance of some normal cells types to TRAIL-induced apoptosis and challenge the use of NF- $\kappa$ B inhibitors as a useful approach in antitumor therapy.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Ministerio de Educación y Ciencia SAF2003-02486 (to C.R.-R.). J.C.M. was supported by a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia. We would like to thank Dr. Abelardo López-Rivas and Dr. F. Javier Oliver for invaluable advice and for the generous donation of reagents.

## References

- Algarde, M., Lecine, P., Costello, R., Plet, A., Olive, D., Imbert, J., 1995. In vivo regulation of interleukin-2 receptor alpha gene transcription by the coordinated binding of constitutive and inducible factors in human primary T cells. *EMBO J.* 14, 5060–5072.
- Bork, P.M., Schmitz, M.L., Kuhnt, M., Escher, C., Heinrich, M., 1997. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kappaB. *FEBS Lett.* 402, 85–90.
- Bosque, A., Pardo, J., Martinez-Lorenzo, M.J., Iturralde, M., Marzo, I., Pineiro, A., Alava, M.A., Naval, J., Anel, A., 2005. Down-regulation of normal human T cell blast activation: roles of APO-2L/TRAIL, FasL, and c-FLIP, Bim, or Bcl-x isoform expression. *J. Leukoc. Biol.* 77, 568–578.
- Clancy, L., Mruk, K., Archer, K., Woelfel, M., Mongkolsapaya, J., Screaton, G., Lenardo, M.J., Chan, F.K., 2005. Pre-ligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 18099–18104.
- Cretney, E., Shanker, A., Yagita, H., Smyth, M.J., Sayers, T.J., 2006. TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer. *Immunol. Cell Biol.* 84, 87–98.
- Cummins, J.M., Kohli, M., Rago, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Bunz, F., 2004. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a non-redundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells. *Cancer Res.* 64, 3006–3008.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V.M., 1995. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505–512.
- Degli-Esposti, M.A., Dougall, W.C., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Smith, C.A., Goodwin, R.G., 1997. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7, 813–820.
- Dorothee, G., Vergnon, I., Menez, J., Echchakir, H., Grunenwald, D., Kubin, M., Chouaib, S., Mami-Chouaib, F., 2002. Tumor-infiltrating CD4<sup>+</sup> T lymphocytes express APO2 ligand (APO-2L)/TRAIL upon specific stimulation with autologous lung carcinoma cells: role of IFN-alpha on APO-2L/TRAIL expression and -mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 169, 809–817.
- Fanger, N.A., Maliszewski, C.R., Schooley, K., Griffith, T.S., 1999. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J. Exp. Med.* 190, 1155–1164.
- Franco, A.V., Zhang, X.D., Van Berkel, E., Sanders, J.E., Zhang, X.Y., Thomas, W.D., Nguyen, T., Hersey, P., 2001. The role of NF-kappaB in TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis of melanoma cells. *J. Immunol.* 166, 5337–5345.
- Gong, J.P., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., 1994. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal. Biochem.* 218, 314–319.
- Griffith, T.S., Wiley, S.R., Kubin, M.Z., Sedger, L.M., Maliszewski, C.R., Fanger, N.A., 1999. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J. Exp. Med.* 189, 1343–1354.
- Hao, X.S., Hao, J.H., Liu, F.T., Newland, A.C., Jia, L., 2003. Potential mechanisms of leukemia cell resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Apoptosis* 8, 601–607.
- Hasegawa, H., Yamada, Y., Harasawa, H., Tsuji, T., Murata, K., Sugahara, K., Tsuruda, K., Masuda, M., Takasu, N., Kamihira, S., 2004. Restricted expres-
- sion of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 4 in human peripheral blood lymphocytes. *Cell. Immunol.* 231, 1–7.
- Huerta-Yepez, S., Vega, M., Jazirehi, A., Garban, H., Hongo, F., Cheng, G., Bonavida, B., 2004. Nitric oxide sensitizes prostate carcinoma cell lines to TRAIL-mediated apoptosis via inactivation of NF-kappaB and inhibition of Bcl-xl expression. *Oncogene* 23, 4993–5003.
- Inoue, S., MacFarlane, M., Harper, N., Wheat, L.M., Dyer, M.J., Cohen, G.M., 2004. Histone deacetylase inhibitors potentiate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in lymphoid malignancies. *Cell Death Differ.* 11 (Suppl. 2), S193–S206.
- Jo, M., Kim, T.H., Seol, D.W., Esplen, J.E., Dorko, K., Billiar, T.R., Strom, S.C., 2000. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nat. Med.* 6, 564–567.
- Kandasamy, K., Srivastava, R.K., 2002. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 62, 4929–4937.
- Kang, S.M., Tran, A.C., Grilli, M., Lenardo, M.J., 1992. NF-kappa B subunit regulation in non-transformed CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Science* 256, 1452–1456.
- Karacay, B., Sanlioglu, S., Griffith, T.S., Sandler, A., Bonthius, D.J., 2004. Inhibition of the NF-kappaB pathway enhances TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Gene Ther.* 11, 681–690.
- Kasuga, C., Ebata, T., Kayagaki, N., Yagita, H., Hishii, M., Aral, H., Sato, K., Okumura, K., 2004. Sensitization of human glioblastomas to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) by NF-kappaB inhibitors. *Cancer Sci.* 95, 840–844.
- Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Eto, H., Okumura, K., Yagita, H., 1999. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: a novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *J. Exp. Med.* 189, 1451–1460.
- Kemp, T.J., Ludwig, A.T., Earel, J.K., Moore, J.M., VanOosten, R.L., Moses, B., Leidal, K., Nauseef, W.M., Griffith, T.S., 2005. Neutrophil stimulation with *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guerin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/APO-2L. *Blood* 106, 3474–3482.
- Kemp, T.J., Moore, J.M., Griffith, T.S., 2004. Human B cells express functional TRAIL/Apo-2 ligand after CpG-containing oligodeoxynucleotide stimulation. *J. Immunol.* 173, 892–899.
- Lawrence, D., Shahrokhi, Z., Marsters, S., Achilles, K., Shih, D., Mounho, B., Hillan, K., Totpal, K., DeForge, L., Schow, P., Hooley, J., Sherwood, S., Pai, R., Leung, S., Khan, L., Gliniak, B., Bussiere, J., Smith, C.A., Strom, S.S., Kelley, S., Fox, J.A., Thomas, D., Ashkenazi, A., 2001. Differential hepatocyte toxicity of recombinant APO-2L/TRAIL versions. *Nat. Med.* 7, 383–385.
- Li, L., Thomas, R.M., Suzuki, H., De Brabander, J.K., Wang, X., Harran, P.G., 2004. A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNFalpha-mediated cell death. *Science* 305, 1471–1474.
- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S.M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G.M., Alnemri, E.S., 1997. Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem.* 272, 25417–25420.
- MacFarlane, M., Harper, N., Snowden, R.T., Dyer, M.J., Barnett, G.A., Pringle, J.H., Cohen, G.M., 2002. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Oncogene* 21, 6809–6818.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., Tschopp, J., 2001. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5299–5305.
- Mirandola, P., Ponti, C., Gobbi, G., Sponzilli, I., Vaccarezza, M., Cocco, L., Zauli, G., Secchiero, P., Manzoli, F.A., Vitale, M., 2004. Activated human NK and CD8<sup>+</sup> T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood* 104, 2418–2424.
- Nakshatri, H., Rice, S.E., Bhat-Nakshatri, P., 2004. Antitumor agent parthenolide reverses resistance of breast cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through sustained activation of c-Jun N-terminal kinase. *Oncogene* 23, 7330–7344.
- Nam, S.Y., Jung, G.A., Hur, G.C., Chung, H.Y., Kim, W.H., Seol, D.W., Lee, B.L., 2003. Upregulation of FLIP(S) by Akt, a possible inhibition mecha-

- nism of TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancers. *Cancer Sci.* 94, 1066–1073.
- Natarajan, K., Singh, S., Burke Jr., T.R., Grunberger, D., Aggarwal, B.B., 1996. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9090–9095.
- Nesterov, A., Lu, X., Johnson, M., Miller, G.J., Ivashchenko, Y., Kraft, A.S., 2001. Elevated AKT activity protects the prostate cancer cell line LNCaP from TRAIL-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276, 10767–10774.
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T., Nagata, S., 1993. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364, 806–809.
- Ortiz-Ferron, G., Tait, S.W., Robledo, G., de Vries, E., Borst, J., Lopez-Rivas, A., 2006. The mitogen-activated protein kinase pathway can inhibit TRAIL-induced apoptosis by prohibiting association of truncated Bid with mitochondria. *Cell Death Differ.* 13, 1857–1865.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y.F., Yu, G., Gentz, R., Dixit, V.M., 1997a. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277, 815–818.
- Pan, G., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A.M., Gentz, R., Ebner, R., Ni, J., Dixit, V.M., 1997b. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276, 111–113.
- Ravi, R., Bedi, G.C., Engstrom, L.W., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gelinas, C., Fuchs, E.J., Bedi, A., 2001. Regulation of death receptor expression and TRAIL/APO-2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat. Cell Biol.* 3, 409–416.
- Reed, J.C., 1996. A day in the life of the Bcl-2 protein: does the turnover rate of Bcl-2 serve as a biological clock for cellular lifespan regulation? *Leuk. Res.* 20, 109–111.
- Ruiz-Ruiz, M.C., 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.
- Ruiz de Almodovar, C., Ruiz-Ruiz, C., Munoz-Pinedo, C., Robledo, G., Lopez-Rivas, A., 2001. The differential sensitivity of Bcl-2-overexpressing human breast tumor cells to TRAIL or doxorubicin-induced apoptosis is dependent on Bcl-2 protein levels. *Oncogene* 20, 7128–7133.
- Sarker, M., Ruiz-Ruiz, C., Lopez-Rivas, A., 2001. Activation of protein kinase C inhibits TRAIL-induced caspases activation, mitochondrial events and apoptosis in a human leukemic T cell line. *Cell Death Differ.* 8, 172–181.
- Sayers, T.J., Murphy, W.J., 2006. Combining proteasome inhibition with TNF-related apoptosis-inducing ligand (APO-2L/TRAIL) for cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 55, 76–84.
- Schmitz, I., Krueger, A., Baumann, S., Schulze-Bergkamen, H., Krammer, P.H., Kirchhoff, S., 2003. An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *J. Immunol.* 171, 2930–2936.
- Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J.L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N., Tschoep, J., 1997. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* 7, 831–836.
- Shankar, S., Srivastava, R.K., 2004. Enhancement of therapeutic potential of TRAIL by cancer chemotherapy and irradiation: mechanisms and clinical implications. *Drug Resist. Update* 7, 139–156.
- Sheridan, J.P., Marsters, S.A., Pitti, R.M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C.L., Baker, K., Wood, W.I., Goddard, A.D., Godowski, P., Ashkenazi, A., 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277, 818–821.
- Siegmund, D., Hadwiger, P., Pfizenmaier, K., Vormlocher, H.P., Wajant, H., 2002. Selective inhibition of FLICE-like inhibitory protein expression with small interfering RNA oligonucleotides is sufficient to sensitize tumor cells for TRAIL-induced apoptosis. *Mol. Med.* 8, 725–732.
- Singh, T.R., Shankar, S., Chen, X., Asim, M., Srivastava, R.K., 2003. Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma in vivo. *Cancer Res.* 63, 5390–5400.
- Sobota, R., Szwed, M., Kasza, A., Bugno, M., Kordula, T., 2000. Parthenolide inhibits activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) induced by cytokines of the IL-6 family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 329–333.
- Sprick, M.R., Weigand, M.A., Rieser, E., Rauch, C.T., Juo, P., Blenis, J., Krammer, P.H., Walczak, H., 2000. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* 12, 599–609.
- Steele, L.P., Georgopoulos, N.T., Southgate, J., Selby, P.J., Trejdosiewicz, L.K., 2006. Differential susceptibility to TRAIL of normal versus malignant human urothelial cells. *Cell Death Differ.* 13, 1564–1576.
- Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J.A., Binder, B.R., Lipp, J., 1998. Nuclear factor (NF)-kappa B-regulated X-chromosome-linked IAP gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 188, 211–216.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., Nagata, S., 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169–1178.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., Okumura, K., 2001. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat. Med.* 7, 94–100.
- Wahl, C., Liptay, S., Adler, G., Schmid, R.M., 1998. Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J. Clin. Invest.* 101, 1163–1174.
- Walczak, H., Degli-Esposti, M.A., Johnson, R.S., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Timour, M.S., Gerhart, M.J., Schooley, K.A., Smith, C.A., Goodwin, R.G., Rauch, C.T., 1997. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J.* 16, 5386–5397.
- Walczak, H., Miller, R.E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T.S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R.G., Rauch, C.T., Schuh, J.C., Lynch, D.H., 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat. Med.* 5, 157–163.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., Baldwin Jr., A.S., 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281, 1680–1683.
- Wesselborg, S., Janssen, O., Kabelitz, D., 1993. Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *J. Immunol.* 150, 4338–4345.
- Whang, Y.E., Yuan, X.J., Liu, Y., Majumder, S., Lewis, T.D., 2004. Regulation of sensitivity to TRAIL by the PTEN tumor suppressor. *Vitam. Horm.* 67, 409–426.
- Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., Smith, C.A., Goodwin, R.G., 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673–682.
- Zhang, X.D., Franco, A.V., Nguyen, T., Gray, C.P., Hersey, P., 2000. Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. *J. Immunol.* 164, 3961–3970.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Cancer Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/canlet](http://www.elsevier.com/locate/canlet)

## HDAC inhibitors with different gene regulation activities depend on the mitochondrial pathway for the sensitization of leukemic T cells to TRAIL-induced apoptosis

J.C. Morales, M.J. Ruiz-Magaña, D. Carranza, G. Ortiz-Ferrón, C. Ruiz-Ruiz \*

Unidad de Inmunología, IBIMER, Universidad de Granada, Centro de Investigación Biomédica, 18100 Armilla, Granada, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 January 2010

Received in revised form 31 March 2010

Accepted 30 April 2010

#### Keywords:

TRAIL

HDACi

Leukaemia

Apoptosis

Lymphocytes

### ABSTRACT

Epigenetic modifications commonly associated with tumor development, such as histone deacetylation, may influence the resistance of some tumor cells to tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) by regulating gene transcription of components of the TRAIL signalling pathway. In the present study we have analyzed the effect of six different histone deacetylase inhibitors (HDACi), belonging to the four classic structural families, on TRAIL-induced apoptosis in leukemic T cell lines. Non-toxic and functional doses of all HDACi but apicidin, similarly sensitized different leukemic T cell lines to TRAIL-induced apoptosis, while they showed no effect on the resistance of normal T lymphocytes. Sensitizing doses of vorinostat, valproic acid, sodium butyrate and MS-275 regulated the expression of TRAIL-R2, c-FLIP and Apaf-1 in leukemic cells while TSA modulated only the expression of Apaf-1. The synergistic effect of all HDACi and TRAIL was inhibited in Bcl-2-overexpressing leukemic T cells. Thus, different HDACi may affect the expression of different TRAIL-related genes, but regulation of the mitochondrial pathway seems to be essential for the TRAIL sensitizing effect of HDACi in leukemic T cells. Overall, HDACi represent a promising and safe strategy in combination with TRAIL for treatment of T-cell leukaemia.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/APO-2L) is a type II transmembrane protein, belonging to the tumor necrosis factor (TNF) superfamily, that induce apoptosis upon binding to its specific death domain-containing receptors TRAIL-R1/DR4 and TRAIL-R2/DR5 [1–3]. Apoptotic TRAIL signalling is initiated by oligomerization of TRAIL death receptors and subsequent recruitment of the intracellular adapter molecule Fas-associated death domain

protein (FADD) and procaspases-8 and -10, thereby forming the death-inducing signalling complex (DISC). Activation of caspase-8 in the DISC allows the initiation of a cascade of events that leads to apoptotic cell death [4,5] either by directly activating effector caspases or by Bid cleavage and engagement of the mitochondrial death pathway.

Despite the selective antitumor activity of TRAIL, a large number of cancer cells are resistant to this death ligand. Resistance can occur by different ways since regulation of TRAIL-induced apoptosis is exerted at many stages along its signalling pathway. Several intracellular molecules have been described to block the apoptotic effect of TRAIL, such as the cellular Fas-associated death domain-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme inhibitory protein (c-FLIP) that competes with caspase-8 for binding to FADD [6,7]; Bcl-2 and

\* Corresponding author. Address: IBIMER, Centro de Investigación Biomédica, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain. Tel.: +34 958 241000x20025; fax: +34 958 249015.

E-mail address: [mcarmenr@ugr.es](mailto:mcarmenr@ugr.es) (C. Ruiz-Ruiz).



Bcl-x<sub>L</sub> that impede the activation of the mitochondrial pathway [8]; or the inhibitors of apoptotic proteins XIAP, c-IAP1 and c-IAP2 that inhibit active caspases [9,10].

During the last few years, several studies have focused on the development of therapeutic strategies aimed at overcoming resistance to TRAIL. One of these strategies involves the pharmacologic inhibition of histone deacetylases (HDAC), enzymes implicated in the epigenetic modifications that regulate the expression of genes during cancer development and progression [11]. Several HDAC inhibitors (HDACi), from natural and synthetic origin, have been described to induce cell cycle arrest, differentiation and apoptosis in human tumor cells and non-human models of cancer [12,13]. These HDACi have different chemical structures so that they can be classified in four groups: (i) hydroxamic acids, such as trichostatin A (TSA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Vorinostat); (ii) benzamides, such as MS-275; (iii) short-chain fatty acids, such as valproic acid (VPA) and sodium butyrate (NaB); (iv) cyclic peptides, such as apicidin and depsipeptide [12,14]. The hydroxamic acids are the most potent HDACi showing activity on class I (HDAC1, 2, 3 and 8) and class II (HDAC4, 5, 6, 7, 9 and 10) HDAC. In contrast, MS-275, apicidin and the short-chain fatty acids VPA and NaB are more potent inhibitors of class I HDAC and exhibit little or no activity against class II isoforms [15,16].

Histone acetylation by HDACi affects the expression of many genes [17], some of which are involved in the TRAIL signalling pathway. Accordingly, it has been shown that HDACi down-regulate anti-apoptotic factors, such as c-FLIP, Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> and XIAP, while increase the expression of pro-apoptotic proteins, such as caspase-8, caspase-3, Bid, Bim, Bax or Bak, in different solid and hematopoietic tumor types [18–21]. In addition, TRAIL itself and its pro-apoptotic receptor TRAIL-R2 have been reported to be regulated by HDACi in myeloid leukaemia cells, thus mediating the apoptotic effect of these inhibitors [22,23].

HDACi induce histone acetylation in both tumor and normal cells, but, similarly to TRAIL, they have shown selective antitumor activity [12,24]. However, the mechanism of this selective activity is not known and few studies have determined the effects of the combined treatment with HDACi and TRAIL in non-transformed cells [21,23,25,26]. The present study was designed to compare and better understand the effects of HDACi from different chemical classes on the induction of apoptosis by TRAIL in leukemic T cells and normal T lymphocytes. We analyzed the susceptibility to TRAIL-induced apoptosis upon pre-treatment with HDACi in both cell types. Furthermore, we determined the expression of several proteins involved in the TRAIL signalling pathway, such as components of the DISC and factors of the mitochondrial death pathway, in normal and leukemic T cells in response to HDACi. Our results show that different HDACi may differ in their mechanism of action and their efficacy for regulating TRAIL-mediated apoptosis in leukemic T cells, but their sensitizing effect involves the mitochondrial apoptotic pathway. In addition, none of them is able to sensitize normal T lymphocytes to TRAIL.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and antibodies

Human recombinant TRAIL was prepared as described previously [1]. Valproic acid (VPA), trichostatin A (TSA), MS-275, sodium butyrate (NaB), phytohemagglutinin and mouse anti- $\beta$ -actin were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Apicidin was obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA, Vorinostat, Zolinza<sup>®</sup>) was generously provided by Merck Research Laboratories (Boston, MA). Z-VAD-FMK, a wide spectrum caspase inhibitor, was from Bachem (Bubendorf, Suiza). Anti-cFLIP monoclonal antibody NF6 and mouse anti-human TRAIL receptor-2 antibody were purchased from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). Mouse anti-human CD28 was from eBioscience (San Diego, CA). Anti-human caspase-8 monoclonal antibody was purchased from Cell Diagnostica (Munster, Germany). Caspase inhibitors Z-IETD-FMK and Z-LEHD-FMK, anti-human caspase-9 monoclonal antibody and monoclonal anti-human Apaf-1 were from R&D Systems (Minneapolis, MN). Anti-human caspase-3 polyclonal antibody was obtained from Stressgen (Ann Arbor, MI). Polyclonal antibody anti-histone H4 acetylated was obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY).

### 2.2. Cells and cell culture

Blood samples, obtained from healthy donors by informed consent, were collected into citrate tubes. Peripheral blood T lymphocytes were then isolated and activated as previously described [27].

The human leukemic T cell lines Jurkat, CEM-6 and MOLT-4 were kindly provided by Dr. Abelardo López-Rivas (CABIMER, Sevilla, Spain). They were all maintained in culture in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum, 1 mM L-glutamine, penicillin and streptomycin at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air incubator. Jurkat cells stably overexpressing Bcl-2 were generously provided by Dr. Jacint Boix (Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Universidad de Lleida, Spain) and maintained in culture medium with 1 mg/ml G418 sulfate (Sigma Chemical Co.).

### 2.3. Determination of apoptotic cells

Hypodiploid apoptotic cells were detected by flow cytometry according to published procedures [28]. Briefly, cells were washed with PBS, fixed in cold 70% ethanol, and then stained with propidium iodide while treating with RNase. Quantitative analysis of sub-G1 cells was carried out in a FACScan cytometer using the Cell Quest software (BD Biosciences).

### 2.4. Flow cytometric analysis of histone acetylation

Histone acetylation was analyzed as previously reported [29]. In brief, after 4 h treatment with HDACi cells were washed and fixed for 20 min in 1% formaldehyde in PBS on ice. Cells were then permeabilized with 0.1% Triton

X-100 in PBS for 10 min at room temperature, washed with PBS containing 1% BSA, and incubated with 10% normal goat serum in PBS for 30 min. Subsequently, samples were incubated with 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  anti-acetylated histone H4 monoclonal antibody for 1 h at room temperature and, after washing, stained with goat anti-rabbit fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody (1:1000; Caltag Laboratories, Burlingame, CA) for 1 h at room temperature in the dark. Fluorescence of acetylated histone H4 was determined in a FACScan cytometer using the Cell Quest software (BD Biosciences).

## 2.5. Immunoblot detection of proteins

For detection of cytosolic proteins, cells were lysed in ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 1% NP-40) for 30 min. Proteins were resolved on SDS-PAGE minigels and detected as reported previously [30].

## 2.6. Cytofluorometric analysis of TRAIL receptors

To detect TRAIL-R2 receptor at the cell surface, control or treated cells were incubated with primary antibody (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 30 min at 4 °C. After washing with PBS to remove unbound primary antibody, cells were incubated with goat anti-mouse fluorescein isothiocyanate-conju-

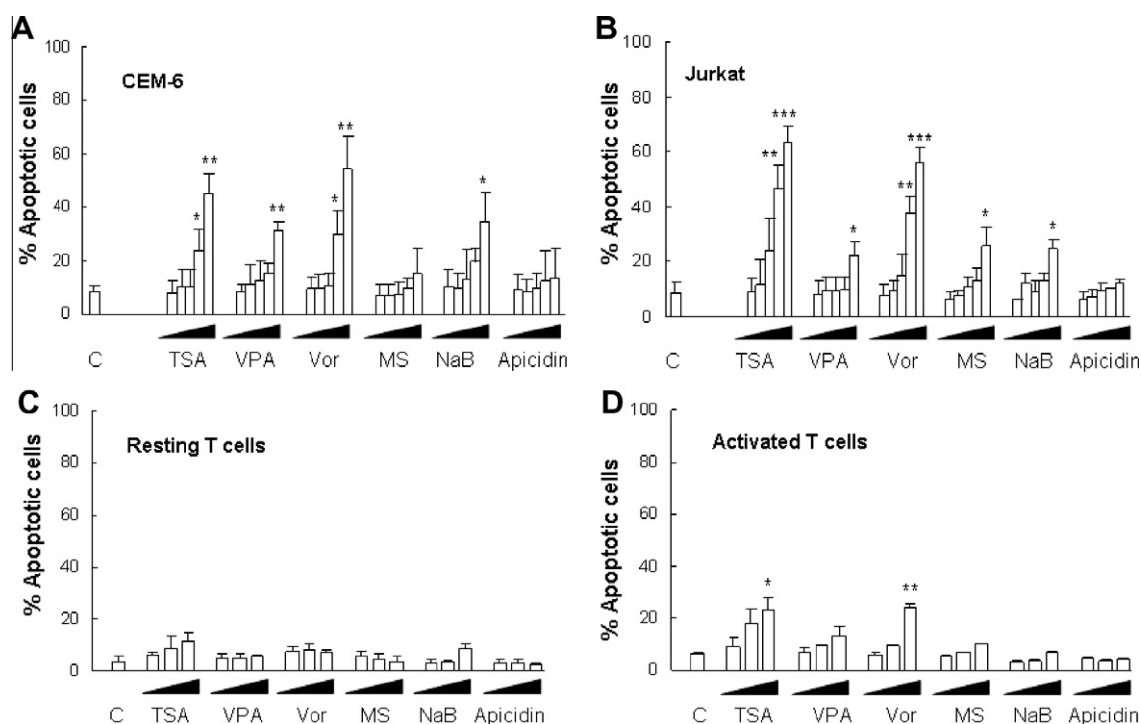
gated antibody (1:1000; Caltag Laboratories, Burlingame, CA) for 30 min at 4 °C. Cells were then washed, resuspended in PBS and analyzed in a FACScan flow cytometer.

## 2.7. Real-time PCR

Total RNA was extracted from cells with Trizol Reagent (Invitrogen) as recommended by the supplier. cDNAs were synthesized from 3  $\mu\text{g}$  of total RNA by using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) and oligo(dT) primer in a total volume of 20  $\mu\text{l}$ . Reverse transcription was performed at 37 °C for 50 min followed by 15 min at 70 °C for inactivation.

Real-time PCR analysis was carried out with 1  $\mu\text{l}$  cDNA using iQ SYBR Green Supermix (BioRad) and the iCycler iQ detection system (BioRad) according to the manufacturer's instructions. Samples were analyzed in triplicate and mRNA expression was normalized to 18S rRNA and quantified by the comparative cycle threshold (Ct) method.

PCRs were done using the following specific primers: TRAIL-R2, forward 5'-TTGCATCAGTTAGGGATACTGGG-3' and reverse 5'-CAAAACCAACATTGATTCTTCAATAC-3'; rRNA 18s, forward 5'-GATATGCTCATGTGGTGTGG-3' and reverse 5'-AATCTTCTTCAGTCGCTCCA-3'. The PCR cycling conditions were as follows: 95 °C for 5 min; then 40 cycles at 95 °C for



**Fig. 1.** Induction of apoptosis by HDACi in leukemic and normal T cells. (A) CEM-6 and (B) Jurkat cells were treated without (control, C) or with different doses of HDACi: TSA 10, 30, 50, 75 and 100 ng/ml; VPA 0.5, 0.75, 1, 2.5 and 5 mM; vorinostat (Vor) 0.1, 0.3, 0.5, 1 and 2  $\mu\text{M}$ ; MS-275 (MS) 0.5, 0.75, 1, 2.5 and 5  $\mu\text{M}$ ; NaB 0.1, 0.3, 0.5, 1 and 5 mM; and apicidin 10, 25, 50, 100 and 250 nM for 24 h. (C) Resting and (D) activated T cells were incubated for 24 h with the three lower doses of TSA and the three higher doses of the rest of HDACi mentioned above. The percentage of sub-G1 apoptotic cells was determined by flow cytometry. Error bars show SD from three independent experiments in (A and B) or three different donors in (C and D). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , compared to control cells.

30 seg, 57 °C for 30 seg and 72 °C for 45 seg; and a final extension at 72 °C for 10 min.

### 2.8. Statistical analysis

The data were analyzed with unpaired Student's *t*-tests (two-tailed) by using GraphPad Prism 4 for Windows. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## 3. Results

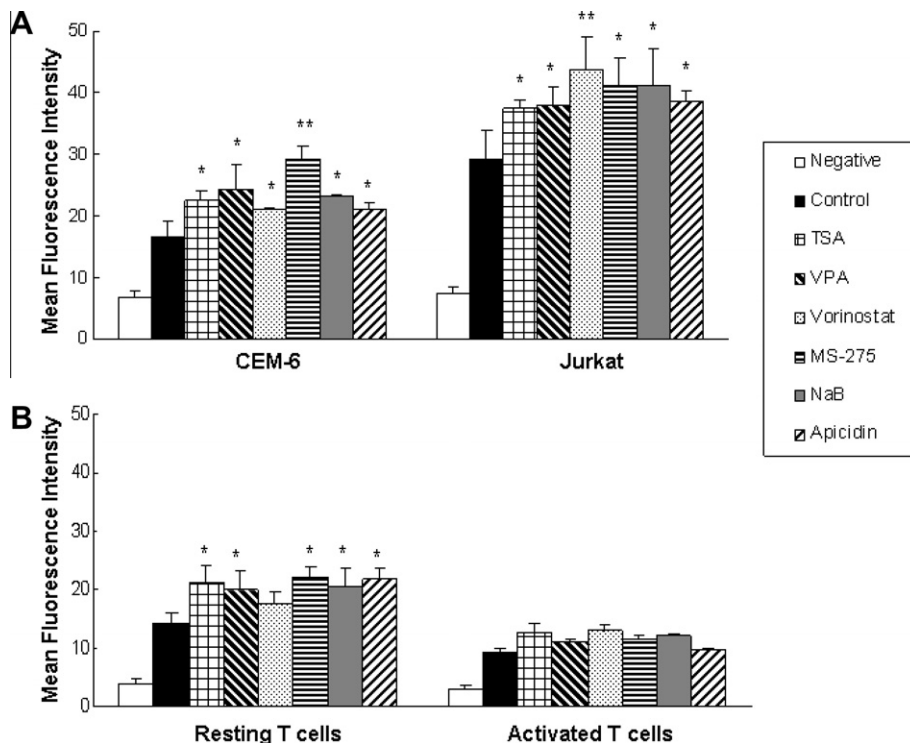
### 3.1. Non-toxic doses of different HDACi induce histone acetylation in both leukemic and normal T lymphocytes

We analyzed the induction of apoptosis in CEM-6 and Jurkat cells in response to treatment with the hydroxamic acids TSA and vorinostat, the benzamide MS-275, the aliphatic acids VPA and NaB, and the cyclic peptide apicidin. The range of doses used for each HDACi was established according to previous reports [19,27,31,32]. Similar results were found in both cell lines (Fig. 1A and B). All HDACi showed a dose-dependent apoptotic effect except for apicidin. In addition, no significant apoptosis was induced by MS-275 in CEM-6 cells. The higher percentages of apoptotic cells were observed after treatment with high doses of the pan-HDACi vorinostat and TSA. Next, we determined the induction of apoptosis in primary resting and activated T lymphocytes upon incubation with the three lower doses of TSA and the three higher doses of the rest of HDACi. Resting T cells were highly resistant to HDACi-mediated apoptosis, whereas high doses of both hydroxamic acids, TSA and vorinostat, showed a slight and significant toxicity against activated T cells (Fig. 1C and D).

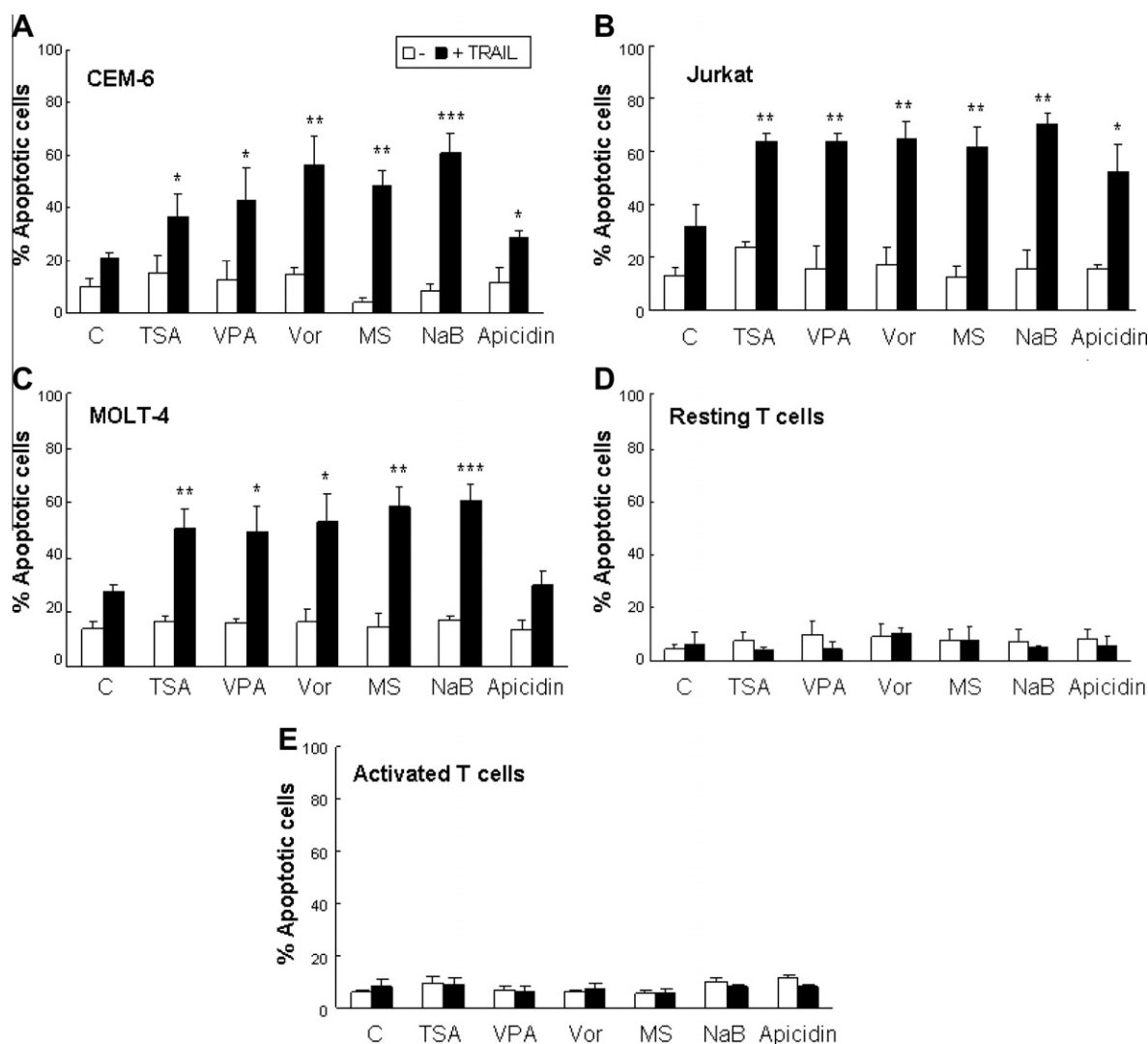
Doses of HDACi (10 ng/ml TSA, 1 mM VPA, 0.5  $\mu$ M vorinostat, 1  $\mu$ M MS-275, 0.5 mM NaB and 50 nM apicidin) were selected on the basis of their low and no toxicity for leukemic and normal T lymphocytes, respectively, and analyzed for their ability to enhance the levels of acetylated histone H4. Flow cytometric analyses demonstrated that all HDACi treatments increased H4 acetylation in leukemic T cells, reaching maximum acetylation level after 4 h of treatment (Fig. 2A and data not shown). Furthermore, the selected non-toxic doses of HDACi significantly increased the level of histone acetylation in resting T lymphocytes, with the exception of vorinostat (Fig. 2B). In the case of activated T cells, we also observed a low, but not significant, increase in histone H4 acetylation in response to all HDACi but apicidin (Fig. 2B).

### 3.2. Different HDACi potentiate TRAIL-induced apoptosis in leukemic T cell lines but not in normal T cells

We had previously shown that the HDACi valproic acid increased the susceptibility of the T-lymphoblastic leukemic CEM-6 cell line to TRAIL, while it did not alter the resistance of resting and activated normal T cells to TRAIL [27]. Now, we determined the ability of the different HDACi to increase TRAIL-mediated apoptosis in three different leukemic T cell lines, namely CEM-6, Jurkat and MOLT-4, when used at the above selected non-toxic concentrations. Pre-treatment for 4 h with all HDACi, except for apicidin, potentiated the apoptotic effect of TRAIL in the three cell lines, with CEM-6 showing a greater variability in the response to the different HDACi (Fig. 3A–C). Apicidin also enhanced TRAIL-induced apoptosis in Jurkat cells, but to a lesser degree when compared to the rest of HDACi (Fig. 3B). However, it had a significant although minimal effect and no significant effect in CEM-6 and MOLT-4 cell lines, respectively (Fig. 3A and C). We simultaneously analyzed the sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in primary T lymphocytes upon pre-treatment with HDACi. Strikingly, none of the inhibitors altered the resistance to TRAIL in either resting or activated T cells (Fig. 3D and E).



**Fig. 2.** HDACi increase histone acetylation levels in leukemic and normal T lymphocytes. (A) CEM-6, Jurkat cells, (B) resting and activated T cells were incubated without (control) or with 10 ng/ml TSA, 1 mM VPA, 0.5  $\mu$ M vorinostat, 1  $\mu$ M MS-275, 0.5 mM NaB and 50 nM apicidin for 4 h. Histone H4 acetylation was analyzed by flow cytometry as described in Section 2. Negative represent background fluorescence with secondary antibody. Error bars show SD from three independent experiments in (A), or three different donors in (B). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , compared to control cells.



**Fig. 3.** Effect of HDACi on TRAIL-induced apoptosis in leukemic and normal T lymphocytes. (A) CEM-6, (B) Jurkat, (C) MOLT-4, (D) resting and (E) activated T cells were preincubated in the absence (control, C) or in the presence of non-toxic doses of HDACi (10 ng/ml TSA, 1 mM VPA, 0.5  $\mu$ M vorinostat (Vor), 1  $\mu$ M MS-275 (MS), 0.5 mM NaB and 50 nM apicidin) for 4 h. After preincubation, cells were treated with or without recombinant TRAIL (100 and 250 ng/ml for leukemic and normal T cells, respectively) for 24 h. The percentage of sub-G1 apoptotic cells was determined by flow cytometry. Error bars show SD from three independent experiments in (A–C) or three different donors in (D and E). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ , compared to TRAIL alone.

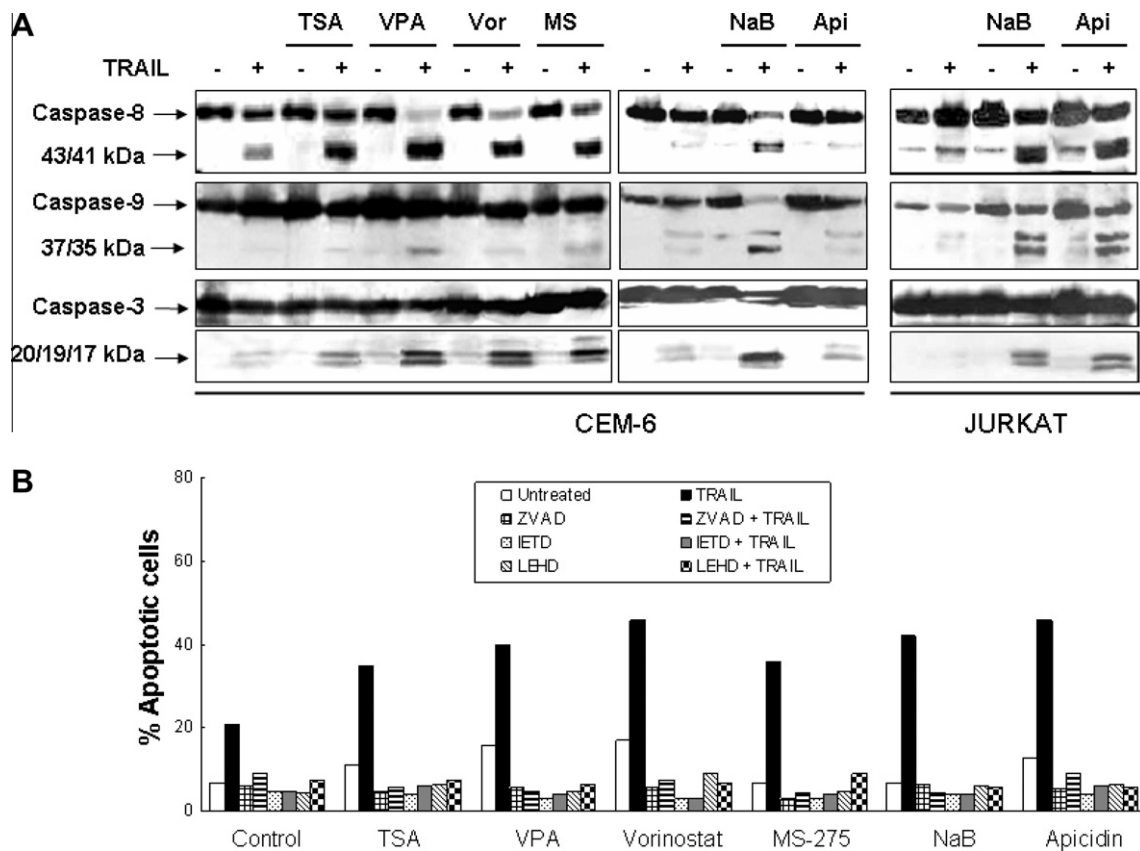
To further characterize the apoptotic cell death induced by the combined treatment with HDACi and TRAIL in leukemic T cells, we analyzed the activation of caspase-8, -9 and -3. All HDACi, except for apicidin, enhanced TRAIL-induced activation of caspases in CEM-6 cells (Fig. 4A). The same results were obtained in MOLT-4 cells (data not shown). In contrast, apicidin induced a similar increase in caspases activation to that observed with the rest of HDACi in Jurkat cells, as shown in Fig. 4A where the effect of apicidin is compared with that of NaB. These data correlate with those obtained in Fig. 3 and indicate that, in contrast to other HDACi, apicidin may selectively regulate TRAIL-induced apoptosis in some, but not all, leukemic T cells.

Previous studies have suggested the involvement of both the extrinsic and the intrinsic pathways in the synergistic effect of TRAIL and HDACi in human myeloid leukemia cell lines [19,33]. To confirm these observations in leukemic T cells, we compared the effect of specific caspase-8 and caspase-9 inhibitors (Z-IETD-FMK and Z-LEHD-FMK respectively) with that of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK, in the induction of apoptosis

by HDACi and TRAIL in Jurkat cells. Not only the wide spectrum inhibitor Z-VAD, but also the caspase-8 and caspase-9 inhibitors were able to completely block apoptosis in response to the combined treatment with HDACi and TRAIL (Fig. 4B).

### 3.3. Components of the death receptor signalling pathway are differentially regulated by different HDACi in leukemic and normal T lymphocytes

To study the mechanism by which HDACi selectively modulate the sensitivity of leukemic T cells to TRAIL-induced apoptosis, we compared their effect on the expression of several pro- and anti-apoptotic proteins in both leukemic and normal T cells. At the selected sublethal doses, all HDACi slightly up-regulated the expression of TRAIL-R2 receptor, except for TSA and apicidin in CEM-6 cells and TSA in Jurkat cells (Fig. 5A). In contrast, after treatment with the same non-toxic concentrations of HDACi there was no up-regulation of TRAIL-R1 expression (data not



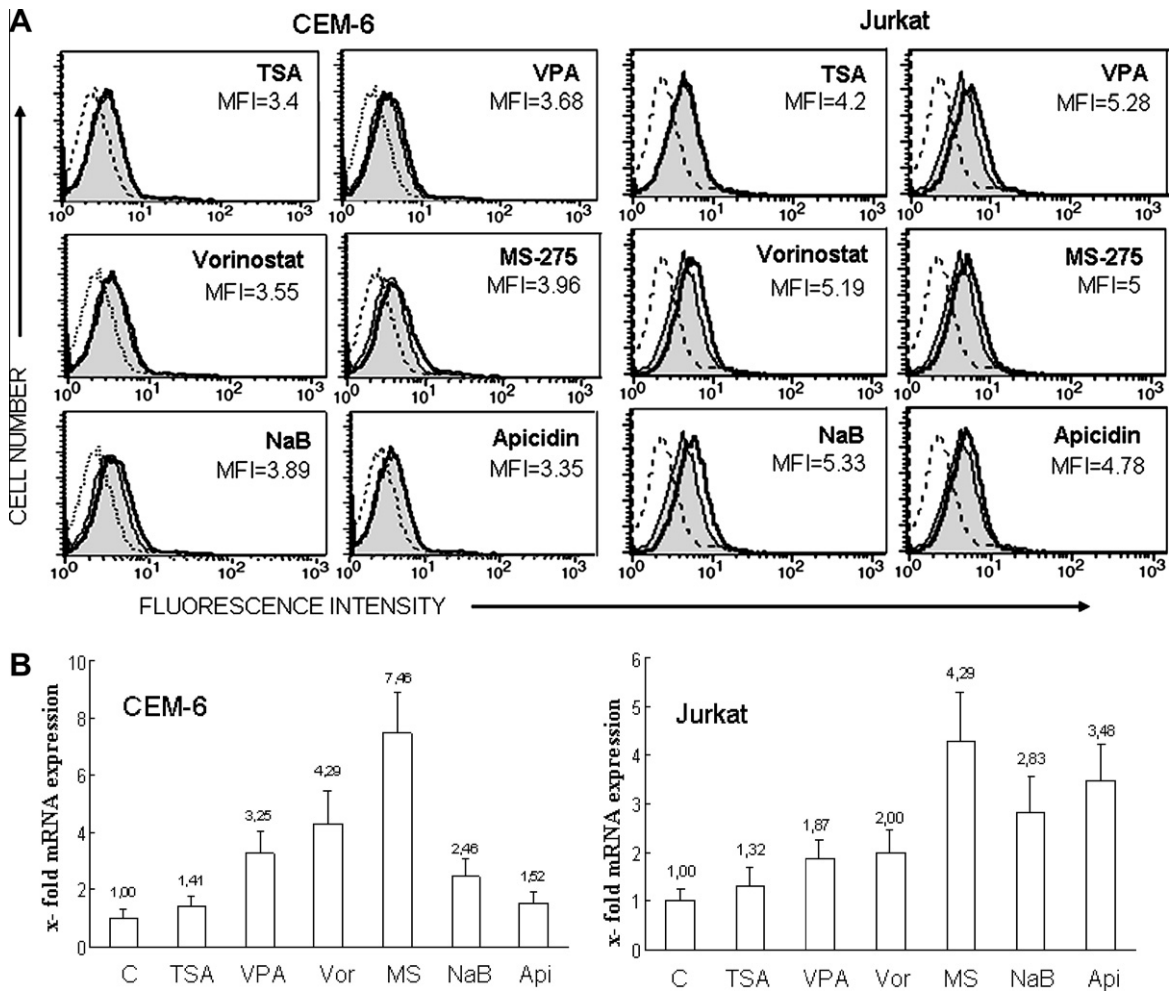
**Fig. 4.** HDACi enhance TRAIL-induced caspase activation in leukemic T cells. (A) CEM-6 and Jurkat cells were preincubated for 4 h with 10 ng/ml TSA, 1 mM VPA, 0.5  $\mu$ M vorinostat (Vor), 1  $\mu$ M MS-275 (MS), 0.5 mM NaB or 50 nM apicidin (Api) before treatment without or with 100 ng/ml recombinant TRAIL for 20 h. Activation of caspase-8, -9 and -3 was determined by Western-blot. (B) Jurkat cells were preincubated for 1 h in the absence or in the presence of the caspase inhibitors Z-VAD-FMK, Z-IETD-FMK or Z-LEHD-FMK (20  $\mu$ M) and then treated with HDACi for 4 h before adding TRAIL, as in (A). The percentage of sub-G1 apoptotic cells was determined by flow cytometry. Results shown are representative of at least three independent experiments.

shown). We also analyzed the regulation of TRAIL-R2 expression in primary T cells. Both resting and activated T lymphocytes expressed barely detectable levels of TRAIL-R2 [27] and no change in the expression was observed upon treatment with HDACi (data not shown). To further confirm the regulation of TRAIL-R2 in leukemic T cell lines we determined mRNA receptor expression by real-time PCR. We observed that all HDACi increased the expression of TRAIL-R2 mRNA in Jurkat cells but the effect of TSA was minimal, compared to the rest of HDACi (Fig. 5B). In CEM-6 and MOLT-4 cells, not only TSA but also apicidin exerted a negligible effect in the expression of TRAIL-R2 mRNA (Fig. 5B and data not shown). These results are in agreement with that of surface TRAIL-R2 analysis and suggest that the ability to regulate gene expression may vary between cell lines and HDACi.

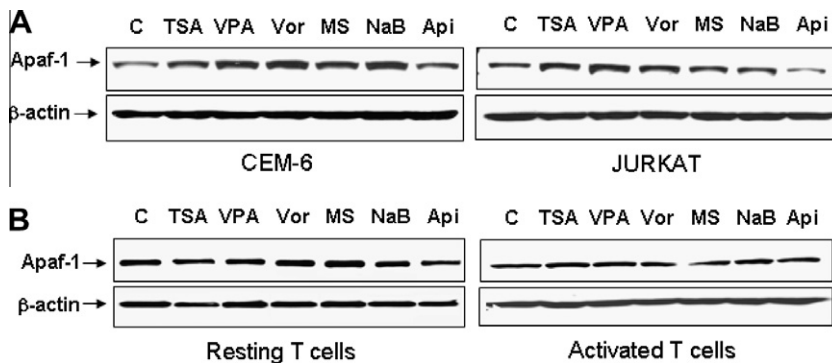
Next, we determined the expression of different factors involved in the extrinsic apoptotic pathway, such as caspase-8, FADD and c-FLIP. We found no changes in the levels of caspase-8 and FADD (Fig. 4A and data not shown). Regarding the anti-apoptotic protein c-FLIP, all HDACi, except for TSA and apicidin, seemed to reduce the expression of the long isoform, c-FLIP<sub>L</sub>, in leukemic T cell lines, but the expression of the short isoform, c-FLIP<sub>S</sub>, could not be detected by Western-blot (data not shown). We further analyzed the expression of several proteins involved in the mitochondrial apoptotic pathway and no changes were observed in the levels of Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, XIAP, c-IAP1, c-IAP2, Bim or Smac/DIABLO upon treatment with any of the HDACi (data not shown). In contrast, we found a clear increase in the expression of Apaf-1 in response to treatment with all HDACi but apicidin in all cell lines (Fig. 6A). As expected, HDACi did not regulate the levels of Apaf-1 in primary normal T lymphocytes (Fig. 6B).

### 3.4. HDACi do not increase TRAIL-induced apoptosis in leukemic T cells overexpressing Bcl-2

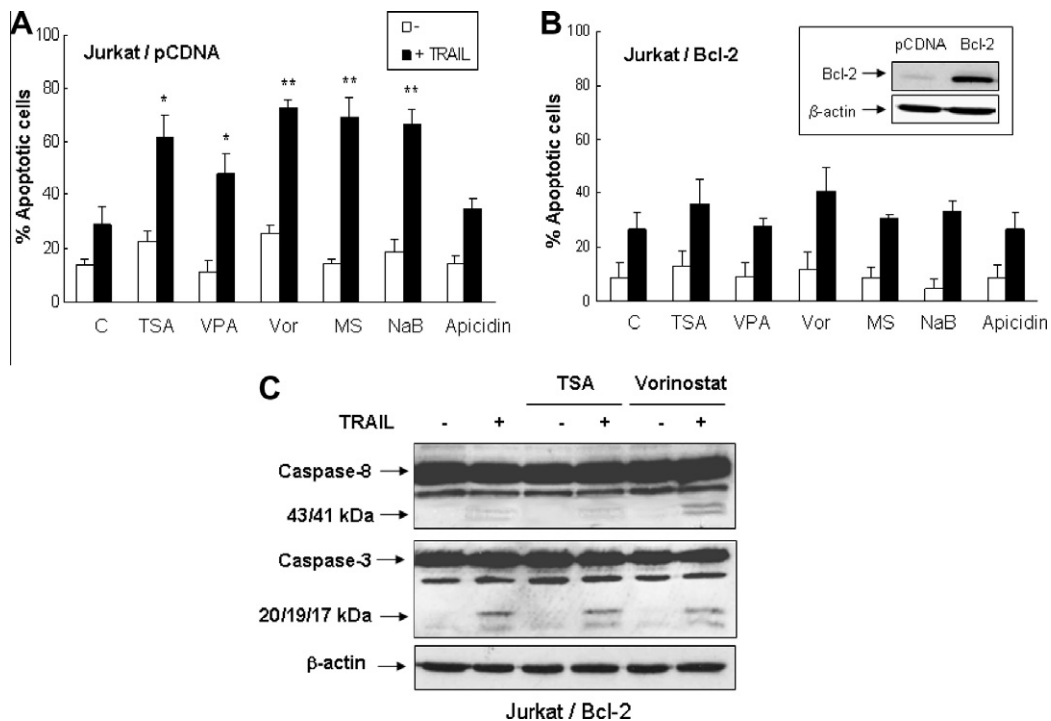
To establish the requirement of mitochondrial signals in the induction of apoptosis by HDACi and TRAIL in leukemic T cells, we examined the effect of this combined treatment in Jurkat cells overexpressing the anti-apoptotic protein Bcl-2. Prevention of TRAIL-mediated apoptosis by Bcl-2 is complex as it depends on the dose of TRAIL as well as the levels of Bcl-2 expression [8,34]. We found that overexpression of Bcl-2 failed to protect Jurkat cells from TRAIL-induced apoptosis at the dose used in this study (Fig. 7A and B). However, no significant sensitizing effect of HDACi was observed in Bcl-2-overexpressing cells (Fig. 7B) thus suggesting that regulation of mitochondrial factors and signals may play an essential role in the synergistic effect of HDACi and TRAIL. Interestingly, apicidin did not facilitate TRAIL-induced apoptosis in mock-transfected Jurkat cells, used as control of Bcl-2-overexpressing cells (Fig. 7A), which may be related to the existence of different Jurkat subclones that derived from different sources. In addition, we compared the effect on caspase activation in Jurkat Bcl-2 cells of two HDACi (i.e., vorinostat and TSA) showing different ability to regulate the expression of TRAIL-R2 and c-FLIP, that is, factors of the TRAIL signalling pathway acting upstream of mitochondrial events. As it was expected, pre-treatment with vorinostat, but not with TSA, increased TRAIL-induced activation of caspase-8 in Bcl-2 overexpressing cells (Fig. 7C). Even though, neither of them was able to enhance caspase-3 activation in response to TRAIL, in agreement with data of sub-G1 apoptotic cells (Fig. 7B and C).



**Fig. 5.** HDACi up-regulate the expression of TRAIL-R2 in leukemic cells. (A) Cell surface TRAIL-R2 receptor expression was analyzed by flow cytometry in CEM-6 and Jurkat cells after treatment without (shaded peaks) or with (unshaded peaks) 10 ng/ml TSA, 1 mM VPA, 0.5 μM vorinostat, 1 μM MS-275, 0.5 mM NaB or 50 nM apicidin for 20 h. Dashed lines represent background fluorescence with secondary antibody alone. MFI, median fluorescence intensity for TRAIL-2 expression in cells treated as indicated. The MFI values of untreated CEM and Jurkat cells were 3.4 and 4.25, respectively. (B) TRAIL-R2 mRNA levels were determined by real-time PCR in CEM-6 and Jurkat cells after treatment with HDACi as in (A) for 15 h. Experiments were done in triplicate and results were normalized to the expression of 18S rRNA for all samples. Error bars show SD from triplicate samples. Data shown in all panels are representative of at least two independent experiments.



**Fig. 6.** Apaf-1 is up-regulated in response to treatment with HDACi in leukemic T cells. (A) CEM-6, Jurkat, (B) resting and activated T cells were treated with 10 ng/ml TSA, 1 mM VPA, 0.5 μM vorinostat (Vor), 1 μM MS-275 (MS), 0.5 mM NaB or 50 nM apicidin (Api) for 20 h. Apaf-1 protein expression was determined by Western-blot and β-actin was used as control of loaded protein. Data shown are representative of at least three independent experiments.



**Fig. 7.** Bcl-2 overexpression inhibits HDACi mediated sensitization to TRAIL in Jurkat cells. (A) Mock-transfected Jurkat cells (Jurkat/pCDNA) and (B) Bcl-2-overexpressing Jurkat cells (Jurkat/Bcl-2) were preincubated without (control, C) or with 10 ng/ml TSA, 1 mM VPA, 0.5 μM vorinostat (Vor), 1 μM MS-275 (MS), 0.5 mM NaB or 50 nM apicidin for 4 h. After preincubation, cells were treated with or without 100 ng/ml recombinant TRAIL for 20 h. The percentage of sub-G1 apoptotic cells was determined by flow cytometry. Error bars show SD from three independent experiments. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Inset in figure (B) shows levels of Bcl-2 and β-actin in mock-transfected and Bcl-2-overexpressing Jurkat cells, as determined by Western-blot. (C) Activation of caspase-8 and -3 was determined by Western-blot in Jurkat/Bcl-2 cells incubated with or without 100 ng/ml TRAIL for 20 h after pre-treatment with 10 ng/ml TSA or 0.5 μM vorinostat for 4 h. β-actin was used as control of loaded protein. Data shown are representative of three independent experiments.

#### 4. Discussion

HDAC inhibitors have been recently proposed as a valuable therapeutic strategy to improve the sensitivity of tumor cells to TRAIL-induced apoptosis by regulating the expression of pro- and anti-apoptotic factors. To date, most of the studies have focused on the effects of two or three HDACi in some tumor cell types [18–21,32]. The variability in the results from different groups suggests that the pattern of gene regulation by HDACi may depend not only on the cell type but also on the chemical structure of the inhibitor. Few studies have investigated the effect of HDACi on the sensitivity of human leukemic T cells to TRAIL-mediated apoptosis, and all of them used the Jurkat cell line as the model of T-cell leukaemia [19,32,35]. Here, for the first time, we have simultaneously compared the ability of six different HDACi, belonging to the four classic structural families, to potentiate TRAIL-induced apoptosis in three leukemic T cell lines. With the exception of apicidin, pre-treatment with all HDACi increased the percentage of apoptotic cells and the activation of caspases -8, -9 and -3 induced by TRAIL in CEM-6, Jurkat and MOLT-4 cells. Interestingly, apicidin only regulated TRAIL sensitivity in a certain subclone of Jurkat cells.

The analysis of several genes of the extrinsic and the intrinsic apoptotic pathways revealed that the pro-apoptotic factors TRAIL-R2 and Apaf-1 were up-regulated, and the

anti-apoptotic protein c-FLIP down-modulated, in different leukemic T cell lines in response to treatment with vorinostat, VPA, NaB and MS-275. In contrast, TSA only regulated the expression of Apaf-1. In agreement with our results, the expression of TRAIL-R2 has been previously reported to be regulated by vorinostat, NaB and MS-275 in Jurkat cells [19,32]. Additionally, these authors describe the regulation of TRAIL-R2 in response to TSA but discrepancies between these reports and our data may be due to the different doses of TSA used. Our most interesting finding about TSA is that non-toxic doses of this HDACi may potentiate TRAIL-induced apoptosis in leukemic T cells without affecting the expression of TRAIL-R2. These results also suggest that regulation of Apaf-1, and therefore the mitochondrial pathway, may be involved in the sensitization to TRAIL-induced apoptosis. In relation with this hypothesis, we demonstrated that overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 inhibited the synergistic effect of all HDACi on TRAIL-mediated apoptosis, without affecting the induction of apoptosis by TRAIL alone. In this respect, our results are similar to that obtained by Shankar et al. with Jurkat cells overexpressing either Bcl-2 or Bcl-x<sub>L</sub>, although they observed inhibition of apoptosis induced by TRAIL alone and in combination with HDACi [19]. In contrast, other authors have described the enhancement of TRAIL-induced apoptosis in Bcl-x<sub>L</sub>-overexpressing Jurkat cells by high doses of TSA [25]. It is possible that, in addi-

tion to the dose of TRAIL and the expression levels of Bcl-2 proteins [8,34], the dose of HDACi used may affect the response of Bcl-2-overexpressing cells. Our results further showed that HDACi did not potentiate TRAIL-induced apoptosis in Jurkat Bcl-2 cells even when a clear increase in apical caspase-8 activation occurred, as it was observed after pre-treatment with vorinostat. These are interesting results since they confirm that, regardless of the regulation of TRAIL-R2 and c-FLIP expression, modulation of mitochondrial signals also play a key role in the sensitizing effect of HDACi in leukemic T cells. In addition, they explain why TSA synergizes with TRAIL in the absence of regulation of proteins involved in the extrinsic apoptotic pathway. The increase in TRAIL-induced caspase-8 activation observed after pre-treatment with TSA in leukemic T cells is probably due to a mitochondria-mediated amplification feedback loop.

Concerning apicidin our results are striking as it induced histone acetylation in a similar way to other HDACi in both Jurkat and CEM cells but its sensitizing effect was only evident in Jurkat cells by regulating the expression of TRAIL-R2. To our knowledge, there is no other published data about the effect of apicidin in combination with TRAIL, apart from a recent report by Park et al. describing the sensitization of K562 erythroleukemia cells to TRAIL-induced apoptosis through a caspase-dependent mitochondrial pathway [36]. Interestingly depsiptide, an HDACi from the same structural family as apicidin, has been shown to up-regulate the expression of TRAIL-R2 and to increase DISC formation in Jurkat cells [25], which could support our results. However, we cannot rule out the possibility that apicidin may be regulating other apoptosis-related factors that contribute to its sensitizing effect. Further studies on the effects of apicidin in different cell lines will help clarify the selective effect of this HDACi but, on the whole, results with apicidin suggest that this HDACi is not the one of choice for facilitating TRAIL-induced apoptosis in leukemic T cells.

Differences found in the mechanism of action of HDACi and their ability to enhance TRAIL-induced apoptosis in leukemic T cells may come from their different selectivity against diverse classes of HDAC [15,16]. In addition, different HDACi, even belonging to the same structural group, show different selectivity and potency toward different isoforms of the same HDAC class. For instance, MS-275 does not inhibit the class I isoform HDAC8; and TSA seems to be more potent against some class II isoforms than vorinostat. Considering all these data it is tempting to speculate that, except for HDAC8, class I HDAC play a major role in the regulation of the sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in leukemic T cells, which is in agreement with a previous study in chronic lymphocytic leukaemia cells [37]. Interestingly, enhanced expression of class I rather than class II HDAC isoforms seems to be associated with cell survival and worse tumor prognosis [24,38]. We have determined the expression of some HDAC isoforms in leukemic T cell lines. Concerning class I HDAC, the results of this study indicate that Jurkat cells express similar levels of HDAC1 but lower levels of HDAC2 and HDAC3 than CEM-6 and MOLT-4 cell lines (data not shown). These are interesting results as the response to HDACi is similar in

all cell lines. However, they might explain the peculiar behaviour of apicidin, which is a selective inhibitor of HDAC2 and HDAC3 [16]. We can hypothesize that apicidin is less potent than other HDACi and, therefore, it is only able to show activity in cells with low levels of HDAC, that is, Jurkat cells.

Several HDACi are currently in clinical trials as anti-cancer drugs. In particular, vorinostat has been approved for the treatment of cutaneous manifestations in patients with cutaneous T cell lymphoma who have progressive, persistent or recurrent disease on or following two systemic therapies [38,39]. Although the molecular mechanism responsible for the selective action of HDACi in cancer cells is not completely understood, global chromatin alterations associated with oncogenic transformation might at least in part account for their different activity against tumor and normal cells. In addition, alterations in the expression and function of HDAC enzymes have been found in many human cancers [24]. Regarding the therapeutic potential of combined treatment with HDACi and TRAIL, few studies have paid attention to the outcome of this combination in normal cells [21,25,26,32]. We had previously reported that valproic acid did not regulate TRAIL resistance in primary T cells [27]. Now, we have simultaneously analyzed the effect of the six already mentioned HDACi in primary resting and activated T lymphocytes. The effect in the last ones is interesting as they are similar to tumor cells in terms of proliferative potential. Higher doses of TSA and vorinostat showed low toxicity toward activated T lymphocytes, which might be associated with their activity as broad-spectrum inhibitors. It is not surprising that resting and activated T lymphocytes showed different sensitivity to these HDACi as their mechanisms of apoptosis regulation are different [27,40]. In contrast, at the selected doses that are effective in potentiating TRAIL-induced apoptosis in leukemic T cells, HDACi neither showed toxicity nor regulated TRAIL resistance in primary T lymphocytes, despite their ability to increase histone acetylation in these cells. Overall, our data emphasize the necessity of thoroughly selecting specific HDACi that show safety and efficacy in combined therapeutic strategies with TRAIL for the treatment of T-cell leukemia.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### Acknowledgments

We would like to thank Dr. Abelardo López-Rivas for invaluable advice. This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (Grant PI060712 to C.R.-R.). J.C.M. was supported by a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia.

### References

- [1] M. MacFarlane, M. Ahmad, S.M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri, G.M. Cohen, E.S. Alnemri, Identification and molecular cloning of two



- novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 25417–25420.
- [2] G. Pan, K. O'Rourke, A.M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, V.M. Dixit, The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL, *Science* 276 (1997) 111–113.
  - [3] H. Walczak, M.A. Degli-Esposti, R.S. Johnson, P.J. Smolak, J.Y. Waugh, N. Boiani, M.S. Timour, M.J. Gerhart, K.A. Schooley, C.A. Smith, R.G. Goodwin, C.T. Rauch, TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL, *EMBO J.* 16 (1997) 5386–5397.
  - [4] A.M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, M. Tewari, V.M. Dixit, FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis, *Cell* 81 (1995) 505–512.
  - [5] M.R. Sprick, M.A. Weigand, E. Rieser, C.T. Rauch, P. Juo, J. Blenis, P.H. Kramer, H. Walczak, FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2, *Immunity* 12 (2000) 599–609.
  - [6] M. MacFarlane, N. Harper, R.T. Snowden, M.J. Dyer, G.A. Barnett, J.H. Pringle, G.M. Cohen, Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in primary B cell chronic lymphocytic leukaemia, *Oncogene* 21 (2002) 6809–6818.
  - [7] D. Siegmund, P. Hadwiger, K. Pfizenmaier, H.P. Vornlocher, H. Wajant, Selective inhibition of FLICE-like inhibitory protein expression with small interfering RNA oligonucleotides is sufficient to sensitize tumor cells for TRAIL-induced apoptosis, *Mol. Med.* 8 (2002) 725–732.
  - [8] C. Ruiz de Almodovar, C. Ruiz-Ruiz, C. Munoz-Pinedo, G. Robledo, A. Lopez-Rivas, The differential sensitivity of Bcl-2-overexpressing human breast tumor cells to TRAIL or doxorubicin-induced apoptosis is dependent on Bcl-2 protein levels, *Oncogene* 20 (2001) 7128–7133.
  - [9] J.M. Cummins, M. Kohli, C. Rago, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, F. Bunz, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is a nonredundant modulator of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis in human cancer cells, *Cancer Res.* 64 (2004) 3006–3008.
  - [10] L. Li, R.M. Thomas, H. Suzuki, J.K. De Brabander, X. Wang, P.G. Harran, A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNF $\alpha$ -mediated cell death, *Science* 305 (2004) 1471–1474.
  - [11] S.K. Kurdistani, Histone modifications as markers of cancer prognosis: a cellular view, *Br. J. Cancer* 97 (2007) 1–5.
  - [12] P.A. Marks, V.M. Richon, R. Breslow, R.A. Rifkind, Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs, *Curr. Opin. Oncol.* 13 (2001) 477–483.
  - [13] R. Somech, S. Izraeli, A. J. Simon, Histone deacetylase inhibitors – a new tool to treat cancer, *Cancer Treat. Rev.* 30 (2004) 461–472.
  - [14] V. Santini, A. Gozzini, G. Ferrari, Histone deacetylase inhibitors: molecular and biological activity as a premise to clinical application, *Curr. Drug Metab.* 8 (2007) 383–393.
  - [15] L. Blackwell, J. Norris, C.M. Suto, W.P. Janzen, The use of diversity profiling to characterize chemical modulators of the histone deacetylases, *Life Sci.* 82 (2008) 1050–1058.
  - [16] N. Khan, M. Jeffers, S. Kumar, C. Hackett, F. Boldog, N. Khramtsov, X. Qian, E. Mills, S.C. Berghs, N. Carey, P.W. Finn, L.S. Collins, A. Tumber, J.W. Ritchie, P.B. Jensen, H.S. Lichenstein, M. Sehested, Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors, *Biochem. J.* 409 (2008) 581–589.
  - [17] M.J. Peart, G.K. Smyth, R.K. van Laar, D.D. Bowtell, V.M. Richon, P.A. Marks, A.J. Holloway, R.W. Johnstone, Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 3697–3702.
  - [18] T.E. Fandy, S. Shankar, D.D. Ross, E. Sausville, R.K. Srivastava, Interactive effects of HDAC inhibitors and TRAIL on apoptosis are associated with changes in mitochondrial functions and expressions of cell cycle regulatory genes in multiple myeloma, *Neoplasia* 7 (2005) 646–657.
  - [19] S. Shankar, T.R. Singh, T.E. Fandy, T. Luetrakul, D.D. Ross, R.K. Srivastava, Interactive effects of histone deacetylase inhibitors and TRAIL on apoptosis in human leukemia cells: involvement of both death receptor and mitochondrial pathways, *Int. J. Mol. Med.* 16 (2005) 1125–1138.
  - [20] T.R. Singh, S. Shankar, R.K. Srivastava, HDAC inhibitors enhance the apoptosis-inducing potential of TRAIL in breast carcinoma, *Oncogene* 24 (2005) 4609–4623.
  - [21] X.D. Zhang, S.K. Gillespie, J.M. Borrow, P. Hersey, The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate: a potential sensitizer of melanoma to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induced apoptosis, *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 1537–1545.
  - [22] A. Insinga, S. Monestiroli, S. Ronzoni, V. Gelmetti, F. Marchesi, A. Viale, L. Altucci, C. Nervi, S. Minucci, P.G. Pelicci, Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway, *Nat. Med.* 11 (2005) 71–76.
  - [23] A. Nebbioso, N. Clarke, E. Voltz, E. Germain, C. Ambrosino, P. Bontempo, R. Alvarez, E.M. Schiavone, F. Ferrara, F. Bresciani, A. Weisz, A.R. de Lera, H. Gronemeyer, L. Altucci, Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells, *Nat. Med.* 11 (2005) 77–84.
  - [24] M. Dokmanovic, P.A. Marks, Prospects: histone deacetylase inhibitors, *J. Cell. Biochem.* 96 (2005) 293–304.
  - [25] S. Inoue, M. MacFarlane, N. Harper, L.M.C. Wheat, M.J.S. Dyer, G.M. Cohen, Histone deacetylase inhibitors potentiate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in lymphoid malignancies, *Cell Death Differ.* 11 (2004) S193–S206.
  - [26] R.L. VanOosten, J.K. Earell Jr., T.S. Griffith, Enhancement of Ad5-TRAIL cytotoxicity against renal cell carcinoma with histone deacetylase inhibitors, *Cancer Gene Ther.* 13 (2006) 628–632.
  - [27] J.C. Morales, M.J. Ruiz-Magana, C. Ruiz-Ruiz, Regulation of the resistance to TRAIL-induced apoptosis in human primary T lymphocytes: role of NF- $\kappa$ B inhibition, *Mol. Immunol.* 44 (2007) 2587–2597.
  - [28] J. Gong, F. Traganos, Z. Darzynkiewicz, A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry, *Anal. Biochem.* 218 (1994) 314–319.
  - [29] S. Ronzoni, M. Faretta, M. Ballarini, P. Pelicci, S. Minucci, New method to detect histone acetylation levels by flow cytometry, *Cytometry A* 66 (2005) 52–61.
  - [30] M.C. Ruiz-Ruiz, A. Lopez-Rivas, P53-mediated up-regulation of CD95 is not involved in genotoxic drug-induced apoptosis of human breast tumor cells, *Cell Death Differ.* 6 (1999) 271–280.
  - [31] J.W. Cheong, S.Y. Chong, J.Y. Kim, J.I. Eom, H.K. Jeung, H.Y. Maeng, S.T. Lee, Y.H. Min, Induction of apoptosis by apicidin, a histone deacetylase inhibitor, via the activation of mitochondria-dependent caspase cascades in human Bcr-Abl-positive leukemia cells, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 5018–5027.
  - [32] S. Nakata, T. Yoshida, M. Horinaka, T. Shiraishi, M. Wakada, T. Sakai, Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells, *Oncogene* 23 (2004) 6261–6271.
  - [33] R.R. Rosato, J.A. Almenara, Y. Dai, S. Grant, Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells, *Mol. Cancer Ther.* 2 (2003) 1273–1284.
  - [34] J. Rudner, V. Jendrossek, K. Lauber, P.T. Daniel, S. Wesselborg, C. Belka, Type I and type II reactions in TRAIL-induced apoptosis – results from dose-response studies, *Oncogene* 24 (2005) 130–140.
  - [35] F. Guo, C. Sigua, J. Tao, P. Bali, P. George, Y. Li, S. Wittmann, L. Moscinski, P. Atadja, K. Bhalla, Cotreatment with histone deacetylase inhibitor LAQ824 enhances Apo-2L/tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced death inducing signaling complex activity and apoptosis of human acute leukemia cells, *Cancer Res.* 64 (2004) 2580–2589.
  - [36] S.J. Park, M.J. Kim, H.B. Kim, H.Y. Sohn, J.H. Bae, C.D. Kang, S.H. Kim, Cotreatment with apicidin overcomes TRAIL resistance via inhibition of Bcr-Abl signaling pathway in K562 leukemia cells, *Exp. Cell Res.* 315 (2009) 1809–1818.
  - [37] S. Inoue, A. Mai, M.J. Dyer, G.M. Cohen, Inhibition of histone deacetylase class I but not class II is critical for the sensitization of leukemic cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis, *Cancer Res.* 66 (2006) 6785–6792.
  - [38] M. Dokmanovic, C. Clarke, P.A. Marks, Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives, *Mol. Cancer Res.* 5 (2007) 981–989.
  - [39] P.A. Marks, Discovery and development of SAHA as an anticancer agent, *Oncogene* 26 (2007) 1351–1356.
  - [40] S. Wesselborg, O. Janssen, D. Kabelitz, Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells, *J. Immunol.* 150 (1993) 4338–4345.

# IJC

International Journal of Cancer

Ref.: IJC-10-2264.R1  
15 March 2011

Dr. Carmen Ruiz-Ruiz  
University of Granada  
IBIMER, Centro de Investigación Biomédica, Avda. del Conocimiento s/n  
Armillá  
18100 Granada  
Spain

Dear Dr. Ruiz-Ruiz:

We are pleased to inform you that your manuscript "The DNA-methyltransferase inhibitors zebularine and decitabine induce mitochondria-mediated apoptosis and DNA damage in p53 mutant leukemic T cells" by Ruiz-Magaña, María J.; Rodríguez-Vargas, Jose M.; Morales, Jorge C.; Saldivia, Manuel A.; Schulze-Osthoff, Klaus; Ruiz-Ruiz, Carmen has been accepted for publication in the International Journal of Cancer.

Thank you for supporting the Journal with this interesting contribution.

Sincerely yours,



Prof. Peter Lichter  
Editor-in-Chief

---

Editor-in-Chief, Peter Lichter

Assoc. Editors, Heike Allgayer, Helmut Bartsch, Norbert Fusenig, Kari Hemminki, Bruno Kyewski, Anthony B. Miller,  
Magnus v. Knebel-Doeberitz

Tel.: 49-6221-424800; Fax: 49-6221-424809; E-mail: [intjcanc@dkfz.de](mailto:intjcanc@dkfz.de)  
Deutsches Krebsforschungszentrum, Im Neuenheimer Feld 242, 69120 Heidelberg, Germany  
[www.intjcancer.org](http://www.intjcancer.org)

**The DNA-methyltransferase inhibitors zebularine and decitabine induce mitochondria-mediated apoptosis and DNA damage in p53 mutant leukemic T cells.**

María J. Ruiz-Magaña<sup>1</sup>, Jose M. Rodríguez-Vargas<sup>2</sup>, Jorge C. Morales<sup>1</sup>, Manuel A. Saldivia<sup>1</sup>, Klaus Schulze-Osthoff<sup>3</sup> and Carmen Ruiz-Ruiz<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Inmunología, IBIMER, Universidad de Granada, Granada, Spain. <sup>2</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada, Spain. <sup>3</sup>Interfaculty Institute of Biochemistry, University of Tübingen, Tübingen, Germany.

**\*Corresponding author:** Carmen Ruiz-Ruiz, IBIMER, Centro de Investigación Biomédica, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Tel: 34-958-241000, ext. 20025; Fax: 34-958-249015; e-mail address: mcarmenr@ugr.es

**Short title:** Induction of apoptosis by decitabine and zebularine in leukemic T cells.

**Keywords:** Decitabine, zebularine, leukemia, apoptosis.

**Abbreviations:** DNMT, DNA methyltransferase; ROS, reactive oxygen species;  $\Delta\Psi_m$ , mitochondrial membrane potential; DiOC<sub>6</sub>(3), 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide; DHE, dihydroethidium; SOD, superoxide dismutase.

**Article category:** Cancer therapy

**Novelty and impact:** This study compares the ability of decitabine and zebularine to selectively induced apoptosis in leukemic T cells and characterizes the mechanism of apoptosis induction. Results indicate that both demethylating agents may constitute safe and effective antitumor drugs for the treatment of p53 mutant leukemic T cells.

## **Abstract**

DNA methyltransferase (DNMT)-inhibiting nucleoside analogs reactivate the expression of tumor suppressor genes and apoptosis-related genes silenced by methylation, thus favoring the induction of apoptosis in tumor cells. Moreover, induction of DNA damage seems to contribute to their antitumor effect. However, the apoptotic signaling pathway induced by these demethylating drugs is not well understood. Here we have investigated the induction of apoptosis by two nucleoside DNMT inhibitors, decitabine and zebularine, in leukemic T cells. Both inhibitors induced caspase-dependent apoptosis in Jurkat, CEM-6 and MOLT-4 leukemia T-cell lines, all with mutant p53, while resting and activated normal T lymphocytes were highly resistant to these demethylating agents. Although decitabine and zebularine showed different ability to induce apoptosis and cell cycle arrest among the three cell lines, they similarly activated the intrinsic apoptotic pathway by inducing mitochondrial alterations such as Bak activation, loss of transmembrane potential and generation of reactive oxygen species (ROS). Accordingly, Bcl-2- and Bcl-x<sub>L</sub>-overexpressing Jurkat cells, as well as caspase-9-deficient Jurkat cells, were resistant to apoptosis induced by decitabine and zebularine. Interestingly, ROS production seemed to be necessary for the induction of apoptosis. Apoptotic events, such as Bak and caspase activation, started as soon as 20 hours after treatment with either decitabine or zebularine. In addition, progression of apoptosis triggered by both DNMT inhibitors was paralleled by the induction of DNA damage. Our results suggest that the mitochondrial apoptotic pathway activated by decitabine and zebularine in p53 mutant leukemic T cells depends mainly on the induction of DNA damage.

## **Introduction**

Abnormal DNA methylation of CpG sequences is one of the most common epigenetic modifications observed in tumors. Hypermethylation of promoter regions of tumor suppressor genes causes their silencing, thus favoring tumor progression.<sup>1-3</sup> This has focused attention on drugs that reactivate methylated cancer genes as a promising antitumor strategy.

The cytosine nucleoside analogs 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) are the best known demethylating agents.<sup>4</sup> These compounds are metabolized and phosphorylated inside the cell and then incorporated into DNA, where they are recognized by DNA methyltransferases (DNMT), the enzymes responsible for DNA methylation. The covalent complexes formed by the abnormal bases and DNMT result in degradation of the trapped enzymes.<sup>5</sup> Both DNMT inhibitors have been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of myelodysplastic syndromes (MDS), despite being quite toxic and unstable.<sup>5,6</sup> Another cytidine analog, zebularine, although originally described as a cytidine deaminase inhibitor, also has DNA demethylating activity. In vitro and in vivo studies have demonstrated that zebularine is highly stable and shows minimal toxicity.<sup>7,8</sup> It exhibits selective activity against various cancer cells as compared to normal fibroblasts.<sup>9</sup>

Tumor cell exposure to demethylating agents causes the upregulation of cell cycle-associated genes, such as p14, p15 or p16, and genes related to the induction of apoptosis, such as caspase-8 or Apaf-1, that are silenced by hypermethylation.<sup>3,10-13</sup> As a consequence, demethylating agents induce cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells and sensitize them to other chemotherapeutic drugs.<sup>12,13</sup> On the other hand, nucleoside DNMT inhibitors are able to form complexes with DNA-DNMT that induce DNA damage and cytotoxicity,<sup>14,15</sup> which suggests that these DNMT inhibitors may exert

their antitumoral effects by both mechanisms, dependent and independent of their demethylating action. Several reports have discussed the contribution of these two mechanisms of action, hypomethylation and DNA damage, the involvement of the tumor suppressor protein p53 and the role of the mitochondria in the induction of apoptosis by decitabine, particularly in myeloid leukemias.<sup>15-18</sup> In contrast, much less is known about the signals involved in zebularine-induced apoptosis.

Aberrant DNA methylation has been reported to be associated with gene silencing in T-cell acute lymphoblastic leukemia.<sup>19-21</sup> Moreover, the methylation status of several genes seems to correlate with the tumor response to treatment and the outcome of patients,<sup>19,22</sup> which suggest the therapeutic potential of DNMT inhibitors in this hematologic malignancy. Nevertheless, the cytotoxic effect of demethylating agents in leukemic T cells has not been described in detail. The aim of the present study was to compare and characterize the induction of apoptosis by zebularine and decitabine in leukemic and normal T cells. Our results show that both DNMT inhibitors similarly activated the intrinsic apoptotic pathway in leukemic T cells in a p53-independent manner, at doses that, especially in the case of zebularine, were non-toxic for normal T lymphocytes. In addition, apoptosis induced by both inhibitors occurred simultaneously to the induction of DNA damage. However, differences were found in the ability of decitabine and zebularine to induce cell cycle arrest, as well as in the sensitivity of leukemic T cell lines to both demethylating agents.

## **Materials and methods**

### **Reagents and antibodies**

5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine), dihydroethidium, phytohemagglutinin, mouse anti- $\beta$ -actin antibody and monoclonal anti-p53 antibody were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). 1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-one, 2-pyrimidone-1- $\beta$ -D-ribose (zebularine), anti-Bak (Ab-1) monoclonal antibody and anti-Chk1 (pSer<sup>317</sup>) rabbit polyclonal antibody were obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Z-VAD-FMK, a wide spectrum caspase inhibitor, was from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Mouse anti-human CD28 was from eBioscience (San Diego, CA). Anti-human caspase-8 monoclonal antibody was purchased from Cell Diagnostica (Munster, Germany). Anti-human caspase-9 monoclonal antibody was from R&D Systems (Minneapolis, MN). Mouse anti-PARP was from BD Biosciences (San Jose, CA). Monoclonal antibody anti-Bcl-2 was from Dako (Glostrup, Denmark). Mouse monoclonal antibody against Bcl-x<sub>L</sub> and monoclonal antibody anti-histone H1 were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Mouse monoclonal DNMT1 antibody was from Abcam (Cambridge, UK). Anti-phospho-histone H2AX (Ser139) monoclonal antibody was from Upstate/Millipore (Billerica, MA). Rabbit polyclonal antibody phospho-p95/Nbs1 (Ser343) was obtained from Cell Signaling Technology (Danver, MA). The fluorescent cationic lipophilic dye 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC<sub>6</sub>(3)) was from Molecular Probes (Carlsbad, CA). Manganese-porphyrin Mn(III)TMPyP was obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI).

### **Cells and cell culture**

Blood samples were obtained from healthy donors by informed consent and collected into citrates tubes. Peripheral blood T lymphocytes were then isolated and activated as

previously described.<sup>23</sup> The human leukemic T-cell lines Jurkat, CEM-6 and MOLT-4 were kindly provided by Dr. Abelardo López-Rivas (CABIMER, Sevilla, Spain). Jurkat cells deficient in caspase-9 and caspase-9-reconstituted Jurkat cells have been previously published.<sup>24</sup> Cell lines were all maintained in culture in RPMI 1640 medium with 10% fetal bovine serum (FBS), 1 mM L-glutamine, penicillin and streptomycin at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>, 95% air incubator. Jurkat cells stably overexpressing Bcl-2 and Bcl-x<sub>L</sub> were generously provided by Dr. Jacint Boix (Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Universidad de Lleida, Spain) and maintained in culture medium with 1 mg/ml G418 sulfate (Sigma Chemical Co.).

### **Cell cycle and apoptosis analyses**

Cell cycle profiles and hypodiploid apoptotic cells were detected by flow cytometry according to published procedures.<sup>25</sup> Briefly, cells were washed with PBS, fixed in cold 70% ethanol, and then stained with propidium iodide while treating with RNase. Cellular DNA content was measured in a FACScan cytometer with the Cell Quest software (BD Biosciences) and using logarithmic amplification for quantification of sub-G1 apoptotic cells and linear amplification for quantification of cells arrested in the G2/M phase.

### **Determination of mitochondrial membrane potential and ROS generation**

Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) and reactive oxygen species (ROS) production were analyzed by flow cytometry. Briefly, cells ( $2.5 \times 10^5$ ) were incubated in RPMI 1640 medium supplemented with 5% FBS and containing the oxidant-sensitive probe dihydroethidium (DHE, 2  $\mu$ M) and the fluorescent potentiometric dye DiOC<sub>6</sub>(3) (10 nM), for 20 min at 37°C in the dark, followed by quantitative analysis in a FACScan cytometer with the Cell Quest software.

### **Flow cytometry analysis of Bak activation**



For detection of activated Bak, cells ( $2.5 \times 10^5$ ) were washed in PBS, fixed in 0.25% paraformaldehyde for 5 min on ice and washed three times with PBS. Cells were then incubated with 1:50 anti-Bak antibody in staining buffer (PBS containing 1% FBS and 100  $\mu\text{g/ml}$  digitonin) for 30 min at room temperature. After washing, cells were incubated in staining buffer with 0.2  $\mu\text{g}$  Alexa Fluor 488-labeled goat anti-mouse (Molecular Probes) for 30 min at room temperature in the dark. Cells were washed and analyzed in a FACScan cytometer using the Cell Quest software.

### **Immunoblot detection of proteins**

Total protein extracts were prepared by lysing cells in ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 1% NP-40) for 30 min at 4°C. Proteins were resolved on SDS-PAGE minigels and detected as reported previously.<sup>26</sup> For detection of some nuclear proteins, nuclear extracts were obtained as described previously<sup>23</sup> and proteins were resolved as above.

### **Comet assay**

DNA damage was quantified using Comet Assay kit (R&D Systems) with some modifications.  $1 \times 10^5$  cells/ml were combined with molten LM agarose at 37°C at a ratio of 1:10 vol/vol and pipetted onto a CometSlide. The slides were placed for 10 min in the dark at 4°C before they were immersed in prechilled lysis solution. The slides were then removed from lysis buffer, washed in TBE buffer and transferred to a horizontal electrophoresis chamber. Voltage (1 V/cm) was applied for 20 min. After washing in distilled water, the slides were immersed in 70% ethanol for 5 min and allowed to air dry. Slides were stained with SYBR Green and then analyzed by fluorescence microscopy. 70–90 cells were evaluated in each sample using the Comet Assay Software Project (CASP). DNA damage was quantified by measuring the tail moment (TM) calculated as percentage of DNA in the tail  $\times$  tail length.

### **Statistical analysis**

The data were analyzed with unpaired Student's t-tests (two-tailed) by using GraphPad Prism 4 for Windows. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

## Results

### **Zebularine and decitabine induce caspase-dependent apoptosis selectively in leukemic T cells.**

The DNMT inhibitors decitabine and zebularine have been reported to induce apoptosis in different types of cancer cells as a consequence of their demethylating effect.<sup>17,27-30</sup> We analyzed the induction of apoptosis in p53 mutant leukemic T cell lines<sup>31,32</sup> upon treatment for two days with decitabine and zebularine, at doses similar to those previously described to induce hypomethylation in leukemia and other tumor cell lines.<sup>28,29,33,34</sup> Jurkat and MOLT-4 cells showed similar sensitivity to both, decitabine and zebularine. Significant apoptosis was observed in both cell lines with all doses used of these compounds, with the exception of 10  $\mu$ M zebularine (Fig. 1a). CEM-6 cells were less sensitive to zebularine than Jurkat and MOLT-4 cells, but concentrations above 10  $\mu$ M also induced significant apoptosis in this cell line (Fig. 1a, right panel). However, CEM-6 cells showed a very low sensitivity to decitabine (Fig. 1a, left panel). Next, we compared the effect of decitabine and zebularine in normal T lymphocytes. Decitabine at all doses used showed a slight and no significant toxicity against both, resting and activated T lymphocytes, while zebularine-induced toxicity was only observed at the higher dose of 250  $\mu$ M (Fig. 1b). To further study the effect and the mechanism of action of DNMT inhibitors in leukemia T-cell lines, we selected doses of 5  $\mu$ M decitabine and 50  $\mu$ M zebularine because of their ability to induce apoptosis in leukemic T cells and their limited toxicity for normal T lymphocytes, especially in the case of zebularine.

Cell cycle analysis performed to determine apoptotic cells in sub-G1 phase revealed that decitabine and zebularine not only differed in their ability to induce apoptosis in different leukemic T cell lines but also in their capacity to affect cell cycle progression.

Decitabine induced cell cycle arrest in G2/M phase in Jurkat and CEM-6 cells, but not in MOLT-4 cells, while zebularine had no effect on cell cycle distribution (Fig. 1c). These observations were confirmed by flow cytometric analysis of the DNA content of viable non-apoptotic cells on a linear scale (Fig. 1d). Interestingly, the sensitivity of the different cell lines to both DNMT inhibitors did not correlate with the modulation of cell cycle progression.

Next, we examined the time-course of apoptosis induction by decitabine and zebularine in the most sensitive cell lines, Jurkat and MOLT-4 cells. A significant percentage of apoptotic cells was detectable after 30 h of incubation with either demethylating agent (Fig. 2a and b). In addition, we determined the activation of caspases, as essential components of the apoptotic machinery in mammalian cells. Proteolytic processing of the initiator caspases-8 and -9, as well as cleavage of the effector caspase substrate PARP, was clearly observed as soon as 20 h after treatment with decitabine and zebularine in both cell lines (Fig. 2c and data not shown). Zebularine-induced apoptosis seemed to proceed with faster kinetics than cell death induced by decitabine (Fig. 2a-c). To confirm the involvement of caspases in apoptosis triggered by the DNMT inhibitors, we analyzed the effect of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK. As shown in Figure 2d, apoptosis induced by decitabine and zebularine was completely inhibited by Z-VAD-FMK.

### **Zebularine and decitabine activate the mitochondrial apoptotic pathway in leukemic T cells.**

To delineate the mechanism of DNMT inhibitors-induced apoptosis in leukemia T-cell lines we analyzed mitochondrial features of the intrinsic apoptotic pathway. Treatment of Jurkat cells with decitabine and zebularine resulted in loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) and generation of reactive oxygen species (ROS) (Fig. 3a).

Disruption of  $\Delta\psi_m$  seemed to precede ROS accumulation as cells in which mitochondria depolarization occurred without ROS production could be detected at 24 h after treatment. In contrast, all cells producing ROS showed low  $\Delta\psi_m$  (Fig. 3a). Similar results were found in MOLT-4 cells (data not shown).

The pro-apoptotic Bcl-2 family members Bax and Bak are essential for the initiation of mitochondrial dysfunction during apoptosis. Because Jurkat cells do not express Bax, we analyzed Bak activation by using an antibody which specifically recognizes its active conformation. As shown in Figure 3b, activation of Bak was slightly detected as soon as 20 h and increased with time of exposure to decitabine and zebularine. In agreement with the kinetics of caspase activation (Fig. 2c), time course of Bak activation also suggested that apoptotic signals are more rapidly triggered in response to zebularine (Fig. 3b).

The involvement of mitochondria in apoptosis induced by DNMT inhibitors was further supported by examining the effect of decitabine and zebularine in Jurkat cells overexpressing Bcl-2 or Bcl-x<sub>L</sub>. We observed that overexpression of these anti-apoptotic proteins completely prevented the appearance of sub-G1 apoptotic cells and the activation of caspases in response to treatment with DNMT inhibitors, as compared with mock-transfected Jurkat cells (Fig. 3c and d). The existence of different Jurkat subclones that derive from different sources may explain the lower sensitivity to decitabine of mock-transfected Jurkat cells in comparison with the Jurkat cells used above (Fig. 3c and 1a). We also demonstrated that decitabine and zebularine did not induce loss of  $\Delta\psi_m$  and ROS generation in Bcl-2- and Bcl-x<sub>L</sub>-overexpressing Jurkat cells (Fig. 3e).

**ROS production is involved in zebularine- and decitabine-induced apoptosis in leukemic T cells.**

To establish whether ROS production could play a role in the induction of cell death by DNA demethylating agents, the effect of the cell-permeable superoxide dismutase (SOD) mimetic manganese-porphyrin, Mn(III)TMPyP, was analyzed. As shown in Figure 4a, apoptosis induced by decitabine and zebularine was almost completely blocked in cells pretreated with the SOD mimetic, suggesting that this mode of cell death depends on the production of ROS. We confirmed that the Mn-porphyrin inhibited ROS generation in response to treatment with both demethylating agents (Fig. 4b). Interestingly, loss of  $\Delta\psi_m$  induced by DNMT inhibitors was not prevented by the SOD mimetic thus confirming our hypothesis that this mitochondrial event preceded the accumulation of ROS.

#### **Caspase-9 is essential for zebularine- and decitabine-induced apoptosis in Jurkat cells.**

Initiator caspase-9 is a critical component of the mitochondrial pathway of apoptosis. To ascertain the requirement of caspase-9 in the induction of apoptosis by DNMT inhibitors, we studied the response of a caspase-9-deficient Jurkat clone to these agents. Neither decitabine nor zebularine were able to induce apoptosis in caspase-9-deficient Jurkat cells (Jurkat w/o C9, Fig. 5a). As a control, induction of apoptosis was determined in deficient cells stably transfected with a caspase-9 expression vector (Jurkat C9, Fig. 5a). In addition, we analyzed the mitochondrial events characterized above. Decitabine and zebularine induced a weak activation of Bak in caspase-9-deficient cells, as compared with reconstituted cells (Fig. 5b). However, both demethylating agents failed to induce disruption of  $\Delta\psi_m$  and ROS accumulation in caspase-9-lacking Jurkat cells (Fig. 5c). These results imply that caspase-9 is necessary to fully promote the mitochondrial events that lead to apoptotic cell death.

#### **Zebularine and decitabine induce DNA damage in leukemic T cells.**

Since induction of DNA strand breaks by nucleoside DNMT inhibitors has been implicated in their cytotoxic effects in other tumor models,<sup>15</sup> we assessed, by comet assay, the ability of decitabine and zebularine to induce DNA damage in leukemic T cells. Following gel electrophoresis, comet tails indicative of DNA damage were detected in Jurkat cells treated with decitabine and zebularine (Fig. 6a, upper panel). Calculation of the tail moment in time course experiments indicated that cells with DNA strand breaks began to accumulate between 20 and 30 h after addition of DNMT inhibitors (Fig. 6a, lower left panel). A similar experiment performed in MOLT-4 cells showed that DNA breaks were evident at 20 h after treatment, although the level of damage accumulated was lower than that in Jurkat cells at longer times (Fig. 6a, lower right panel). Interestingly, the amount of DNA damage was higher in response to zebularine in all cases. We also analyzed phosphorylation of the histone H2AX ( $\gamma$ -H2AX), as an early marker of DNA damage. Incubation with either decitabine or zebularine resulted in a time-dependent increase in  $\gamma$ -H2AX levels, already evident at 20 h (Fig. 6b). Moreover, we determined the activation of two proteins involved in DNA damage response, i.e. the ATM and ATR downstream substrate Chk1 and the DNA damage sensor Nbs1.<sup>35</sup> The active, phosphorylated forms of Chk1 and Nbs1 were clearly detected at all time points analyzed in response to decitabine while they were more weakly induced by zebularine (Fig. 6b). Similar results were found in both, Jurkat and MOLT-4 cells. On the other hand, when we analyzed DNMT1 depletion, indicative of the hypomethylating effect of those inhibitors, we observed that it was apparent after more prolonged incubation (around 30 h) and almost complete at 48 h (Fig. 6b). The expression of DNMT1 protein has been reported to be cell-replication dependent,<sup>33</sup> which may explain the observed differences in basal levels of enzyme at different time points in Jurkat cells. Taken together, these results suggest that induction of DNA

damage by decitabine and zebularine might play a major role in their cytotoxic activity against leukemic T cells.

Finally, we analyzed the induction of DNA strand break and the activation of DNA damage response in the less sensitive cell line CEM-6. Comet assay showed that decitabine and zebularine induced a similar accumulation of cells with DNA strand breaks that was already evident at 20 h after treatment (Fig. 6c, left panel). In addition, both DNTM inhibitors induced phosphorylation of H2AX, Chk1 and Nbs1 at all times analyzed, being more intensive in response to decitabine at the longer time points (Fig. 6c, right panel).



## Discussion

DNMT inhibiting nucleoside analogs have been recently proposed as efficient drugs for the treatment of hematologic malignancies. The promising activity of decitabine has been proven in multiple clinical trials in myelodysplastic syndromes, chronic and acute myeloid leukemias.<sup>6,36</sup> In addition, demethylating effects and induction of apoptosis in response to treatment with zebularine have been demonstrated in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia and in acute myeloblastic leukemia.<sup>28,29</sup> However, the mechanism of antitumor action of these drugs is incompletely understood. Their ability to reactivate the expression of tumor suppressor genes and to induce apoptosis seems to depend not only on their demethylating activity but also on their DNA-damaging effect. It also remains unclear which apoptotic pathway is activated by nucleoside DNMT inhibitors. For the present study, we set out to examine the ability of decitabine and zebularine to selectively induce apoptosis in leukemic T cells and the mechanism of apoptosis induction by these demethylating agents.

Recent studies have indicated a resistance of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to cell death induced by decitabine.<sup>17,37</sup> However, to our knowledge, our results are the first to show the high resistance of, not only resting, but also activated and hence proliferating T cells to decitabine and zebularine-induced apoptosis. We demonstrate here that both decitabine and zebularine, at doses that show no significant toxicity for normal T lymphocytes, induce caspase-dependent mitochondria-mediated apoptosis in leukemic T-cell lines. These are interesting results as there are no previous reports describing the signaling pathway of zebularine-induced apoptosis. Moreover, although decitabine has been more extensively studied, controversial results exist about the role of caspases in the induction of apoptosis by this DNMT inhibitor. While several authors have shown the activation of effector caspases, i.e. caspase-3, in response to

decitabine, the activation of initiator caspases and the overall requirement of caspase activation for the induction of apoptosis is unclear.<sup>17,30,38,39</sup> Our data clearly show that decitabine and zebularine induce the activation of caspase-9 and effector caspases, as demonstrated by the cleavage of their substrate PARP. In addition, apoptosis was completely inhibited by the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK as well as by the deficiency of caspase-9, further demonstrating that caspase activation is necessary for cell death induction by these demethylating agents.

Regarding the involvement of mitochondria, some authors have shown that treatment with decitabine results in dissipation of transmembrane potential.<sup>17,30</sup> Similarly, we have observed the loss of  $\Delta\psi_m$  in response to decitabine and also to zebularine. Moreover, we have shown that both DNMT inhibitors induce Bak activation and ROS production, but do not trigger apoptosis in Jurkat cells overexpressing either Bcl-2 or Bcl-x<sub>L</sub>. These results, together with the observed resistance of caspase-9-deficient Jurkat cells, confirm the crucial role of mitochondria in apoptosis induced by decitabine and zebularine. Previous studies with caspase-9-lacking cells have demonstrated that loss of  $\Delta\psi_m$  in response to genotoxic stress depends on caspase-9 activation.<sup>24</sup> In accordance with these results, we demonstrate that in the absence of caspase-9 there are no mitochondrial apoptotic events, with the exception of a weak activation of Bak. Our findings support a model in which the initial mitochondrial outer membrane permeabilization, mediated by proapoptotic Bcl-2 proteins such as Bak, allows the release of intermembrane space proteins and the subsequent activation of caspase-9 and effector caspases. Subsequently, downstream caspases elicit feed back amplification on the permeabilized mitochondria to promote the disruption of mitochondrial function.<sup>24,40,41</sup> We have further shown that production of ROS follows the loss of  $\Delta\psi_m$  in leukemic T cells upon treatment with decitabine and zebularine. In spite of the fact that ROS generation is a secondary

mitochondrial event in this model, apoptosis was prevented by ROS scavenging with a superoxide dismutase mimetic suggesting that caspase-dependent ROS production plays a crucial role in the dismantling of the cell.

The above data lead us to state that the mechanism of cell death induced by nucleoside DNMT inhibitors is comparable to that induced by genotoxic stress. In fact, upon exposure to decitabine and zebularine DNA damage was observed in leukemic T-cell lines, as determined by comet assay, accumulation of  $\gamma$ -H2AX, and activation of proteins of the DNA damage response pathway, such as Nbs1 and Chk1<sup>35</sup>. Kinetics of caspase-activation and disruption of mitochondria correlated with that of H2AX phosphorylation and activation of DNA repair proteins and preceded depletion of DNMT1. Consistent with our results, several reports have suggested that molecular mechanisms other than reexpression of methylated genes contribute to the antitumor activity of decitabine, one such mechanism being the induction of DNA damage.<sup>16,42-44</sup> Interestingly, these authors indicate that the effects of decitabine on cellular proliferation and viability are mediated by the up-regulation of p21 in a p53-dependent manner.<sup>16,43,44</sup> However, leukemic T-cell lines used in our study do not have functional p53 and we did not observe changes in the levels of p21 in response to DNMT inhibitors (data not shown). A similar finding was described by Nieto and coworkers who demonstrated that primary and transformed mouse embryonic fibroblasts deficient for p53 are hypersensitive to decitabine.<sup>45</sup> It is possible that the role of p53 depends on the cell type and the presence of other molecules that may substitute for p53 function, such as p73.<sup>17</sup> On the other hand, p53 mutant leukemic T cells, i.e. Jurkat cells, have been previously reported to be sensitive to genotoxic drugs suggesting that, at least in this cell model, DNMT inhibitors might induce apoptosis by a p53-independent mechanism similar to that of genotoxic stress.<sup>24,40</sup>

Concerning zebularine, most studies have focused on its activity as a DNMT inhibitor but few data exist about its ability to induce apoptosis, cell growth arrest and DNA damage.<sup>15,28,34</sup> Here we have demonstrated that zebularine is able to induce apoptosis in leukemia T cell-lines in a similar way to decitabine. However, we have to underline that there must be some differences in the mechanism of action between zebularine and decitabine, even though both drugs finally trigger the same apoptotic signaling pathway. For instance, zebularine did not induce cell cycle arrest in leukemic T cells, in contrast to decitabine which arrests Jurkat and CEM-6, but not MOLT-4 cells, in G2/M. The ability of decitabine to induce cell cycle arrest has been associated with activation of the p53 pathway,<sup>15,16</sup> but this cannot explain the arrest in our p53 mutant cell lines. However, it may be associated with activation of Chk1, a central regulator of the S and G2 checkpoint response. Chk1 induces the inhibition of cyclin-dependent kinases (Cdk) leading to cell cycle arrest<sup>35</sup>. We have shown that activation (phosphorylation) of Chk1 is more significant in response to decitabine in Jurkat and CEM-6 cells, which could explain the arrest in G2/M phase by this inhibitor. One can speculate that the lower activation of Chk1 by decitabine in MOLT-4 cells should be insufficient to halt cell cycle. Another important difference between decitabine and zebularine lies in their ability to induce apoptosis in CEM-6 cells. This could also be related with G2/M arrest as it increases the time available for DNA repair thus favouring cell survival. In contrast, unrepaired DNA strand breaks can easily lead to cell death. Interestingly, it has been reported that zebularine enhances radiosensitivity by inhibition of DNA repair, although the mechanism is not known<sup>46</sup>. The weak activation of DNA repair proteins (Nbs1 and Chk1) that we have observed in response to zebularine would be in agreement with this report. Clearly, additional studies are required to further understand

the differential effects of decitabine and zebularine on DNA damage response as well as the differences in susceptibility among cell lines to both demethylating agents.

Comparative studies have revealed that zebularine is much less effective than decitabine as a hypomethylating agent and have shown different effects of both agents on gene transcription.<sup>47,48</sup> In agreement with our suggestion, authors conclude that the mechanism of action of decitabine and zebularine is not identical and their effects may at least in part be independent of DNA demethylation.<sup>47</sup> Interestingly, zebularine is also a potent inhibitor of cytidine deaminase and, because of this property, it has been suggested to improve the antitumor activity of decitabine when both drugs are coadministered,<sup>49,50</sup> although we did not observe any synergistic effect on leukemic T cell lines after a combined treatment with decitabine and zebularine (data not shown). On the other hand, zebularine is highly stable in aqueous solution and, even more importantly, it exerts a lower toxicity than decitabine.<sup>7,8</sup> It was demonstrated that zebularine is relatively selective for cancer cells which incorporate this drug more efficiently into DNA as compared to normal cells.<sup>9</sup> Incorporation of zebularine into DNA requires its phosphorylation by the uridine-cytidine kinase (UCK).<sup>50</sup> There are two human UCKs, UCK1 and UCK2, but UCK activity closely correlates with levels of UCK2.<sup>51</sup> The fact that UCK2 is mainly expressed in tumor cells but not in normal tissues<sup>51</sup> may explain the more efficient incorporation of zebularine to cancer cells than to normal cells.

In preliminary studies with two samples of primary T-cell lymphoblastic leukemia, we observed that zebularine induced a higher level of apoptosis than decitabine (data not shown). Overall, these data, together with the fast kinetics of apoptosis induction and the sensitivity of leukemic T-cell lines suggest that zebularine could be the one of choice for the treatment of T-cell leukemias.

## **Acknowledgments**

We would like to thank Dr. F. Javier Oliver for invaluable advice and generous donation of reagents. This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (Grant PI060712 to C.R.-R.).

## References

1. Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:629-56.
2. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003;349:2042-54.
3. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2 Suppl 1:S4-11.
4. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002;21:5483-95.
5. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer* 2008;123:8-13.
6. Kuendgen A, Lubbert M. Current status of epigenetic treatment in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 2008;87:601-11.
7. Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, Jones PA, Selker EU. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:399-409.
8. van Bommel DM, Brank AS, Eritja R, Marquez VE, Christman JK. DNA (Cytosine-C5) methyltransferase inhibition by oligodeoxyribonucleotides containing 2-(1H)-pyrimidinone (zebularine aglycon) at the enzymatic target site. *Biochem Pharmacol* 2009;78:633-41.
9. Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, Marquez VE, Greer S, Orntoft TF, Thykjaer T, Jones PA. Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell* 2004;6:151-8.

10. Boultonwood J, Wainscoat JS. Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *Br J Haematol* 2007;138:3-11.
11. Fu WN, Bertoni F, Kelsey SM, McElwaine SM, Cotter FE, Newland AC, Jia L. Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia. *Oncogene* 2003;22:451-5.
12. Fulda S, Kufer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM. Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 2001;20:5865-77.
13. Sigalotti L, Fratta E, Coral S, Cortini E, Covre A, Nicolay HJM, Anzalone L, Pezzani L, Di Giacomo AM, Fonsatti E, Colizzi F, Altomonte M, et al. Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: Biomolecular aspects and clinical applications. *J Cell Physiol* 2007;212:330-44.
14. Kiziltepe T, Hideshima T, Catley L, Raje N, Yasui H, Shiraishi N, Okawa Y, Ikeda H, Vallet S, Pozzi S, Ishitsuka K, Ocio EM, et al. 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6:1718-27.
15. Pali SS, Van Emburgh BO, Sankpal UT, Brown KD, Robertson KD. DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol* 2008;28:752-71.
16. Jiemjit A, Fandy TE, Carraway H, Bailey KA, Baylin S, Herman JG, Gore SD. p21(WAF1/CIP1) induction by 5-azacytosine nucleosides requires DNA damage. *Oncogene* 2008;27:3615-23.



17. Schmelz K, Wagner M, Dorken B, Tamm I. 5-Aza-2'-deoxycytidine induces p21WAF expression by demethylation of p73 leading to p53-independent apoptosis in myeloid leukemia. *Int J Cancer* 2005;114:683-95.
18. Tamm I, Wagner M, Schmelz K. Decitabine activates specific caspases downstream of p73 in myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2005;84 Suppl 1:47-53.
19. Kuang SQ, Tong WG, Yang H, Lin W, Lee MK, Fang ZH, Wei Y, Jelinek J, Issa JP, Garcia-Manero G. Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2008;22:1529-38.
20. Taylor KH, Pena-Hernandez KE, Davis JW, Arthur GL, Duff DJ, Shi H, Rahmatpanah FB, Sjahputera O, Caldwell CW. Large-Scale CpG methylation analysis identifies novel candidate genes and reveals methylation hotspots in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2007;67:2617-25.
21. Yasunaga J, Taniguchi Y, Nosaka K, Yoshida M, Satou Y, Sakai T, Mitsuya H, Matsuoka M. Identification of aberrantly methylated genes in association with adult T-cell leukemia. *Cancer Res* 2004;64:6002-9.
22. Milani L, Lundmark A, Kiialainen A, Nordlund J, Flaegstad T, Forestier E, Heyman M, Jonmundsson G, Kanerva J, Schmiegelow K, Soderhall S, Gustafsson MG, et al. DNA methylation for subtype classification and prediction of treatment outcome in patients with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2010;115:1214-25.
23. Morales JC, Ruiz-Magaña MJ, Ruiz-Ruiz C. Regulation of the resistance to TRAIL-induced apoptosis in human primary T lymphocytes: role of NF-kappaB inhibition. *Mol Immunol* 2007;44:2587-97.

24. Samraj AK, Sohn D, Schulze-Osthoff K, Schmitz I. Loss of caspase-9 reveals its essential role for caspase-2 activation and mitochondrial membrane depolarization. *Mol Biol Cell* 2007;18:84-93.
25. Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 1994;218:314-9.
26. Ruiz-Ruiz MC, Lopez-Rivas A. p53-mediated up-regulation of CD95 is not involved in genotoxic drug-induced apoptosis of human breast tumor cells. *Cell Death Differ* 1999;6:271-80.
27. Kubo T, Yamamoto J, Shikauchi Y, Niwa Y, Matsubara K, Yoshikawa H. Apoptotic speck protein-like, a highly homologous protein to apoptotic speck protein in the pyrin domain, is silenced by DNA methylation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2004;64:5172-7.
28. Scott SA, Lakshimikuttysamma A, Sheridan DP, Sanche SE, Geyer CR, DeCoteau JF. Zebularine inhibits human acute myeloid leukemia cell growth in vitro in association with p15INK4B demethylation and reexpression. *Exp Hematol* 2007;35:263-73.
29. Stumpel DJ, Schneider P, van Roon EH, Boer JM, de Lorenzo P, Valsecchi MG, de Menezes RX, Pieters R, Stam RW. Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options. *Blood* 2009;114:5490-8.
30. Khan R, Schmidt-Mende J, Karimi M, Gogvadze V, Hassan M, Ekstrom TJ, Zhivotovsky B, Hellstrom-Lindberg E. Hypomethylation and apoptosis in 5-azacytidine-treated myeloid cells. *Exp Hematol* 2008;36:149-57.

31. Cheng J, Haas M. Frequent mutations in the p53 tumor suppressor gene in human leukemia T-cell lines. *Mol Cell Biol* 1990;10:5502-9.
32. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:7555-9.
33. Qin T, Jelinek J, Si J, Shu J, Issa JP. Mechanisms of resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in human cancer cell lines. *Blood* 2009;113:659-67.
34. Billam M, Sobolewski MD, Davidson NE. Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120:581-92.
35. Al-Ejeh F, Kumar R, Wiegmans A, Lakhani SR, Brown MP, Khanna KK. Harnessing the complexity of DNA-damage response pathways to improve cancer treatment outcomes. *Oncogene* 2010;29:6085-9.
36. Jabbour E, Issa JP, Garcia-Manero G, Kantarjian H. Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies. *Cancer* 2008;112:2341-51.
37. Yan P, Qu Z, Ishikawa C, Mori N, Xiao G. Human T-cell leukemia virus type I-mediated repression of PDZ-LIM domain-containing protein 2 involves DNA methylation but independent of the viral oncoprotein tax. *Neoplasia* 2009;11:1036-41.
38. Deng T, Zhang Y. Possible involvement of activation of P53/P21 and demethylation of RUNX 3 in the cytotoxicity against Lovo cells induced by 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Life Sci* 2009;84:311-20.
39. Hoglund A, Nilsson LM, Forshell LP, Maclean KH, Nilsson JA. Myc sensitizes p53-deficient cancer cells to the DNA-damaging effects of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine. *Blood* 2009;113:4281-8.

40. Franklin EE, Robertson JD. Requirement of Apaf-1 for mitochondrial events and the cleavage or activation of all procaspases during genotoxic stress-induced apoptosis. *Biochem J* 2007;405:115-22.
41. Ricci JE, Munoz-Pinedo C, Fitzgerald P, Bailly-Maitre B, Perkins GA, Yadava N, Scheffler IE, Ellisman MH, Green DR. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell* 2004;117:773-86.
42. Schmelz K, Sattler N, Wagner M, Lubbert M, Dorken B, Tamm I. Induction of gene expression by 5-Aza-2'-deoxycytidine in acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) but not epithelial cells by DNA-methylation-dependent and -independent mechanisms. *Leukemia* 2005;19:103-11.
43. Zhu WG, Hileman T, Ke Y, Wang P, Lu S, Duan W, Dai Z, Tong T, Villalona-Calero MA, Plass C, Otterson GA. 5-aza-2'-deoxycytidine activates the p53/p21Waf1/Cip1 pathway to inhibit cell proliferation. *J Biol Chem* 2004;279:15161-6.
44. Pulukuri SM, Rao JS. Activation of p53/p21Waf1/Cip1 pathway by 5-aza-2'-deoxycytidine inhibits cell proliferation, induces pro-apoptotic genes and mitogen-activated protein kinases in human prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2005;26:863-71.
45. Nieto M, Samper E, Fraga MF, Gonzalez de Buitrago G, Esteller M, Serrano M. The absence of p53 is critical for the induction of apoptosis by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Oncogene* 2004;23:735-43.
46. Dote H, Cerna D, Burgan WE, Carter DJ, Cerra MA, Hollingshead MG, Camphausen K, Tofilon PJ. Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell

- radiosensitivity by the DNA methylation inhibitor zebularine. *Clin Cancer Res* 2005;11:4571-9.
47. Flotho C, Claus R, Batz C, Schneider M, Sandrock I, Ihde S, Plass C, Niemeyer CM, Lubbert M. The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2009;23:1019-28.
48. Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res* 2006;66:2794-800.
49. Lemaire M, Momparler LF, Raynal NJ, Bernstein ML, Momparler RL. Inhibition of cytidine deaminase by zebularine enhances the antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;63:411-6.
50. Marquez VE, Kelley JA, Agbaria R, Ben-Kasus T, Cheng JC, Yoo CB, Jones PA. Zebularine: a unique molecule for an epigenetically based strategy in cancer chemotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1058:246-54.
51. Shimamoto Y, Koizumi K, Okabe H, Kazuno H, Murakami Y, Nakagawa F, Matsuda A, Sasaki T, Fukushima M. Sensitivity of human cancer cells to the new anticancer ribo-nucleoside TAS-106 is correlated with expression of uridine-cytidine kinase 2. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:825-33.

## Figure legends

**Figure 1. Effects of decitabine and zebularine in apoptosis induction and cell cycle arrest in leukemic T cells.** (a) Jurkat, CEM-6, MOLT-4, (b) resting and activated T cells were treated with different doses of either decitabine (left panels) or zebularine (right panels) for 48 h. The percentage of sub-G1 (apoptotic) cells was determined by flow cytometry. (c) Cell cycle analysis of Jurkat, CEM-6 and MOLT-4 cells, treated without (Control) or with 5  $\mu$ M decitabine or 50  $\mu$ M zebularine for 48 h, was performed by flow cytometry and using logarithmic amplification. (d) Cell cycle profile of viable non-apoptotic Jurkat and CEM-6 cells, treated as in c, was analyzed by flow cytometry on a linear scale. In the right panel, the percentage of cells in the G2/M phase of the cell cycle was quantified. Error bars show SEM from at least three independent experiments in a, d and three different donors in b. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . In histograms, cells arrested in G2/M are marked by arrows.

**Figure 2. Decitabine and zebularine induce caspase-dependent apoptosis in leukemic T cells.** (a) Jurkat and (b) MOLT-4 cells were treated without (Control) or with 5  $\mu$ M decitabine or 50  $\mu$ M zebularine for 20, 30 and 48 h and the percentage of sub-G1 cells was determined by flow cytometry. (c) Activation of caspase-8 and -9 and PARP degradation were determined by Western-blot in Jurkat cells treated as in a (C, control; D, decitabine; Z, zebularine). (d) Jurkat cells were preincubated for 1 h in the absence or in the presence of the caspase inhibitor Z-VAD-FMK (20  $\mu$ M) and then treated for 48 h with 5  $\mu$ M decitabine or 50  $\mu$ M zebularine. Sub-G1 cells were analyzed by flow cytometry. Error bars show SEM from three independent experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

**Figure 3. Induction of mitochondrial apoptotic events in leukemic T cells by decitabine and zebularine.** (a) Jurkat cells were treated without (Control) or with 5

$\mu\text{M}$  decitabine or  $50 \mu\text{M}$  zebularine for 24 and 48 h. Mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) and ROS production were determined by flow cytometry using DiOC<sub>6</sub>(3) and dihydroethidium, respectively. (b) Bak activation was analyzed by flow cytometry in Jurkat cells treated for the indicated times as in a. (c) Mock-transfected (Jurkat/pCDNA), Bcl-2-overexpressing (Jurkat/Bcl-2) and Bcl-x<sub>L</sub>-overexpressing (Jurkat/Bcl-x<sub>L</sub>) Jurkat cells were treated with the indicated doses of either decitabine (left panel) or zebularine (right panel) for 48 h. Sub-G1 cells were determined by flow cytometry. Inset shows levels of Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> and  $\beta$ -actin in mock-transfected, Bcl-2-overexpressing and Bcl-x<sub>L</sub>-overexpressing Jurkat cells, as determined by Western-blot. (d) Mock-transfected, Bcl-2- and Bcl-x<sub>L</sub>-overexpressing Jurkat cells were incubated with  $5 \mu\text{M}$  decitabine and  $50 \mu\text{M}$  zebularine for 48 h. Caspase-8 and -9 activation and PARP degradation were analyzed by Western-blot (C, control; D, decitabine; Z, zebularine). (e) Mitochondrial membrane potential and ROS production were determined by flow cytometry in mock-transfected, Bcl-2- and Bcl-x<sub>L</sub>-overexpressing Jurkat cells treated as in d. Error bars in c represent SEM from three independent experiments.

**Figure 4. ROS scavenging prevents decitabine- and zebularine-induced apoptosis in leukemic T cells.** Jurkat cells were preincubated for 24 h in the absence or in the presence of  $250 \mu\text{M}$  manganese porphyrin Mn(III)TMPyP and then treated without (Control) or with  $5 \mu\text{M}$  decitabine or  $50 \mu\text{M}$  zebularine for 48 h. (a) Hypodiploid apoptotic cells, (b) mitochondrial membrane potential and ROS production were determined by flow cytometry. Error bars in a show SEM from three independent experiments.

**Figure 5. Caspase-9 deficient Jurkat cells are resistant to the induction of apoptosis by decitabine and zebularine.** (a) Sub-G1 apoptotic cells were determined by flow

cytometry in caspase-9-deficient (Jurkat w/o C9) and caspase-9-reconstituted (Jurkat / C9) Jurkat cells after incubation without (Control) or with 5  $\mu$ M decitabine or 50  $\mu$ M zebularine for 48 h. Error bars show SEM from three independent experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . The inset figure shows the levels of caspase-9 and  $\beta$ -actin in caspase-9-lacking and -reconstituted cells as determined by Western-blot. (b) Caspase-9-deficient and caspase-9-reconstituted Jurkat cells were treated as in *a* and Bak activation was analyzed by flow cytometry. (c) Mitochondrial membrane potential and ROS production were determined by flow cytometry in caspase-9 deficient Jurkat cells treated as in *a*.

**Figure 6. Treatment of leukemic T cells with decitabine and zebularine results in DNA damage.** (a) DNA strand breaks were analyzed by comet assay in Jurkat and MOLT-4 cells treated without (Control) or with 5  $\mu$ M decitabine or 50  $\mu$ M zebularine, either for 48 h (upper panel) or for the indicated times (lower panels). Images of Jurkat cells with comet tails are shown on the upper panel. The comet tail moments were scored from at least 70 cells per sample (mean  $\pm$  SEM, lower panels). (b) Expression of  $\gamma$ -H2AX, phospho-Chk1 (Ser317), phospho-Nbs1 (Ser343) and DNMT1 was analyzed by Western-blot in Jurkat and MOLT-4 cells in response to treatment without (C) or with 5  $\mu$ M decitabine (D) or 50  $\mu$ M zebularine (Z) for the indicated times.  $\beta$ -actin and histone-H1 were used as loading controls for total and nuclear extracts, respectively. (c) CEM cells were treated without (C) or with 5  $\mu$ M decitabine (D) or 50  $\mu$ M zebularine (Z) for the indicated times. DNA strand breaks were analyzed by comet assay and tail moments were scored from at least 70 cells per sample (mean  $\pm$  SEM, left panel). Expression of  $\gamma$ -H2AX, phospho-Chk1 (Ser317) and phospho-Nbs1 (Ser343) was analyzed by Western-blot and loading controls were used as in *b* (right panel). Data shown are representative of two independent experiments.



Figure 1

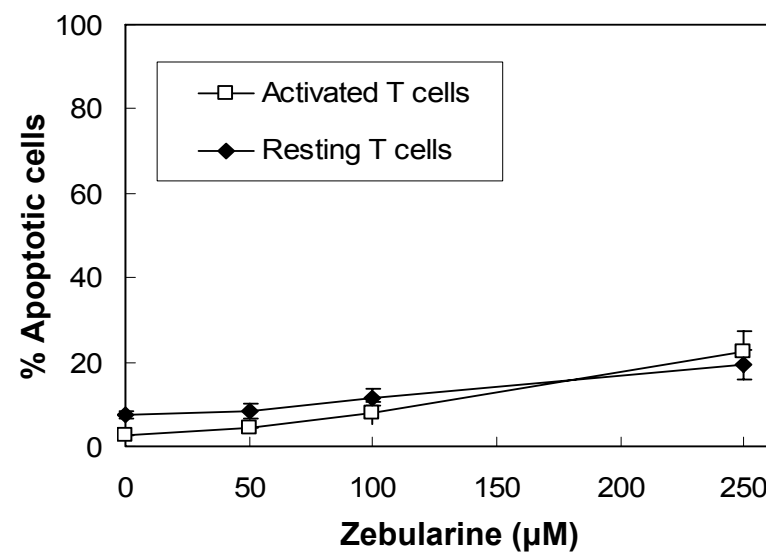
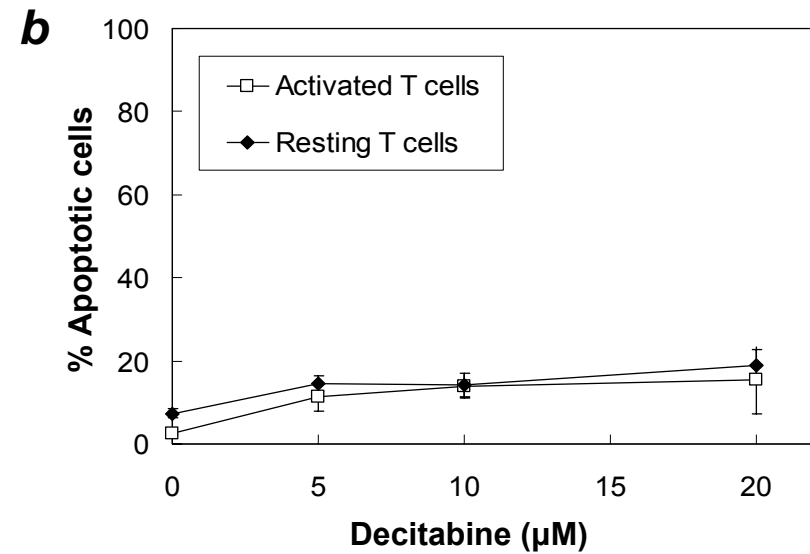
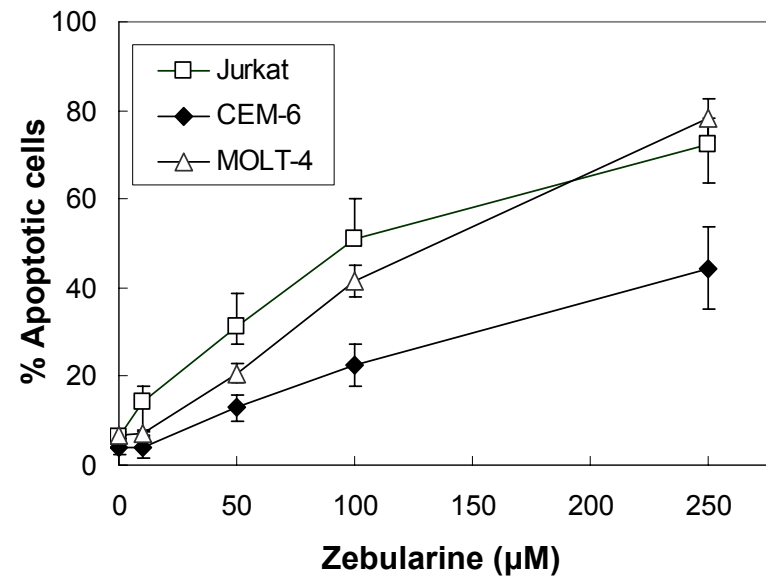
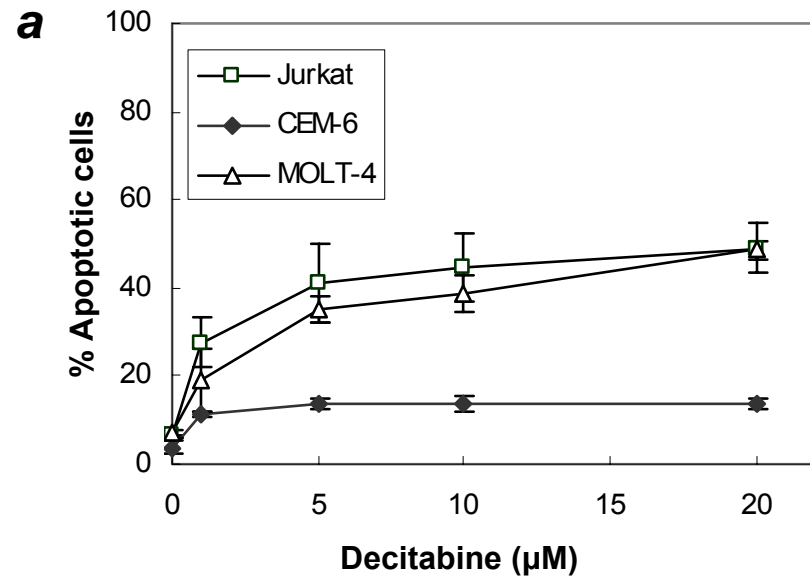


Figure 1

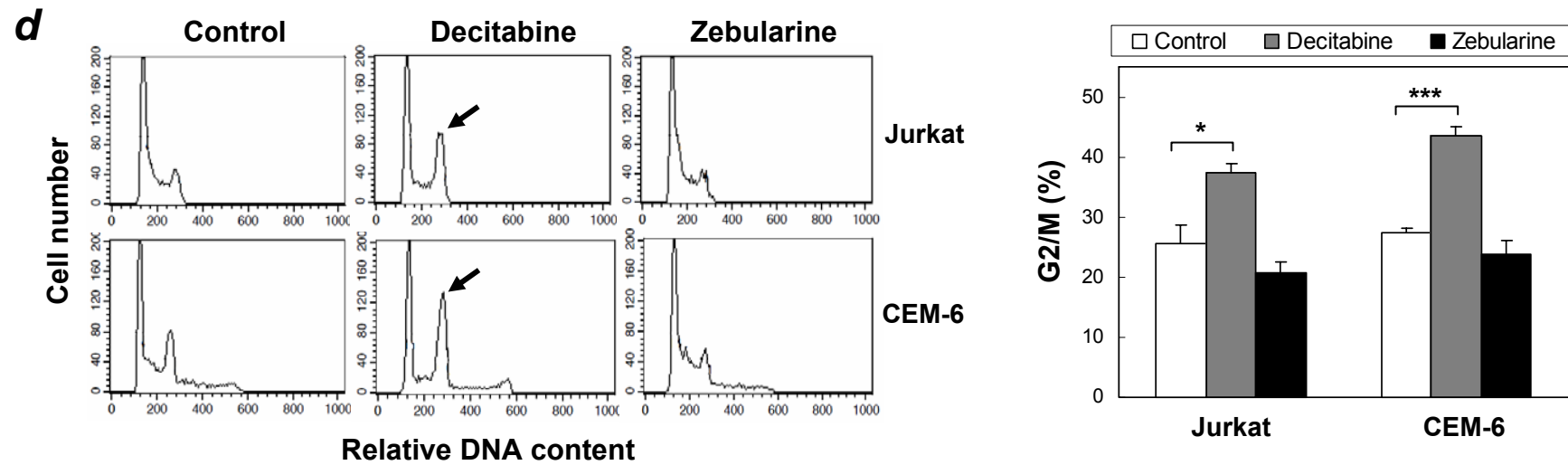
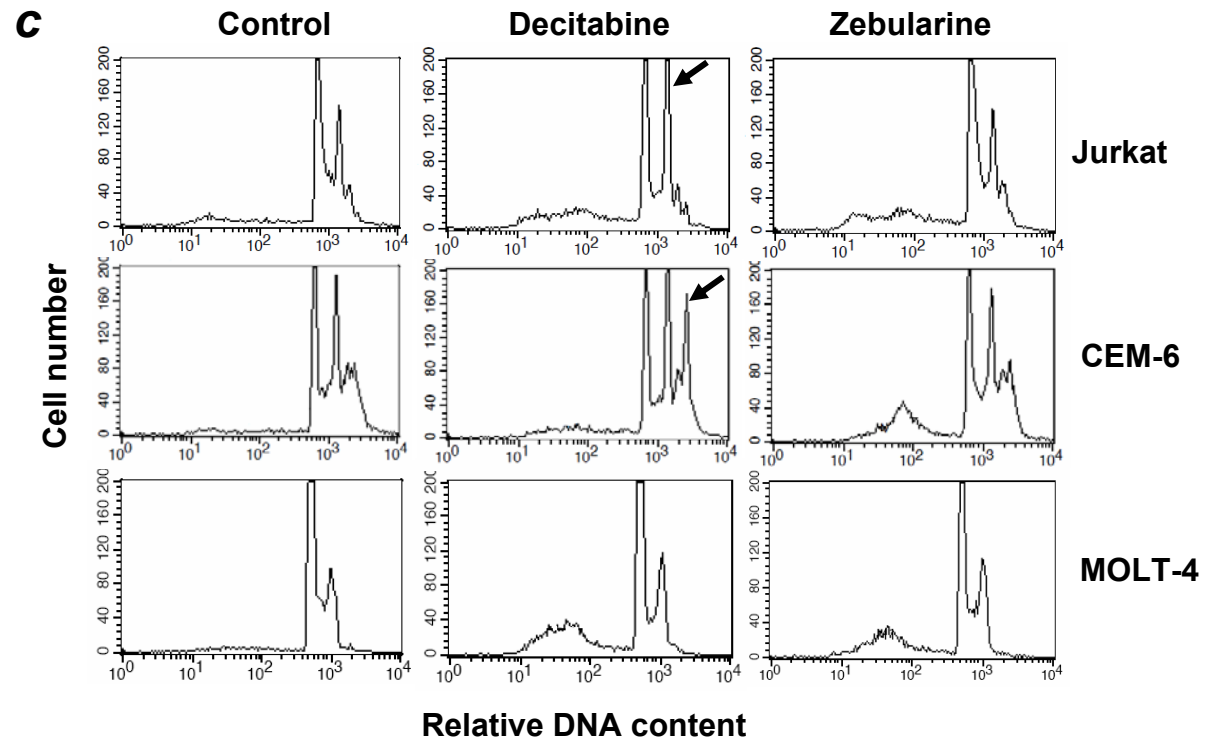


Figure 2

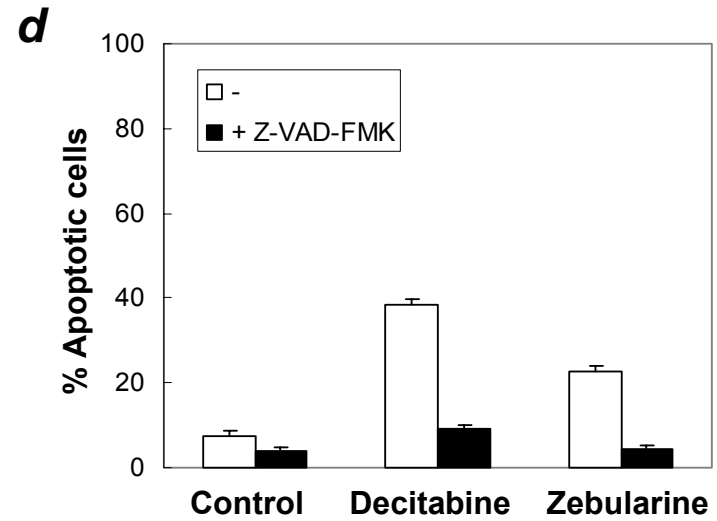
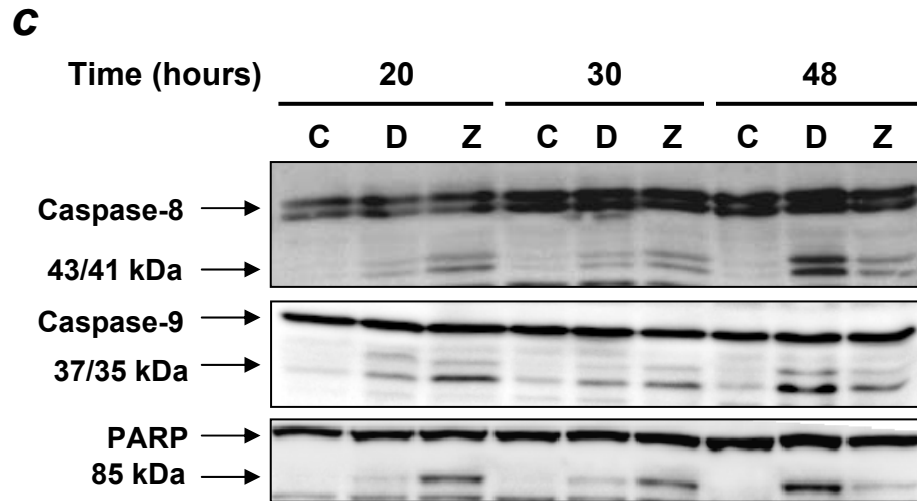
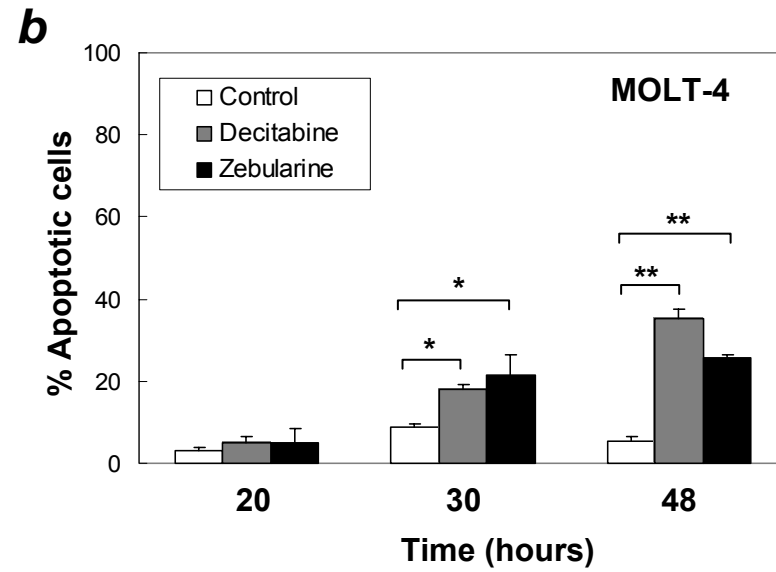
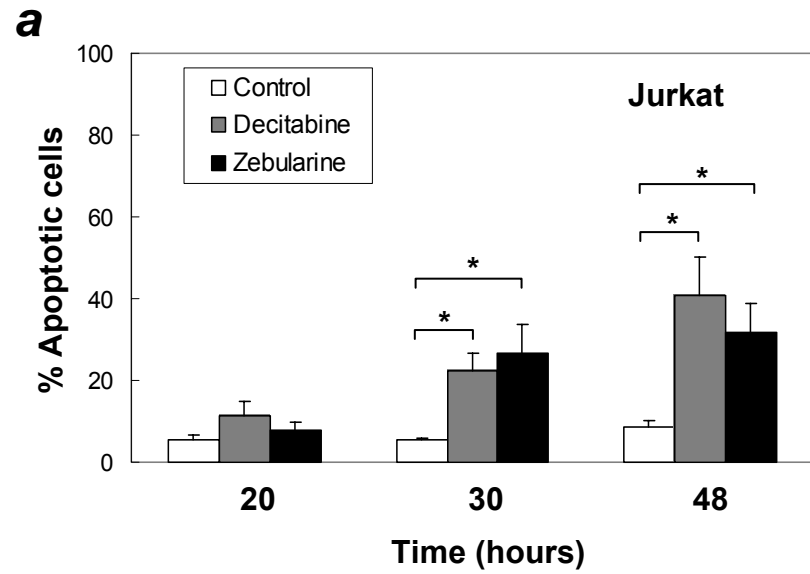


Figure 3

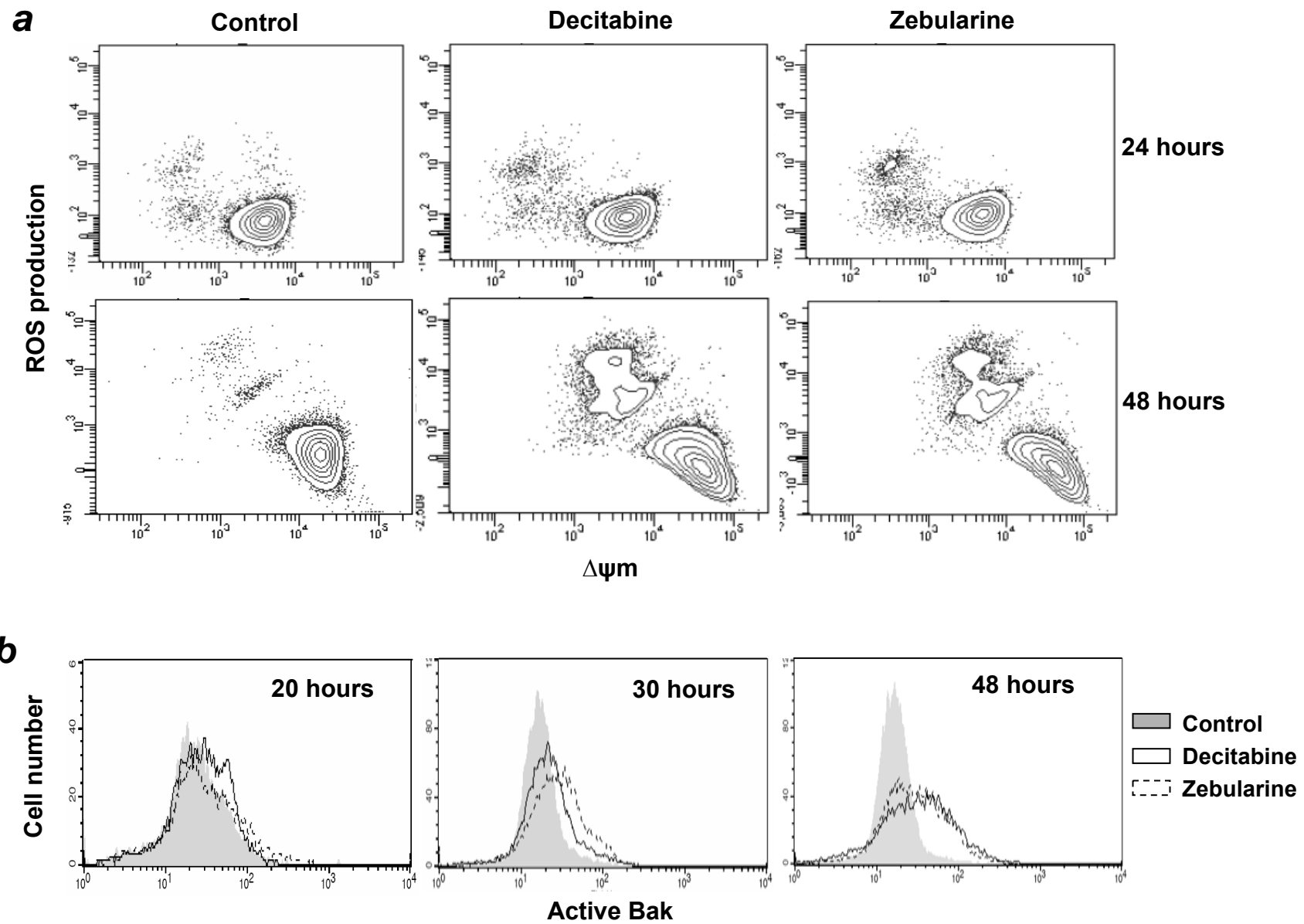




Figure 3

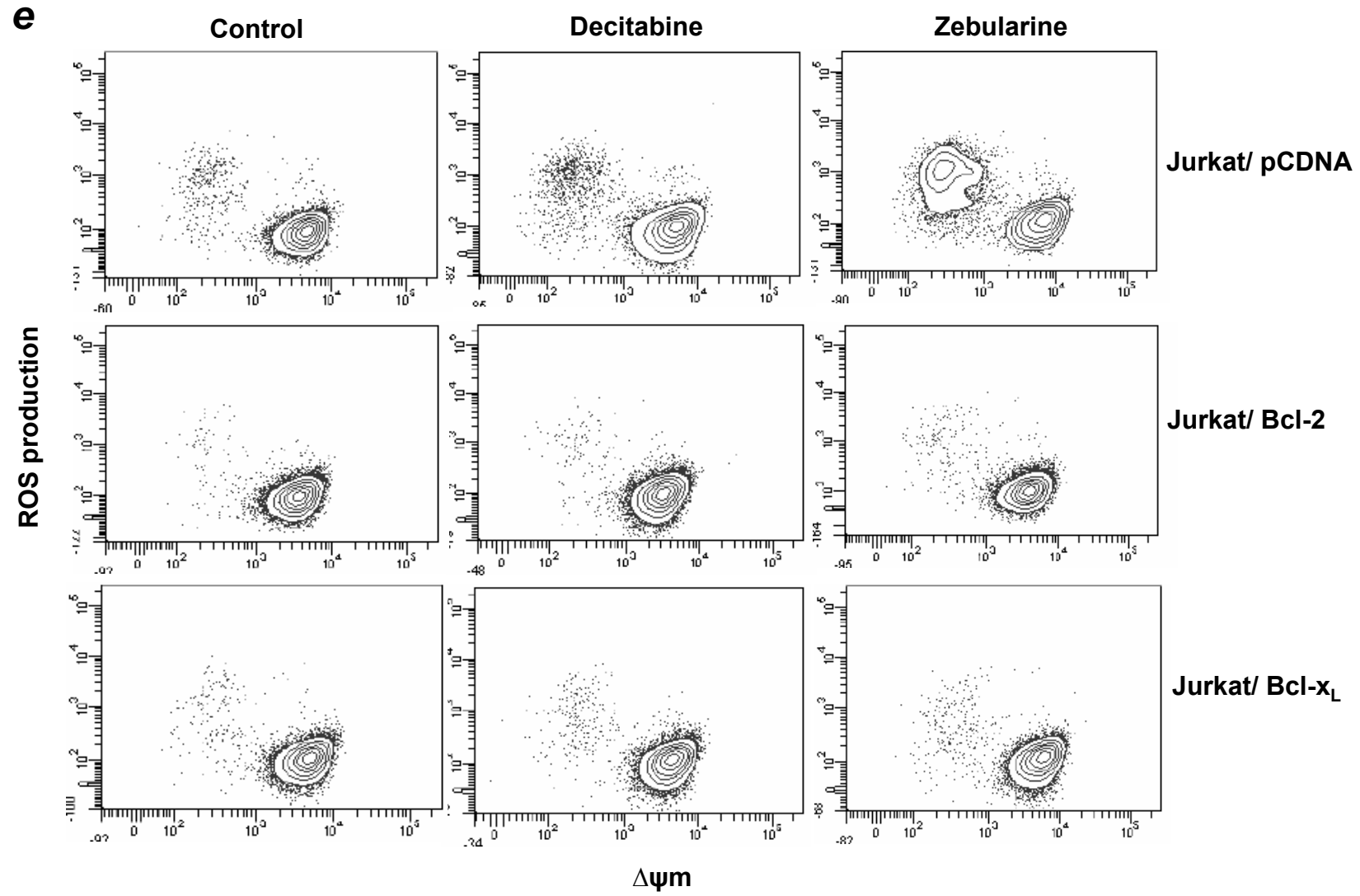


Figure 4

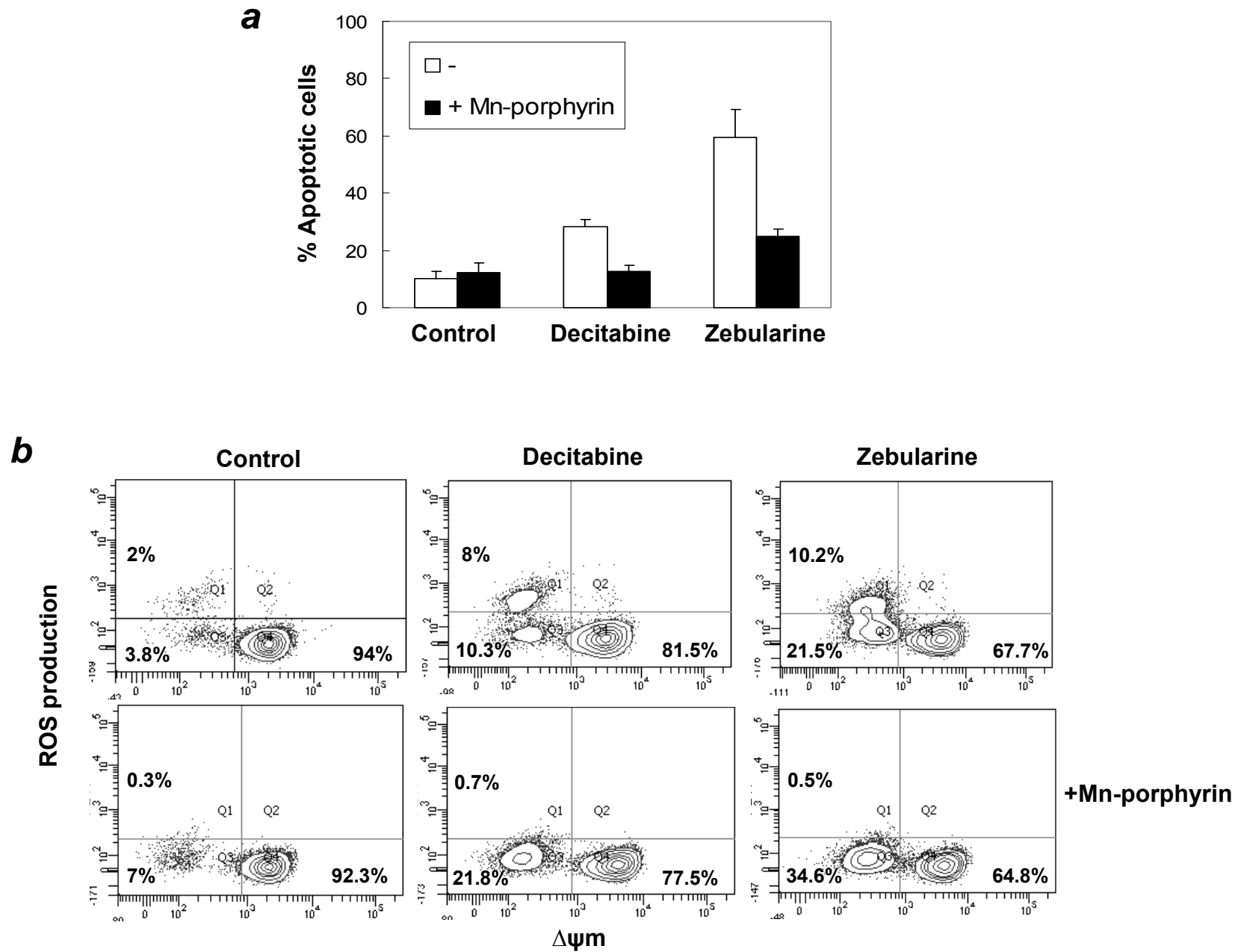


Figure 5

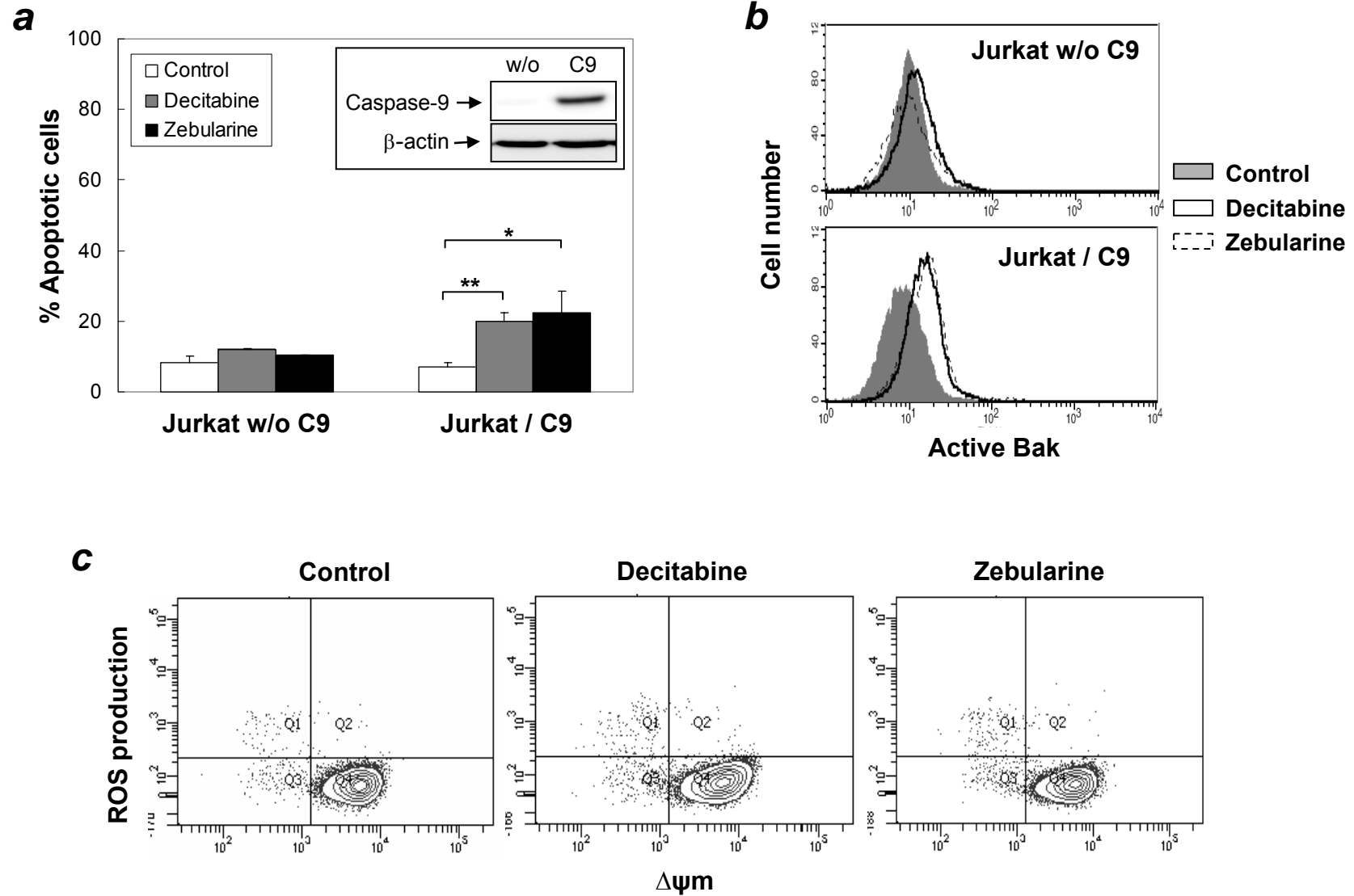




Figure 6

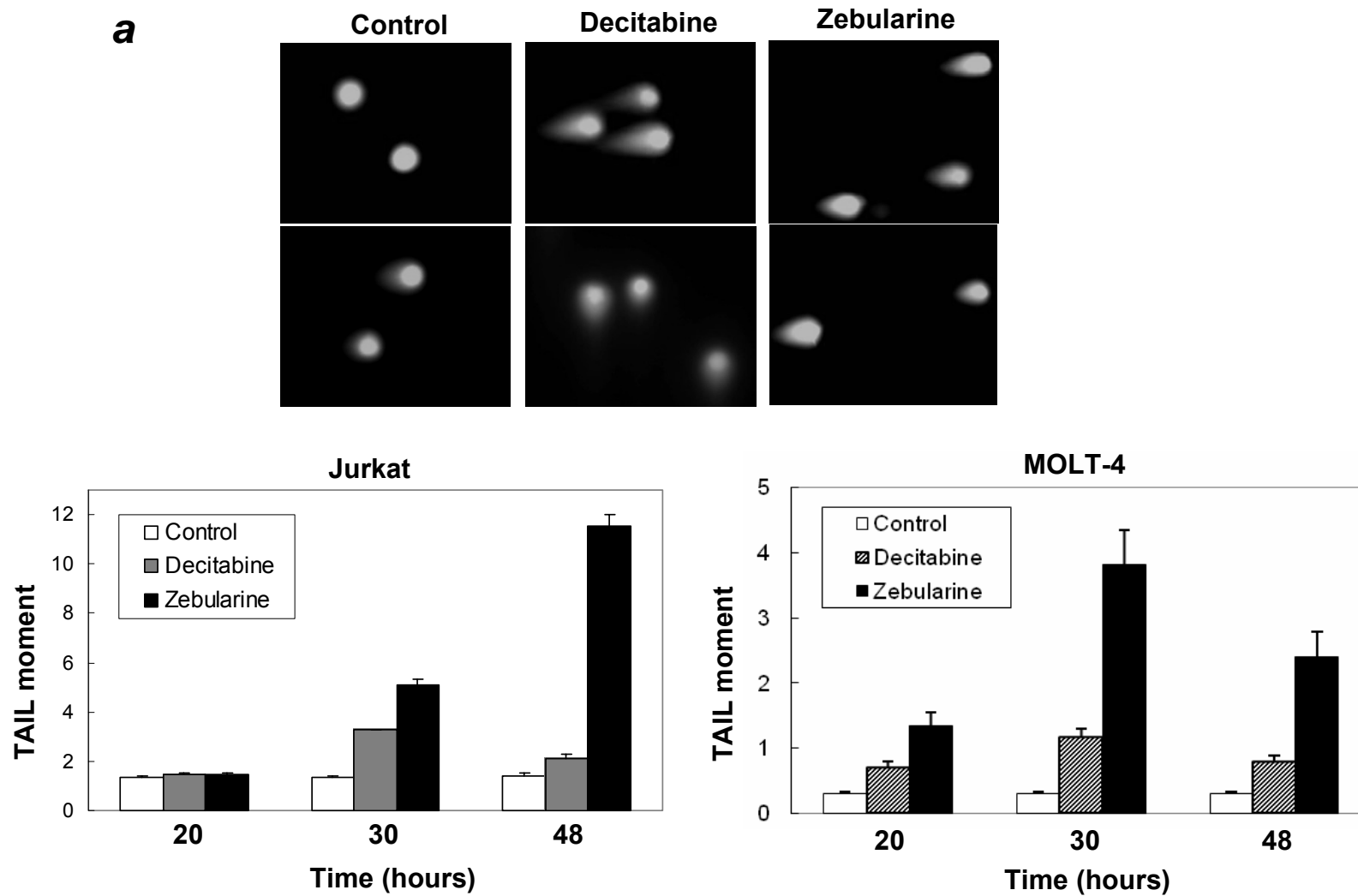


Figure 6

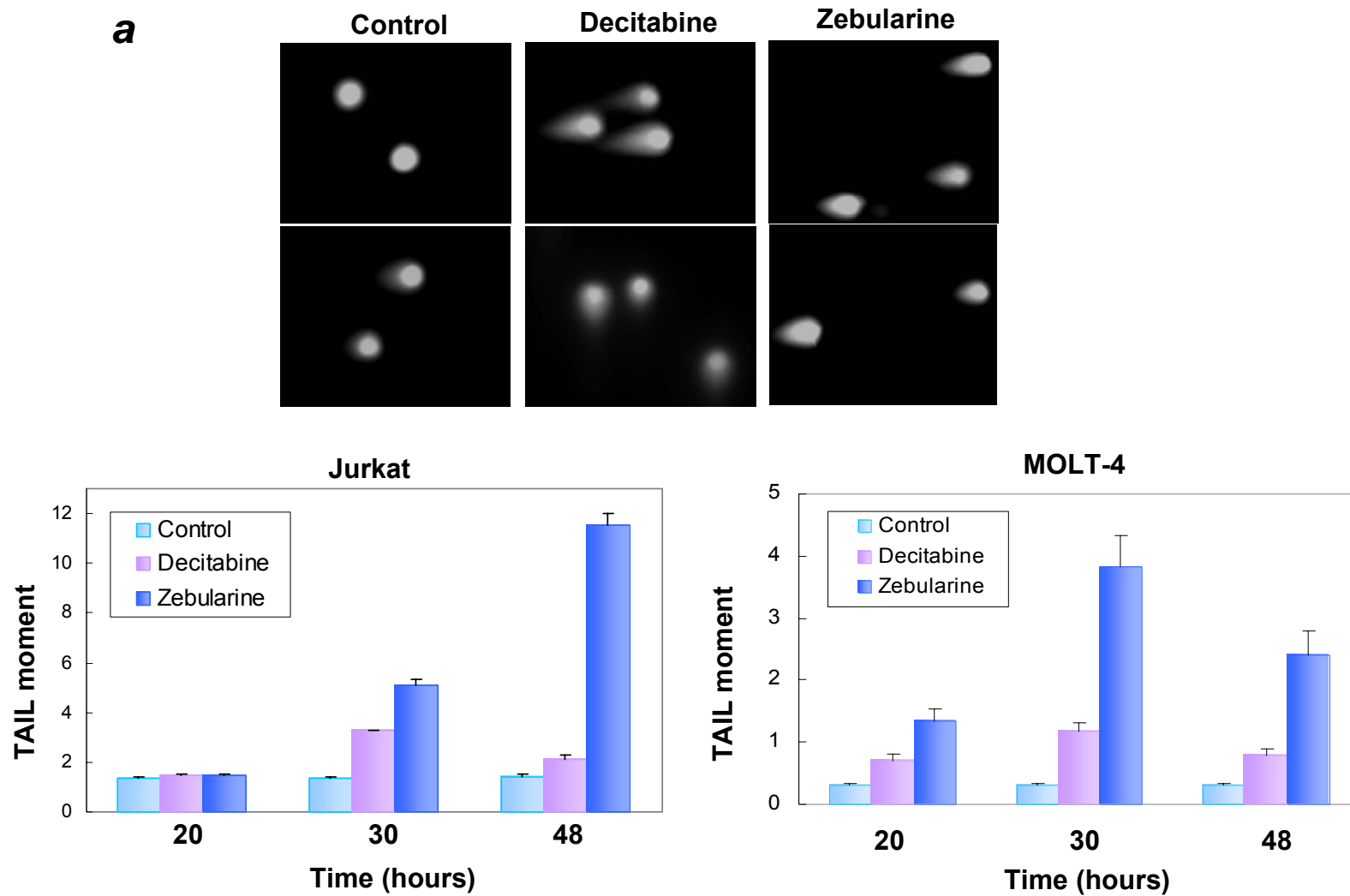


Figure 6

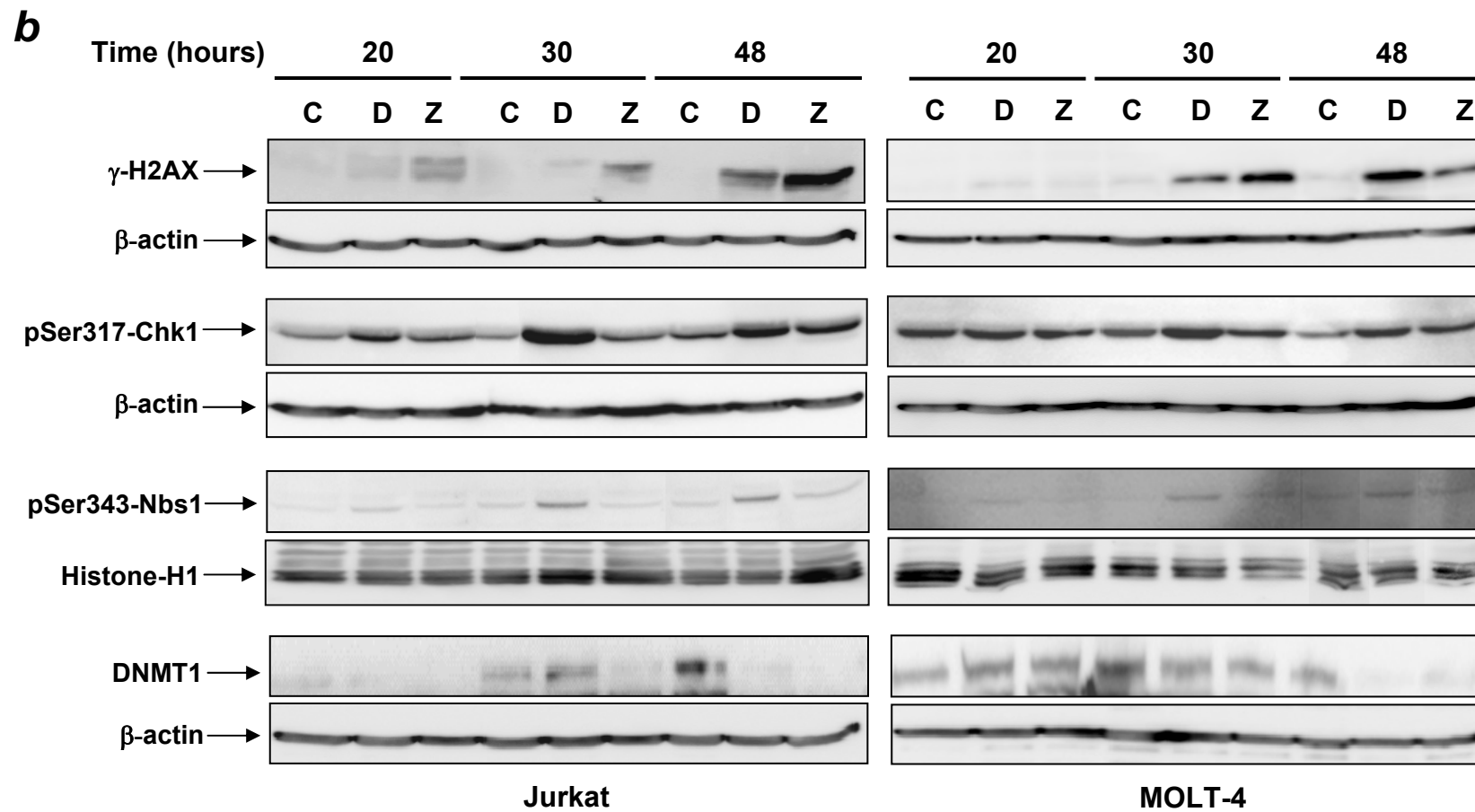


Figure 6

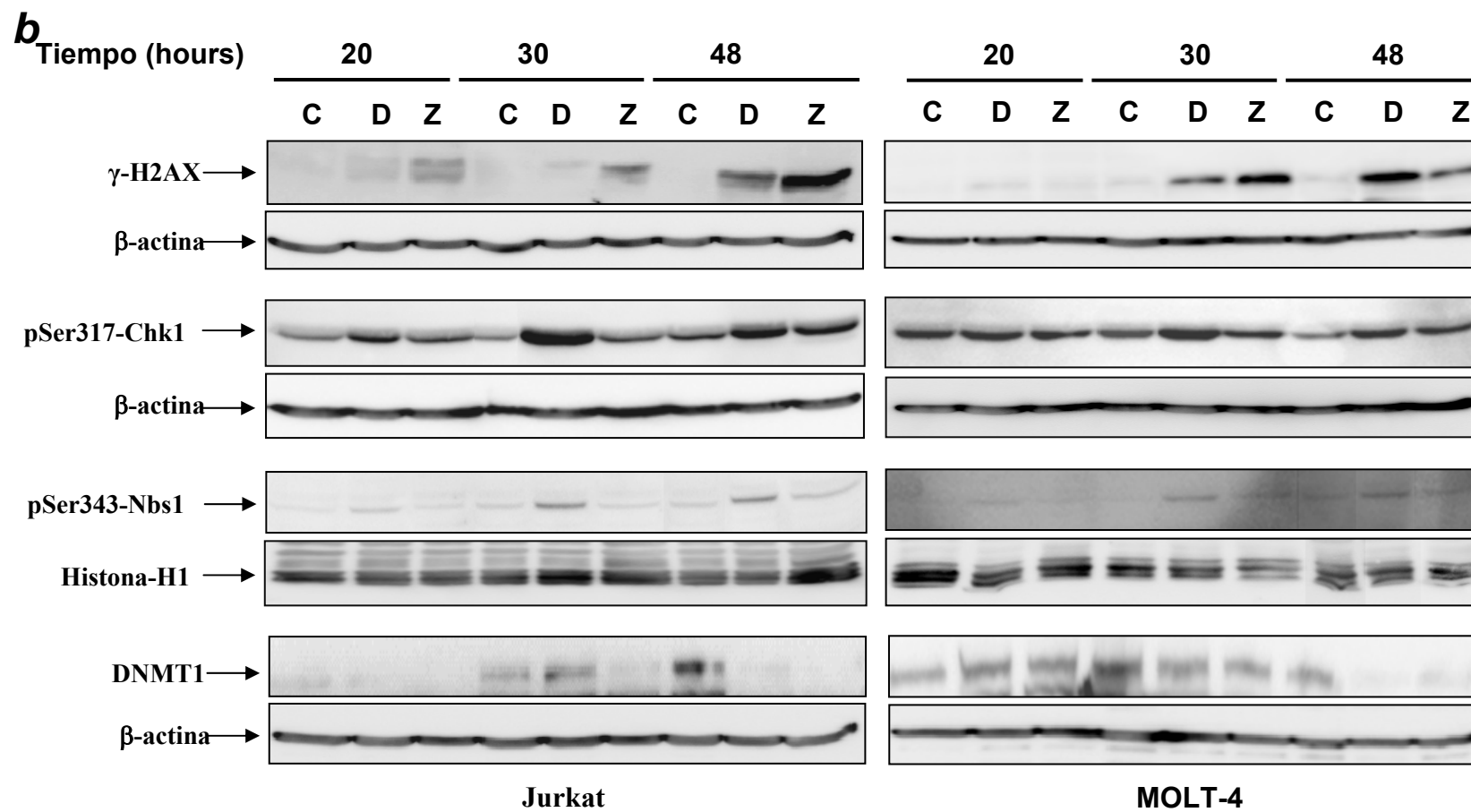
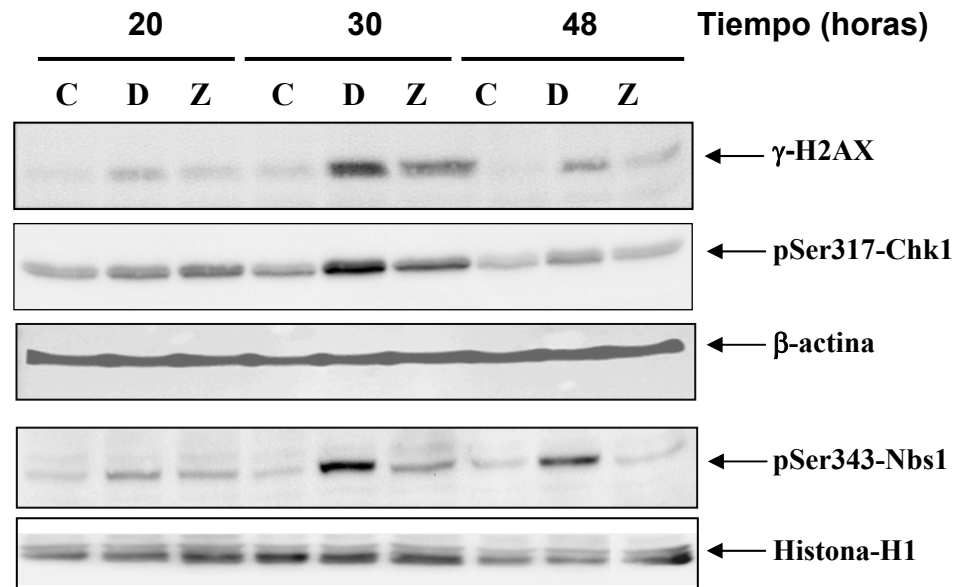
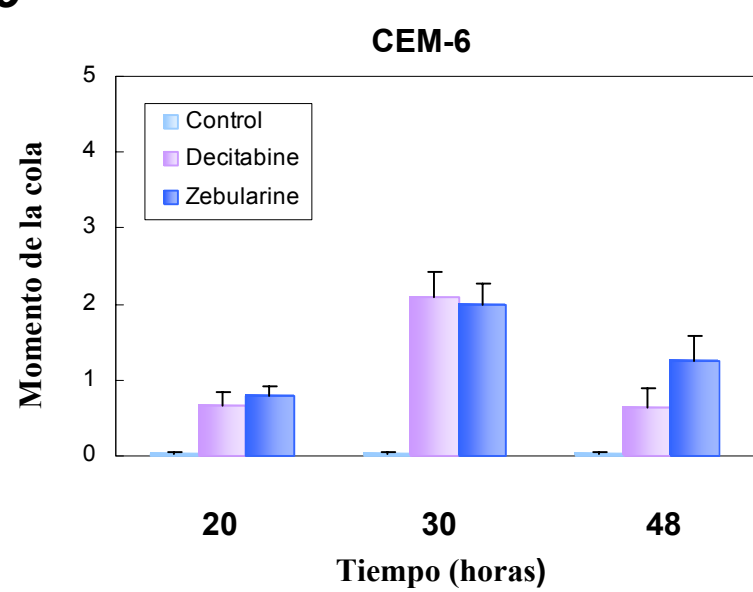


Figure 6

**C**



## **PARP-1 and DNA damage are required for optimal induction of autophagy**

José Manuel Rodríguez-Vargas<sup>1</sup>, María José Ruiz-Magaña<sup>2</sup>, Carmen Ruiz-Ruiz<sup>2</sup>, Jara Majuelos-Melguizo<sup>1</sup>, Andreína Peralta-Leal<sup>1</sup>, José Antonio Muñoz-Gómez<sup>3</sup>, Eva Siles<sup>4</sup>, Abelardo López Rivas<sup>5</sup>, Marja Jäättelä<sup>6</sup>, and F. Javier Oliver<sup>1,7</sup>

1. Instituto López Neyra de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada, Spain
2. IBIMER, Universidad de Granada
3. CIBERED, Hospital Universitario san Cecilio, Granada, Spain
4. Dpt. Ciencias Experimentales , Universidad de Jaen, Spain
5. CABIMER, CSIC, Sevilla, Spain
6. Danish Cancer Society Institute of Cancer Biology Strandboulevarden 49 DK-2100 Copenhagen, DENMARK
7. To whom correspondence should be addressed

F. Javier Oliver

Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC

Avda. Conocimiento s/n

18100 Armilla, Granada

Spain, Phone: 34 958181655

e-mail: [joliver@ipb.csic.es](mailto:joliver@ipb.csic.es)

**Key words:** Starvation, Autophagy, DNA damage, PARP-1, mTOR, AMPK

**Abstract:** In response to nutrient stress, cells start an autophagy program that can lead to adaptation or death. The mechanisms signalling from starvation to the initiation of autophagy are not fully understood. In the current study we show that the absence or inactivation of PARP-1 strongly delays starvation-induced autophagy. We have found that an initial event of starvation-induced autophagy is DNA damage as measured by  $\gamma$ -H2AX accumulation and comet assay, with PARP-1 knockout cells displaying a reduction in both parameters. During starvation, ROS-induced DNA damage activates PARP-1, leading to ATP depletion (an early event after nutrient deprivation). The absence of PARP-1 blunted AMPK activation and prevented from the complete loss of mTOR activity, leading to a delay in autophagy. PARP depletion favors apoptosis in starved, suggesting a pro-survival role of autophagy and PARP-1 activation after nutrient deprivation. In vivo results show that neonates of PARP-1 mutant mice subjected to acute starvation also display deficient liver autophagy, suggesting a physiological role for PARP-1 in starvation-induced autophagy. Globally, we have found that PARP signalling pathway is a key regulator of the initial steps of autophagy commitment following starvation.

## Introduction

Nutrient starvation alarms eukaryotic cells to adjust metabolism to survive. An early response of the cellular metabolic adjustments involves inhibition of growth and induction of macroautophagy (referred to as autophagy) to optimize the usage of limited energy supplies. Autophagy, as a cellular process mobilizing intracellular nutrient resource, plays an important role in contributing to survival during these growth unfavorable conditions. Is a highly conserved self-eating process in which intracellular membrane structures engulfed a portion of cytoplasmic organelles for lysosomal degradation. Eukaryotic cells have developed a mechanism through which autophagy induction is tightly coupled to the regulation of cell growth. Disruption of autophagic pathways is associated with multiple disease states, including neurodegenerative diseases, cancer, infection, and several types of myopathy (Levine & Kroemer, 2008). Autophagy is also a major mechanism by which starving cells reallocate nutrients from unnecessary to more essential processes (Levine & Kroemer, 2008). During autophagy, a cytosolic form of light chain 3 (LC3; LC3-I) is cleaved and then conjugated to phosphatidylethanolamine to form the LC3-phosphatidylethanolamine conjugate (LC3-II), which is recruited to autophagosomal membranes (Kabeya et al, 2000).. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) enzymes catalyze the conversion of  $\text{NAD}^+$  to polymers of poly(ADP-ribose) (PAR) (Schreiber et al, 2006). Although its role in the DNA-damage response has long been recognized, recent work indicates that PAR itself acts to directly induce cell death through stimulation of apoptosis-inducing factor (AIF) release (David et al, 2009).

Recent studies have also implicated PARP-1 in autophagy induced by DNA damage and oxidative stress (Munoz-Gamez et al, 2009). There are, however, important issues that remains unresolved, i.e., the involvement of PARP signalling in a physiologic



model of autophagy as is the case for nutrient deprivation and the connection of PARP activation with the autophagic components. Among the numerous factors involved in the regulation of autophagy and growth, TOR (target of rapamycin) is a key component that coordinately regulates the balance between growth and autophagy in response to cellular physiological conditions and environmental stress.

In the current study we have found that starvation-induced autophagy results in DNA damage (as measured by comet assay and  $\gamma$ -H2AX accumulation) and PARP-1 activation, and ROS production leading to the inhibition of the mTOR switch. Moreover, *parp-1-/-* neonates display a deficient autophagy response following acute starvation. Altogether these results place PARP-1 and PAR formation as a key player in the decision of the cell to engage autophagy.

## Methods

**Fibroblast Cell Culture and Treatments.** Immortalized mouse embryonic fibroblast (MEFs 3T3), derived from both wild-type and PARP-1 KO mice, and MEFs 3T3 *Bax-/-Bak-/-GFP-LC3*, were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10 % inactive fetal bovine serum (FBSi, Gibco Invitrogen), at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. MCF7 GFP-LC3 cells were cultured in RPMI 1640 GlutaMAX (GIBCO Invitrogen) with 6% FBSi. Cells were starved with Balanced HANK Solution without Aminoacids (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.3 mM, CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O 2 mM, HEPES 10 mM, D-glucose 5 mM), at different times.

For western blot, cells were plated in 6-well plates with a density of  $4 \times 10^5$  cells per plate and treated the next day with HANK solution. For the assessment of cell death, cells were plated in 24-well plates with a density of  $3.5 \times 10^4$  cells per well and in 6-well plates with  $2.5 \times 10^5$  cells per well. To count the number of vesicles per cell, cells were plated in 6-well with cell density of  $4 \times 10^4$  cells per well on coverslips and starved

in the next day at different times. Fluorescence microscopy analysis was performed with a Zeiss Microscope.

The autophagy inhibitor 3 Methyl Adenine (3MA, Sigma) was dissolved in culture medium and was maintained at -20°C (10 mM) immediately before its use (2 mM)

The PARP-1 inhibitor 3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinolinone] or DPQ (25 mM, Alexis Biochemicals) was dissolved in DMSO and was maintained at -20°C immediately before use (40  $\mu$ M). PJ34, another PARP-1 inhibitor, was dissolved in H<sub>2</sub>O and was maintained at -20°C immediately before use (10  $\mu$ M).

In all the cases, cells were pre-treated with 2mM 3MA, 40  $\mu$ M DPQ or 10  $\mu$ M PJ34, during 1.5 hours before; autophagy and PARP inhibitors were maintained during all the treatment with HANK solution.

Rapamycin and Concanamycin A were used as positive controls of autophagy induction. Rapamycin was used at 100 nM during 4 hours and Concanamycin A at 4 nM during 4 hours.

**Cell Viability Assays.** The levels of cell death in MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> cell lines were determined using Trypan Blue Exclusion Assay (a), MTT (b) and Propidium Iodide (c). (a) Trypan blue: 3T3 cells were seeded at 3.5 x 10<sup>4</sup> cells per well in 24-well plates and incubated overnight at 37 °C. After the starvation with HANK Solution, cells were washed and trypsinized. The cellular pellet was dissolved in 50  $\mu$ l of Trypan Blue Solution (Fluka) and the number of viable cells were counted in a Neubauer Chamber. (b) MTT assay (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromide) was performed using Cell Proliferation Kit I (MTT, Roche)

following manufacturer's instructions. (c) Propidium Iodide was used as exclusion staining, using a FACScalibur flow cytometer.

**Immunofluorescence.** Immunostaining for poly (ADP-ribose) (PAR) was performed on cells grown on glass cover-slips and fixed in ice-cold methanol-acetone (1:1) for 10 minutes. Poly (ADP-ribose) was detected by immunofluorescence, using a monoclonal antibody (Trevigen) and FITC-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin (Sigma, St Louis Mo). Nuclear counterstaining with DAPI was performed after removal of excess secondary antibody. Immunostaining was visualized with a Zeiss Fluorescence Microscope.

**Quantification of lipid droplets by fluorescence microscopy.** MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> seeded in 6 wells plate on glass cover-slips, were starved during 1 and 2 hours and were fixed with Paraformaldehyde (4%, wt/vol). Lipids droplets were marked with BODIPY<sup>R</sup> 493/503 (Invitrogen, Stock 10 mM in DMSO - 20°C) for 5 minutes at room temperature and visualised in a Zeiss Fluorescence Microscope.

**Western Blot Analysis.** After the deprivation, cells in culture, were washed with 1X PBS and were resuspended in 70 µl of Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 12.5 mM β-Mercaptoethanol) for 45 minutes on ice. Pellet was discarded and the supernatant was maintained at -20°C. Proteins were resolved on SDS-10% polyacrylamide gels and transferred onto PVDF Membrane (Biorad). The blot was blocked with 5% milk powder in 1X PBS with 0.1% Tween-20 for 60 minutes, washed with PBS/Tween, and incubated overnight with the different antibodies anti-poly(ADP-ribose) (PAR) (TREVIGEN, 4335-MC-100), anti-PARP-1(C2-10 mouse, ALEXIS), anti-LC3 (NanoTools, clone 5F10,03231-100/LC3-5F10), anti-ATG7 (Cell Signaling #2631, Beverly, MA), anti-phospho-p70s6 kinase (Cell Signaling Technology #9206, Beverly, MA), anti-p70s6k total (Cell Signaling, #9202, Beverly, MA), anti-

phospho-Akt (AbCam ab27773, Cambridge, UK), anti-Akt (Cell Signaling Technology #9272, Beverly, MA), anti-phospho-AMPK $\alpha$  (Thr172) (Cell signalling #2535, Beverly, MA), anti-AMPK $\alpha$  (Cell Signaling, #2603, Beverly, MA), anti-phospho-ERK ( Santa Cruz Biotechnology, sc-7383), anti-ERK total ( ZYMED, Invitrogen, 61-7400), anti-Caspase 8 ( BD Pharmingen, 551234 ).  $\alpha$ -tubulin (Sigma, St Louis Mo),  $\beta$ -Actin (Sigma Aldrich, A5316) and GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, sc-37187) were used as loading control. Bands were visualized by ECL-PLUS (Amersham Biosciences) and the pictures were taken with the imaging system ChemiDoc XRS System (BIO-RAD) and medical X-ray films (AGFA).

**ATP determination.** Intracellular ATP was measured using a luciferin/luciferase-based assay (Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Bioluminescent Assay Kit, Sigma, Saint Louis, USA) following manufacturer's guidelines. A standard curve was generated from known concentrations of ATP and used to calculate sample ATP concentrations. Protein concentration was determined using Bradford protein assay reagents (Bio-Rad). The content of ATP was normalized by protein content.

**Autophagy Assays.** GFP-LC3-expressing cells have been used to demonstrate induction of autophagy. We used the GFP-LC3 expression vector kindly supplied by Dr. T. Yoshimori (National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan), in 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> cells transiently transfected with this vector with jetPEI<sup>TM</sup> (Polyplus transfections, Illkirch, France), according to the manufacturer's protocol. The assay was performed on cells grown on glass cover-slips and after the different treatment with HANK solution, these cells were fixed with Paraformaldehyde (4%, wt/vol). To determine the LC3 localization GFP-LC3-transfected cells were observed under a Zeiss Fluorescence Microscope and to determine the LC3-II translocation in MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> we did western blot of LC3-I and its proteolytic derivative LC3-II (18 and 16 kDa, respectively), using a monoclonal antibody against LC3, from MBL (Medical and Biological Laboratories). We have also used MEFs *Bax*<sup>-/-</sup>

/Bak-/- that expressed GFP-LC3 in a stable form, to determine the role of apoptosis in this model.

**RNA interference.** Cells were transfected with indicated siRNAs at 50 nM using Dharmafect transfection agent (Dharmacon Research, CO, USA) according to the manufacturer's guide. siRNA corresponding to the cDNA sequences were: ATG7 no. 1 from Invitrogen, Human PARP-1 from Ambion Applied Biosystems and Mouse PARP-1 from Santa Cruz Biotechnology.

After 48 hours after the transfection, cells were treated as designated and observed under a Zeiss Fluorescence Microscope or the proteins analysed by western blot.

**ROS and DNA damage determination.** The production of Reactive Oxygen Species, were measured through flow cytometry in an Epics Elite ESP cytometer, Coulter, using 8mg/ml DCFDA (35845, FLUKA), in DMSO, a specific probe to reactive oxygen species.

**Electron Microscopy.** Animal experimental protocols were reviewed and approved by the Ethical Committee of the Spanish Council of Scientific Research (CSIC) . Parp-1 wild type and Knockout (de Murcia et al, 1997) neonatal mice were used to determine the differences in autophagy induction during starvation in hepatic tissue. Neonatal mice were harvested in the first 4 hours after birth. The livers of mice wild-type and KO for parp-1 were extracted and washed with PBS1x and prefixed during 30 minutes in a Fixation Solution with Cacodilate Buffer 0.1 M pH 7.4 and Osmium Tetraoxyde during 60 minutes at 4°C. After this treatment, tissues were washed with ddWater and the samples were stained with Uranil Acetate. The ultrathin sections were performed with a diamond knife in an ultramicrotome (Reichert Ultracut S). The samples were analyzed in a TEM Zeiss 902 with 80 Kv of voltage acceleration ( CIC-UGR ).

## Results

### The absence or inhibition of PARP-1 delays starvation-induced autophagy

Starvation or nutrient deprivation is a physiological cellular stress to induce autophagy in eukaryotic cells. To study the role of PARP-1 in starvation-induced autophagy, we transfected transiently MEFs 3T3 *parp-1<sup>+/+</sup>* and MEFs 3T3 *parp-1<sup>-/-</sup>* cells with GFP-LC3, and we starved these cells with HANK solution during 1, 2 and 4,5 hours; the percentage of cells with punctated pattern of GFP-LC3 was counted under fluorescence microscopy. In the non-starved cells GFP-LC3 was diffusely distributed in the cytosol and nucleus, but after treatment with HANK's there was a punctated pattern, indicative of an accumulation of autophagosomes (Fig.1A). Equally the number of GFP-LC3 vesicles is higher in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>*, approximately 20 vesicles/cell in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* and 8-9 vesicle/cells in MEFs *parp-1<sup>-/-</sup>* at 2 hours of starvation (Fig.S1). At different times of starvation, a decreased number of cells with GFP-LC3 punctated pattern is observed in MEFs *parp-1<sup>-/-</sup>* (Fig. 1A). The conversion of LC3-I to LC3-II through proteolytic cleavage and lipidation is a hallmark of mammalian autophagy; we have measured the LC3 translocation during starvation in *parp-1<sup>+/+</sup>* and *parp-1<sup>-/-</sup>* cells, and this translocation decreases in MEFs *parp-1<sup>-/-</sup>* (Fig.1B). These data indicate a pronounced delay of autophagy in the absence of PARP-1.

To further evaluate the implication of autophagy in this model, we used the chemical inhibitors of autophagy 3-Methyladenine (3-MA), an inhibitor of class III phosphatidylinositol 3-kinase, as well as the siRNA-based knockdown of one essential autophagy protein, Atg7. 3-MA and siRNA of Atg7 (Fig.1C and D respectively) produced an important reduction in the number of cells with GFP-LC3 punctated pattern in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* at 2 hours of starvation with HANK solution, blocking effectively the starvation-induced GFP-LC3 translocation and the development of the

autophagy pathway. In starved MEFs *parp-1<sup>-/-</sup>* 3-MA or siRNA of Atg7 completely avoid autophagy (Fig.1C, 1D and Fig. S2). These data suggest that the translocation of GFP-LC3 observed in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* is due to autophagy and reflect the functional role of autophagy, during starvation. The absence of PARP-1 synergize with 3-MA or ATG7 siRNA to maintains very low levels of autophagy during starvation (Fig. 1C and 1D).

To evaluate the role of PARP-1 in starvation-induced autophagy, we tested the effect on the levels of autophagy of the PARP-1 inhibitor DPQ and the siRNA-based depletion of PARP-1 in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>*; cells were transfected with GFP-LC3 and starved with HANK solution at different times. Inhibition of PARP-1 with 40  $\mu$ M DPQ reduced the number of cells with a typical GFP-LC3 punctated pattern in starvation in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* but had no effect in *parp-1<sup>-/-</sup>* MEFs (Fig 2A). DPQ also reduced the number of GFP-LC3 positive vesicles after 2 hours of starvation in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* and had no effect in *parp-1* knockout cells (Fig.S3).

PARP-1 silencing induced a reduction in the number of autophagic cells after 2 hours of starvation (Fig.2B), maintaining similar levels to those obtained with *parp-1<sup>-/-</sup>* cells (Fig. 2A). Further, siRNA of PARP-1 reduced the endogenous LC3 translocation during starvation at levels very similar to non-starved situation in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* (Fig. 2C). The non-specific siRNA had no effect on the levels of autophagic MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* cells. These data suggest that PARP-1 and PARP activation play a role in the commitment to autophagy in situations of nutrient deprivation. To corroborate this finding, we reconstituted PARP-1 in MEFs *parp-1<sup>-/-</sup>* with pBC-PARP-1 plasmid (Fig2D and Fig. S4) and we co-transfected with GFP-LC3. Cells transfected with pBC empty vector were used as negative control. The reconstitution of PARP-1 in MEFs *parp-1<sup>-/-</sup>* during starvation increased the rate autophagic cells respect to MEFs *parp-1<sup>-/-</sup>* transfected with the empty vector (Fig.2D and Fig.S4). These data indicate that PARP-1 participates actively in the commitment of starvation-induced autophagy and may be

involved in the formation of autophagosomes, since its inhibition or silencing leads to a delay in the autophagic response, including LC3 translocation and autophagosomes formation (Fig.2C).

### **Starvation induces ROS production, DNA damage and activation of PARP-1,**

PARP-1 is a nuclear enzyme activated by DNA damage; following genotoxic stress PARP-1 synthesizes a ramified polymer of poly(ADP-ribose) or PAR which participates in the regulation of the nuclear homeostasis (Krishnakumar & Kraus, ; Munoz-Gamez et al, 2009; Schreiber et al, 2006). Many different cellular insults that cause DNA damage activate PARP-1 and induce PARP-1-dependent cell death. During starvation there is an important production of Reactive Species of Oxygen or ROS which are involved in triggering autophagy (Chen et al, 2009; Scherz-Shouval et al, 2007). We hypothesized that ROS production during starvation could induce activation of PARP-1 and play an important role in the regulation of PARP-1-dependent autophagy.

Starvation induces activation of PARP-1 in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>*, measured as PAR synthesis (Fig.3A). To correlate the production of PAR with the deprivation of nutrients we used the PARP inhibitor PJ34 during starvation and a positive control of activation of PARP-1 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); we indeed confirmed the synthesis of PAR by western blot (Fig.3A) and immunofluorescence (Fig.S5).

To demonstrate the production of ROS during starvation we used DCFDA as a probe to measure ROS in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* and MEFs *parp-1<sup>-/-</sup>* by flow cytometry. PARP-1 deficient cells display a reduced production of ROS already at very short time following starvation (Fig.3B). Assuming that the ROS synthesis and their nuclear diffusion to induce DNA damage is very fast, we choose 30 minutes of starvation as the time to measure DNA damage with COMET assay and the  $\gamma$ -H2AX histone which phosphorylation is essential for the initial recognition of DNA breaks. COMET assay



showed that 30 minutes after starvation, DNA damage was much more pronounced in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* (Fig.3C-1); the tail moment of the comets is much higher in *parp-1<sup>+/+</sup>* cells, and almost fully repair is achieved after 1 hour, indicating that DNA-repair machinery is active (Fig.3C-2); on the contrary, in *parp-1<sup>-/-</sup>* the level of DNA damage is clearly diminished respect to parental cells at 30 minutes, but the DNA-repair machinery is not as efficient as in parental cells, resulting in a residual damage after 60 min of starvation (Fig.3C-1 and 3C-2).

At the same time, MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* had higher levels of phosphorylation of H2AX, suggesting a higher DNA damage due to increased ROS production (Fig.3D). -H2AX signal peaks at 1 hour of starvation in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* while in PARP-1 deficient cells -H2AX continues to accumulates, similar to what we described above for the COMET assay. Furthermore, indirect IF analysis reveals that the number of *parp-1<sup>+/+</sup>* cells with positive staining against -H2AX during 1 hours of starvation was elevated respect to *parp-1<sup>-/-</sup>* cells (Fig.S6).

To further confirm the implication of ROS in the initiation of autophagy we used the antioxidant n-acetylcysteine (NAC). Cells exposed to this compound showed a decrease in -H2AX accumulation and LC3II lipidation, indicating that ROS release is key in triggering DNA damage and subsequent autophagy (fig. 5E).

Globally, these data indicate that during starvation there is an important production of ROS in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>*, these ROS induce DNA damage and PARP-1 activation leading to PAR synthesis and triggering the initiation of autophagy associated to nutrient deprivation. Although *parp-1<sup>-/-</sup>* cells do produce ROS during starvation, this production do not lead to massive DNA damage and PARP-1 activation; consequently this cells display an impaired autophagy.

## **Lack of PARP-1 reduces ATP depletion, AMPK activation and mTOR inhibition during starvation-induced autophagy**

Energy depletion, measured as a balance of AMP/ATP rate, is the main sensor for AMPK to induce autophagy. To investigate whether PARP-1 is implicated in AMPK dependent autophagy, we have measured the levels of ATP in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* and MEFs *parp-1<sup>-/-</sup>* during different times of starvation. The levels of ATP in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* after 60 minutes of starvation decreased to less than 50% of the initial level, while in MEFs *parp-1<sup>-/-</sup>* ATP levels decreased significantly more slowly (Fig.4A). Treatment with 3-MA during starvation blocked ATP depletion in *parp-1<sup>+/+</sup>* cells, indicating that this energy drop was due to autophagy induced by nutrient deprivation (Fig.4A). 3-MA also prevented ATP depletion in MEFs *parp-1<sup>-/-</sup>* cells, that have delayed autophagy. The depletion of ATP levels, correspond with a sustained activation, through phosphorylation, of the kinase AMPK in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* (Fig. 4B). This activation is almost absent in MEFs *parp-1<sup>-/-</sup>* (Fig.4B).

mTOR is a serine/threonine protein kinase that regulates cell growth, cell proliferation, cell motility, cell survival, protein synthesis, and transcription (Hay & Sonenberg, 2004). mTOR is a sensor of the cellular energy status. For this action is regulated by the kinase AMPK, that is an important activator of autophagy (Hoyer-Hansen & Jaattela, 2007; Meley et al, 2006). The AMPK pathway activates the autophagy through mTOR inhibition (Gwinn et al, 2008; Shaw et al, 2004). We have thus, evaluated the status of mTOR, which turn-off autophagy when it is activated. We have determined mTOR activation as phosphorylation of its substrate p70s6 kinase. Short after starvation, 30 minutes, *parp-1<sup>+/+</sup>* cells attained a complete inhibition of mTOR (Fig.5C), indicating that parental cells were engaged in autophagy, while in *parp-1<sup>-/-</sup>* cells mTOR was only partially inhibited even after 1 and 2 hours of nutrient starvation; 4 hours after starvation mTOR activation start to recover in the absence of PARP-1 (Fig.5C). Antioxidant treatment with NAC prevented starvation-induced mTOR

inactivation (figure 5E). This data suggested that PARP-1 regulates the level of inactivation of mTOR during starvation and functions as a positive regulator of autophagy when cellular energy declines.

To confirm the previous results, we analyzed the role of PARP-1 in the pathway of activation of mTOR, during starvation, in a tumoral model. In cancer cells the energy balance is critical to adapt the cell to the tumoral microenvironment, including low nutrient and oxygen availability (Gogvadze et al, 2008; Tomitsuka et al). We have performed assays with a tumoral cell line of human breast cancer cells stably transfected with GFP-LC3, MCF7-GFP-LC3. During starvation these cells show endogenous LC3 translocation and the typical punctated pattern of GFP-LC3 counted under fluorescence microscopy (Figures 5E, F and S7). MCF7 GFP-LC3 cells were used to determine the level of activation of mTOR during starvation in presence or absence of PARP-1 (Fig.5G). In these cells, mTOR is rapidly inhibited after starvation; 15 min. after nutrient deprivation the phosphorylation levels of p70s6 kinase decreased drastically and the cells had entered in autophagy (Fig.S7). In MCF7 GFP-LC3 depleted of PARP-1 using siRNA(Fig. 5G) ,mTOR inhibition was strongly delayed. mTOR activation is maintained over the time and was similar to the results obtained in MEFs *parp-1*<sup>-/-</sup> (Fig.5C). The delayed inhibition of mTOR in PARP-1 knockout cells and after PARP-1 silencing, demonstrate that PARP-1 regulates the autophagic pathway due to its ability to avoid mTOR inhibition during starvation.

### **Impaired autophagy by PARP-1 disabling, leads to increased apoptotic cell death**

Autophagy is an adaptation and survival pathway against adverse conditions, but if these conditions are maintained for a long time, can lead to cell death, ordinarily called Autophagic Cell Death or ACD (Kroemer & Levine, 2008). Autophagic cell death is morphologically defined as a type of cell death that occurs in absence of chromatin condensation, but it is accompanied by massive autophagic vacuoles in the cytoplasm

(Levine & Yuan, 2005). In contrast with the typical apoptotic cell death, in ACD there is no nuclear fragmentation, plasma membrane blebbing, caspase activation or engulfment by phagocytes, in vivo (Baehrecke, 2005). Cells undergoing autophagy under adverse conditions can recover to their optimum physiological state after changing of the surrounding conditions, and the adverse stimulus disappears. However, cells that have autophagy inhibited or cells with a disrupted mitochondrial transmembrane potential, inexorably died even if optimal conditions are recovered (Boya et al, 2005). To determine what is the predominant cell death process in starvation-induced autophagy after ablation/inactivation of PARP-1, we investigated both autophagy and apoptotic cell death features by prolonging the time of starvation. Time course of total cell death following starvation showed accelerated cell death rate in the absence of PARP-1 as determined by propidium iodide (PI) incorporation (Fig. 5A). PARP-1 inhibition with PJ34 or PARP-1 knockdown gave similar results of increased cell death after nutrient deprivation (Fig. 5B). PARP-1 inhibited/silenced MEFs 3T3 *parp-1<sup>+/+</sup>* died at similar rate than MEFs 3T3 *parp-1<sup>-/-</sup>* at 8 hours of starvation (Fig. 5B); therefore, the absence of PARP-1 during starvation accelerates autophagy-derived cell death. These data were confirmed by other different methods of cell death assays as Trypan Blue Dye Exclusion Staining and MTT Cell Survival Assay and with a different PARP-1 inhibitor as DPQ 40  $\mu$ M and siRNA of PARP-1 (data not shown).

Autophagy has a prosurvival function after cellular stress like nutrient withdrawal. This difference in cell demise following starvation could be due to the decreased levels of autophagy after disabling PARP-1. To determine whether autophagy has a cytoprotective role in parental cells, we inhibited autophagy with 3MA and we determined cell viability 8 hours after nutrient deprivation (Fig. 5C). The presence of 3MA during starvation, protected MEFs 3T3 *parp-1<sup>+/+</sup>* against cell death, while cell viability was not affected by 3MA treatment in PARP-1 deficient cells, suggesting that wild type cells died mainly as consequence of autophagy after

starvation while the inactivation/blockade of PARP-1 leads to a non-autophagic cell death under the same conditions of nutrient deprivation. Silencing of the autophagic gene ATG7 strongly delayed cell death in MCF-7 cells subjected to nutrient starvation while the treatment with the PARP inhibitor PJ34 still increased cell death of ATG7 silenced/autophagy deficient cells, suggesting that autophagy derived cell death is not involved in the accelerated cell loss produced by PARP inhibition (figure 5C) .

To analyze the type of cell death that occur in the absence or inhibition of PARP-1 during starvation, we used a double-knockout cell line for Bax and Bak ; Bax and Bak are two essential proteins in the apoptotic process and these cells cannot undergo mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) during apoptosis (Caro-Maldonado et al, 2010).. Additionally, this cell line is stably transfected with GFP-LC3. To determine the levels of autophagy, we starved these cells with HANK solution using the same time settings than in the previous figures (Fig.5D). These cells displayed LC3 translocation during starvation (Fig. 5D) and the percentages of cells with the typical GFP-LC3 pattern with HANK solution was similar to MEFs 3T3 *parp-1<sup>+/+</sup>*. Moreover, the co-treatment with 3MA or the PARP inhibitor DPQ reduced the percentage of autophagic cells, as occurs in MEFs *parp-1<sup>+/+</sup>* (Fig.5 E, and 2A). To determine to what extent the apoptotic component contributes to the increased cell death in the absence of PARP-1, we silenced PARP-1 in MEFs *Bax<sup>-/-</sup>/Bak<sup>-/-</sup>*-GFP-LC3 by siRNA ; knockdown of PARP-1 in a context of *bax/bak* knockout decreased the levels of cell death suggesting that the gain in cell death after inactivation of PARP-1 during starvation has an apoptotic component. To confirm this result we have measured caspase-8 activation by western blot and we observed that 6 hours after starvation there was an important caspase-8 cleavage with a fragment of processing at 38 KDa, as compared to positive control of caspase 8 activation (Fig.5I); caspase-8 processing did not take place in MEFs 3T3 *parp-1<sup>+/+</sup>*. These data confirm that MEFs 3T3 *parp-1<sup>-/-</sup>* with delayed autophagy, enter in apoptosis after several hours of

starvation; thus, the presence and activation of PARP-1, allows a cytoprotective autophagy where the cell try to compensate the lack of nutrient and energy depletion by controlled autophagy. Thus, PARP-1 wild-type cells die by autophagy-dependent cell death while PARP-1 knockout cells and die by apoptosis.

### **Impaired starvation-induced autophagy in PARP-1 deficient mice**

In order to analyse the in vivo consequences of the impaired autophagy after invalidation of PARP-1, we starved for 4 hours pups from both *parp-1* <sup>+/+</sup> and *parp-1* <sup>-/-</sup> mice. TEM (transmission electron microscopy) analysis showed that liver from PARP-1 proficient mice display characteristics of autophagy such as concentric membranes structures engulfed in autophagosomes, ER dilation and lipid droplets accumulation (figure 6). Concentric membranes structures reflects degradation of membranous cellular components that rearrange in membranous whorls called myelin figures. To further support this observation, we measured LC3 lipidation in liver samples from *parp-1* <sup>+/+</sup> and *parp-1* <sup>-/-</sup> mice pups subjected or not to starvation. Reduction in LC3I was much more pronounced in livers from *parp-1* <sup>+/+</sup> mice (figure 6B).

The intracellular storage and utilization of lipids are critical to maintain cellular energy homeostasis. During nutrient deprivation, cellular lipids stored as triglycerides in lipid droplets are hydrolysed into fatty acids for energy. A second cellular response to starvation is the induction of autophagy, which delivers intracellular proteins and organelles sequestered in double-membrane vesicles to lysosomes for degradation and use as an energy source. Lipolysis and autophagy share similarities in regulation and function but are not known to be interrelated. Thus, in the absence of PARP-1, liver from neonates has impaired autophagic response as has been shown in knockout mice of genes involved in the core complex of autophagy (Komatsu et al, 2005) (Lee et al, 2008).

## Discussion

Genetic and environmental factors modulate the response of multicellular organisms to stress and the maintenance of tissue homeostasis and a highly integrated response patterns are found in many organisms, but the means by which so many diverse pathways, critical for cellular, tissue and ultimately, for organismal survival, are coordinated, has yet to be elucidated. In this report, we show that PARP-1 activation triggers autophagy and that optimal induction of autophagy induced by nutrient deprivation requires PARP-1 activation. At present, it is an open question how PARP-1 can activate AMPK/mTORc1 canonical autophagy. Our results clearly demonstrates the lack of AMPK activation after PARP-1 inactivation. In the absence of PARP-1 or after its inhibition/silencing, ATP levels do not decrease as much as in wild type cells (Fig. 4A); consequently AMPK remains inactive and do not signal for mTOR inactivation, leading to impaired autophagy. Another speculative possibility, is that ROS-induced DNA damage and PARP-1 over-activation caused mitochondrial dysfunction and  $Ca^{2+}$  release, thereby activating AMPK (Hoyer-Hansen & Jaattela, 2007) . Other possibility that may explain how PARP-1 connect with the AMPK/mTOR signalling (besides the maintenance of the energy status) is that PARP inactivation leads to unefficient ATM response which has been reported to be involved in the activation of AMPK (Aguilar-Quesada et al, 2007; Haince et al, 2007) .

Our data also suggest that the PARP-1 is an important in vivo regulator of autophagy and provide a link between PARP-1 function and the overall cellular response to limited nutrients. The results described here demonstrate that during nutrient starvation, ROS production and DNA damage leads to PARP-1 activation, needed for the cells to engage starvation-induced autophagy. This role of PARP-1 in autophagy is related to its ability to sense DNA damage and deplete energy stores

after its over-activation. Thus, our study provides a mechanistic link between nutrient deprivation induced-autophagy, PARP-1 activation and the connection with the downstream signalling leading to mTOR inactivation. Moreover, we have also analysed the in vivo consequences of PARP-1 inactivation in starvation-induced autophagy. Starvation induces hepatic autophagy and increases delivery to the liver of fatty acids from adipose tissue lipolysis. Electron microscopy revealed that starvation increased the frequency of lipid droplets with areas of increased density and asymmetrically localized multi-membrane structures. The crucial role of neonatal autophagy was clearly demonstrated by targeted inactivation of the autophagy-related genes Atg5 and Atg7 (Komatsu et al, 2005; Kuma et al, 2004). Mice deficient in these genes were apparently normal at birth, except for a slightly lower body weight than control (about -10% in Atg5 null and -18% in Atg7 null mice), but died within 1 day after birth. One of the initial observations of the phenotype of parp-1 knockout mice was that average litter size was smaller (about 40%) than those of PARP+/+ (de Murcia et al, 1997); in view of this convergent phenotype regarding the difference in the pups size between ATG-7, ATG-5 and PARP-1 knockout mice, we hypothesize that the impairment in autophagy in the absence of PARP-1 could be one of the explanations for this reduced size of PARP-1 knockout neonates .

ROS have been reported to induce autophagy in a number of cell types and experimental settings, including nutrient starvation (Scherz-Shouval et al, 2007). Although autophagy after nutrient deprivation has a pro-survival function, our findings support that PARP-1 is necessary for the cell to persist in autophagy following starvation if nutrient deprivation is maintained for a long time (Fig. 5B). An interesting finding in our study is that suppression of PARP activation by different means leads to impaired autophagy and eventually to increased cell death. We have defined the mechanism by which PARP-1 suppression accelerates cell death using the apoptotic deficient cell line double knockout for *bax* and *bak* and we have found that starvation



leads *bax*<sup>-/-</sup>*bak*<sup>-/-</sup> cells to autophagy and cell death, suggesting that apoptosis is not the main pathway of cell demise triggered by starvation. Nonetheless, suppression of PARP-1 in this context substantially decreased cell death, contrary to what we observed in apoptosis proficient cells; these results suggest that apoptosis is probably responsible for the gain of cell death induced in the absence of PARP-1 after starvation and PARP-1 is needed for the cell to undergo pro-survival autophagy.

One major observation in this study is that a physiological trigger of autophagy, such as nutrient deprivation, is able to induce DNA damage, through the generation of ROS. Genotoxic stress has been reported to repress mTOR in response to oxidative stress produced by ROS through a cytoplasmic signaling node for LKB1/AMPK/TSC2 activation in response to oxidative stress (Nakada et al). Comet assay and  $\gamma$ -H2AX confirmed the persistence of damaged DNA and the level of initial damage correspond with the cell's ability to initiate autophagy. Antioxidant treatment with NAC prevents from DNA damage, mTOR inactivation and slows down autophagy.

Autophagy is a potent tumour-suppressive mechanism, presumably due to its essential contribution to the maintenance of genomic stability (Karantza-Wadsworth et al, 2007) the avoidance of excessive ROS generation (Mathew et al, 2009) and its participation in cellular senescence (Young et al, 2009), which constitutes a barrier against oncogenesis. Accordingly, multiple genes that are required for the induction/execution of autophagy are potent tumour suppressors, including PTEN, TSC1, TSC2, LKB1, ATG4, Beclin-1, UVRAG, and BH3-only proteins of the Bcl-2 family (Maiuri et al, 2009). Here, we revealed the importance of PARP for the autophagic process in a physiologic setting following nutrient starvation. PARP-1 inhibitors are entering clinical trials for different types of cancer. Whether the ability of PARP inhibitors to favour apoptotic cell death during cellular stress, as shortage of nutrients (which very often the case in tumor microenvironment) could also be

exploited as in antitumor therapy by its contribution to autophagy remains an intriguing possibility for further investigation.

**Acknowledgements** We acknowledge Laura López for her technical assistance. JMRV is recipient of a predoctoral fellowship financed by the program JAE-Pre of CSIC. He was also funded by CSIC with a Short-Term Fellowships to stay at the Danish Cancer Society Institute of Cancer Biology in Copenhagen, DENMARK.

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación SAF2006-01094; SAF2009-13281-C02-01, Fundación La Caixa BM06-219-0; and Junta de Andalucía P07-CTS-0239 to FJO.

Aguilar-Quesada R, Munoz-Gamez JA, Martin-Oliva D, Peralta A, Valenzuela MT, Matinez-Romero R, Quiles-Perez R, Menissier-de Murcia J, de Murcia G, Ruiz de Almodovar M, Oliver FJ (2007) Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition. *BMC Mol Biol* **8**: 29

Baehrecke EH (2005) Autophagy: dual roles in life and death? *Nature reviews* **6**: 505-510

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. *Molecular and cellular biology* **25**: 1025-1040

Caro-Maldonado A, Tait SW, Ramirez-Peinado S, Ricci JE, Fabregat I, Green DR, Munoz-Pinedo C (2010) Glucose deprivation induces an atypical form of apoptosis mediated by caspase-8 in Bax-, Bak-deficient cells. *Cell death and differentiation* **17**: 1335-1344

Chen Y, Azad MB, Gibson SB (2009) Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell death and differentiation* **16**: 1040-1052

David KK, Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL (2009) Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci* **14**: 1116-1128

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 7303-7307

Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2008) Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol* **18**: 165-173

Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell* **30**: 214-226

Haince JF, Kozlov S, Dawson VL, Dawson TM, Hendzel MJ, Lavin MF, Poirier GG (2007) Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *The Journal of biological chemistry* **282**: 16441-16453

Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* **18**: 1926-1945

Hoyer-Hansen M, Jaattela M (2007) AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy? *Autophagy* **3**: 381-383

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 autophagosomal membranes after processing. *The EMBO journal* **19**: 5720-5728

Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S, White E (2007) Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes & development* **21**: 1621-1635

Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *The Journal of cell biology* **169**: 425-434

Krishnakumar R, Kraus WL The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Molecular cell* **39**: 8-24

Kroemer G, Levine B (2008) Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 1004-1010

Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiya T, Mizushima N (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**: 1032-1036

Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, Tsokos M, Alt FW, Finkel T (2008) A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 3374-3379

Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**: 27-42

Levine B, Yuan J (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of clinical investigation* **115**: 2679-2688

Maiuri MC, Criollo A, Kroemer G Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *The EMBO journal* **29**: 515-516

Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, Dipaola RS, Karantza-Wadsworth V, White E (2009) Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* **137**: 1062-1075

Meley D, Bauvy C, Houben-Weerts JH, Dubbelhuis PF, Helmond MT, Codogno P, Meijer AJ (2006) AMP-activated protein kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *The Journal of biological chemistry* **281**: 34870-34879

Munoz-Gamez JA, Rodriguez-Vargas JM, Quiles-Perez R, Aguilar-Quesada R, Martin-Oliva D, de Murcia G, Menissier de Murcia J, Almendros A, Ruiz de Almodovar M, Oliver FJ (2009) PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy* **5**: 61-74

Nakada D, Saunders TL, Morrison SJ Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature* **468**: 653-658

Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO journal* **26**: 1749-1760

Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nature reviews* **7**: 517-528

Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC (2004) The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* **6**: 91-99

Tomitsuka E, Kita K, Esumi H The NADH-fumarate reductase system, a novel mitochondrial energy metabolism, is a new target for anticancer therapy in tumor microenvironments. *Ann N Y Acad Sci* **1201**: 44-49

**Figure 1: Starvation-induced autophagy is delayed in PARP-1 knockout cells**

**(A)** MEFs 3T3 *parp-1+/+* and *parp-1-/-* were transfected with GFP-LC3; 24 hours following transfection, cells were starved with HANK solution at 1, 2 and 4,5 hours; percentages of LC3 translocation are shown. 100 nM rapamycin for 4 hours was used as positive control of autophagosomes accumulation. The pictures in the right panel show representative images with the subcellular distribution of the autophagic vesicles marker LC3.

**(B)** Immunoblot analysis of endogenous LC3 translocation in control and starved cells at different times of starvation. Rapamycin was used as positive control of LC3 translocation and  $\beta$ -actin as loading control. Similar results were obtained in 3 independent experiments.

**(C)** Effect of 2 mM 3MA on autophagy of MEFs 3T3 *parp-1+/+* and *parp-1-/-* during starvation. 3MA was added, as pre-treatment 1.5 hours before HANK solution and maintained during the starvation in both cells lines to slow down autophagy.

**(D)** Effect of ATG7 silencing on starvation-induced autophagy. MEFs 3T3 *parp-1+/+* and *parp-1-/-* were transfected with ATG7 siRNA(60nM) and 48 hours later they were transfected with GFP-LC3. 24 hours later cells were starved with HANK solution for 30 min, 1 and 2 hours. SIMA or non-specific siRNA was used as negative control, using the same protocol as for siRNA transfection. The right panel show the siRNA-mediated suppression of ATG7 expression in MEFs 3T3 48 hours after transfection. GAPDH was used as loading control.

In A, C and D figures, at least 250 cells were counted in a Zeiss fluorescent microscope in both cell lines, in 3 independent experiments. \*  $p < 0.01$ , \* \*  $p < 0.001$  and #  $p < 0.001$  as compared to starved MEFs 3T3 *parp-1+/+* .

**Figure 2: PARP-1 inhibition or silencing interferes with starvation-induced autophagy.**

**(A)** Effect of the inhibition of PARP-1 with DPQ on starvation-induced autophagy. MEFs 3T3 *parp-1+/+* and *parp-1-/-* were transfected with GFP-LC3; 24 hours later,

cells were pre-treated with 40  $\mu$ M DPQ for 1.5 hours. During the different starvation times, 40  $\mu$ M DPQ was present with HANK solution to maintain PARP-1 inhibited. Percentages of cells with LC3 translocation are shown.

**(B)** Effect of PARP-1 silencing on starvation-induced autophagy. MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> were transfected with murine PARP-1 siRNA (50 nM) and 48 hours later cells were transfected with GFP-LC3, 24 hours after were starved during 2 hours and the percentage of cells with the typical GFP-LC3 punctuated pattern was compared with the percentage in non-silencing MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> starved at the same times. SIMA or non-specific siRNA was used as negative control at 50 nM, using the same protocol as for siRNA transfection. The right panel show the levels of silencing obtained for PARP-1 48 hours after the transfection.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control.

**(C)** Western Blot analysis of the effect of silencing of PARP-1 on endogenous LC3 translocation in MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> starved during 1 hour with HANK solution.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control. Similar results were obtained in 3 independent experiments.

**(D)** Reconstitution of PARP-1 in MEFs 3T3 *parp-1*<sup>-/-</sup> and effect on the levels of starvation-induced autophagy. MEFs 3T3 *parp-1*<sup>-/-</sup> were transfected with pBC-PARP-1 to reconstitute transiently PARP-1 and 24 hours later cells were transfected with GFP-LC3; 24 hours after transfection cells were starved with HANK solution during 30 min and 1 hour. pBC empty plasmid was used as negative control. The right panel show the expression level of PARP-1 24 hours after reconstitution in MEFs 3T3 *parp-1*<sup>-/-</sup> and compared with the levels expression of PARP-1 in wild type and knockout cells.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control.

In A, B and D figures, at least 250 nuclei were counted in a Zeiss fluorescent microscope in 3 independent experiments. \*  $p < 0.01$  as compared to starved MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup>. # $p < 0.01$  as compared to starved MEFs 3T3 *parp-1*<sup>-/-</sup>.

**Figure 3: Poly(ADP-ribose) (PAR) synthesis and DNA damage during starvation-induced autophagy.**

**(A)** Western Blot analysis of PAR formation during starvation. MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> were starved during 30 min, 1 and 2 hours with HANK solution. Whole cell extracts were subjected to PAGE and PAR was measured with a specific antibody. Where indicated, cells were pre-treated with PJ34, a PARP-1 inhibitor, during 1,5 hours and maintained during the nutrient deprivation. 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 minutes, was used as a positive control PARP-1 activation and PAR synthesis.  $\alpha$ -tubulin was used as loading control.

**(B)** ROS production during starvation. MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> were subjected at short times of nutrient deprivation with HANK solution in the presence of the DCFDA probe (8mg/ml), specific to measure ROS with a flow cytometer. Figure shows DCFDA - fluorescence obtained as arbitrary units in 3 independent experiments in triplicate.

**(C)** COMET Assay during starvation. MEFs 3T3 *parp-1+/+* and *parp-1-/-* were starved with HANK solution at 15, 30 and 60 minutes and then were treated according with the manufacturer's instruction. Tail moment of 90 nuclei per condition in 3 independent experiments, were analysed by the specific software CASP (Panel C right). In the right panel images of the COMETs extracted from the software to each cell line in the different times of starvation are shown.

**(D)** Histone  $\gamma$ H2AX phosphorylation during starvation. MEFs 3T3 *parp-1+/+* and *parp-1-/-* were subjected to starvation at the stated times. Total extract were obtained and the levels of phospho-  $\gamma$ H2AX were measured by immunoblotting. Similar results was obtained in 3 independent experiments.  $\alpha$  - tubulin was used as loading control.

\*  $p < 0.01$  and \* \*  $p < 0.001$  as compared to starved MEFs 3T3 *parp-1+/+* in figure C left.

**Figure 4: PARP-1 modulates AMPk activation and mTOR inhibition during starvation-induced autophagy.**

**(A)** Effect of nutrient starvation on ATP levels. MEFs 3T3 *parp-1+/+* and *parp-1-/-* were starved with HANK solution at 15, 30 and 60 minutes. Concentrations of ATP were normalized with total proteins in each sample and referred to the control (100%). 2mM 3MA was added 1,5 hours before nutrient deprivation and was maintained during the experiment in order to inhibit autophagy. Error bars represent SE of the mean (SEM) of 5 independent experiments. # $p < 0.01$  as compared to starved MEFs 3T3 *parp-1+/+* .

**(B)** Immunoblot analysis of AMPk activation in control and starved cells at different times of starvation. The levels of phospho-AMPk was measured with an specific antibody from whole cell extracts in each cell lines after nutrient deprivation . Total AMPk was used to normalized to normalize for the non-phosphorylated protein and  $\beta$ -actin as loading control. Similar results were obtained in 3 independent experiments.

**(C)** Immunoblot analysis of mTOR inhibition during starvation. The levels of phosphorylation of the mTOR substrate, p70s6 kinase, were measured by western blotting in whole cell extracts of MEFs 3T3 *parp-1+/+* and *parp-1-/-* after different times of starvation. Concanamycin A (2 nM) during 4 hours was used as control of mTOR-independent autophagy while Rapamycin (100 nM) during 6 hours was used as control of mTOR-dependent autophagy. Total p70s6 kinase was used to normalize for the non-phosphorylated protein and  $\beta$ -actin as loading control. Similar results was obtained in two independent experiments.

**(D)** Induction of autophagy in MCF7 GFP-LC3 during starvation. Rapamycin was the positive control of autophagy. \*  $p < 0.01$  as compared to non starved MCF7 GFP-LC3 in 3 independent experiments.

**(E)** PARP-1 ablation prevents from autophagy-induced mTOR inhibition in a tumoral model. LEFT PANEL: MCF7 GFP-LC3 cells were starved at different times with HANK solution and the levels of phospho-p70s6 kinase was measured by western blotting. Concanamycin A and Rapamycin were the different controls of mTOR activation and p70s6 kinase and GAPDH were used to normalize for protein loading. These results were obtained in 3 independent experiments. RIGHT PANEL: MCF7 GFP-LC3 cells

were transfected with PARP-1 siRNA (50 nM) (First Line) and 48 hours after transfection, cells were starved with HANK solution; the levels of phospho-p70s6 kinase was measured by western blot (Second Line). Again Concanamycin A and Rapamycin were used as controls of activation of mTOR and total p70s6 kinase and GAPDH to normalize for protein loading. Similar results were obtained in 3 independent experiments.

### **Figure 5: Prosurvival autophagy is switched to apoptosis after PARP-1 ablation**

**(A)** Effect of PARP inhibition and PARP-1 silencing in cell death during autophagy induced by nutrient deprivation. MEFs 3T3 *parp-1+/+* were transfected with PARP-1 siRNA (60 nM) and 48 hours after transfection, cells were pretreated or not with DPQ (40  $\mu$ M). Cells were starved during 8 hours with HANK solution and cell death was analyzed IP incorporation using flow cytometry in 3 independent experiments with 4 replicates per condition.

**(B)** Effect of autophagy inhibition with 3MA on the survival of MEFs 3T3 *parp-1+/+* and *parp-1-/-* during starvation. 3MA was added, as pre-treatment 1,5 hours before the HANK solution and kept during starvation in both cells lines to maintain the autophagy inhibited. Percentage of survival was obtained by MTT Survival Assay. Similar survival rates were obtained in 3 independent experiments with 4 replicates per condition.

**(C)** Induction of autophagy in MEFs *Bax-/- / Bak-/-* GFP-LC3 during starvation. Western Blot of LC3 translocation and percentage of autophagic cells **(D)**, using Rapamycin (100 nM) 4 hours as positive control. DPQ (40  $\mu$ M) and 3MA (2 mM) were added as pre-treatment 1,5 hours before the HANK solution and maintained during the assay of starvation. These experiments were repeated 3 times with similar results.

**(E)** Cell death in MEFs *Bax-/- / Bak-/-* GFP-LC3 during starvation: levels of cell death measured by IP incorporation using flow cytometry during different times of nutrient deprivation with HANK solution. 3 independent experiments with 3 replicates per condition. **(F)**: reduction of the percentage of cell death with PARP-1 siRNA (50 nM) during starvation. The right panel show the silencing of PARP-1 48 hours after transfection. Similar results were obtained in 4 experiments with 4 replicates per condition.

**(G)** Activation of caspase 8 in MEFs 3T3 *parp-1-/-* under nutrient deprivation. MEFs 3T3 *parp-1+/+* and *parp-1-/-* were starved with HANK solution during 6 hours. The fragment of 38 KDa of caspase 8 processed was visualized by western blot, using a Jurkat cell total lysates as positive control of activation of caspase 8.  $\alpha$ - tubulin was used as loading control.

**(H)** Percentage of apoptotic cells under starvation. MEFs 3T3 *parp-1+/+* and *parp-1-/-* were starved during 8 hours and apoptotic morphology by nuclear condensation was evaluated after DAPI staining( brightly fluorescent pyknotic nuclei ) in a fluorescence microscopy. Similar results was observed in 3 independent experiments with 2 replicates per condition. Results obtained in 3 independent experiments. \* p <0.01, \*



\*p <0.001 as compared to starved MEFs 3T3 *parp-1+/+* . #p <0.01 and ## p <0.001 as compared to starved MEFs *Bax-/- / Bak-/-* GFP-LC3 .

**Figure 6: Deficient liver autophagy in PARP-1 knockout starved mice.** 2 hours after birth pups were separated from their mother and starved for 4 hours according to procedures approved by the bioethic committee of the CSIC. Pups were sacrificed and livers were removed from and fixed for TEM or lysed for WB analysis. A. Autophagosomes showing concentric membranes structures; ER, endoplasmic reticulum; L, lipid droplets; Ly, lysosomes; N,

**Figure 7: A PARP-1 is a positive modulator of starvation-induced autophagy.** Following nutrient starvation cells activate autophagy through the activation of AMPK/ inhibition of mTOR. Upstream events involve energy depletion, ROS production and DNA damage. Under this conditions, PARP-1 overactivation leads also to ATP depletion, acting as a feedback loop to reactivate autophagy. This stress signal when maintained leads eventually to cell death with autophagy.

**B. PARP inactivation delays autophagy and favors apoptosis.** In the absence of PARP-1 or after inactivation of PARP, ROS levels decreases and ATP drop is reduced. As consequence, the feedback loop reactivated by PARP do not take place, and apoptosis is triggered as a mode of cell death.

Figure 1

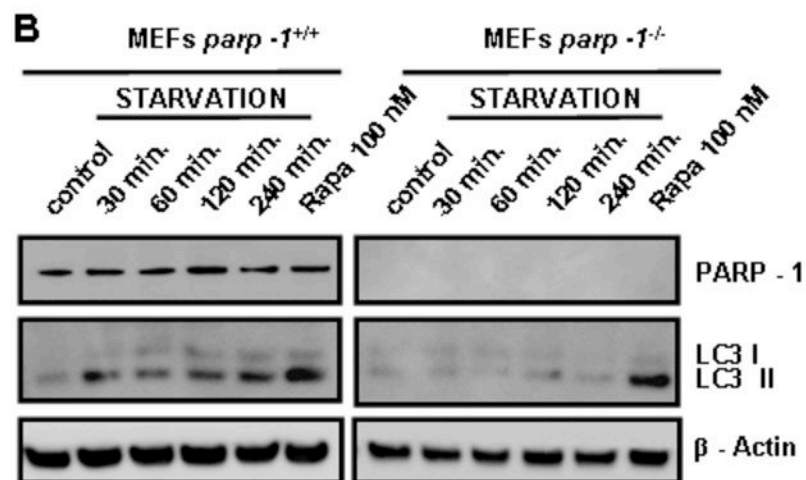
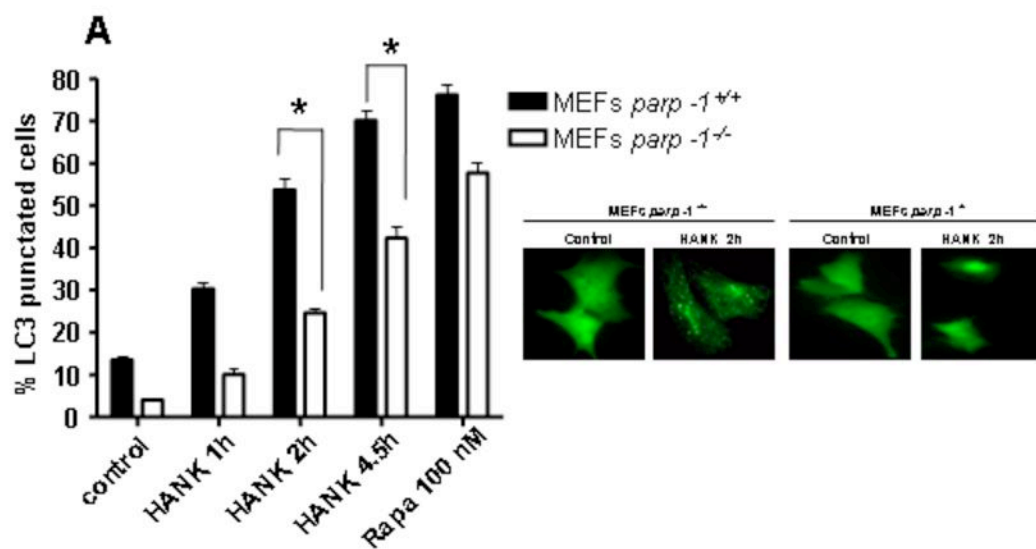


Figure 1

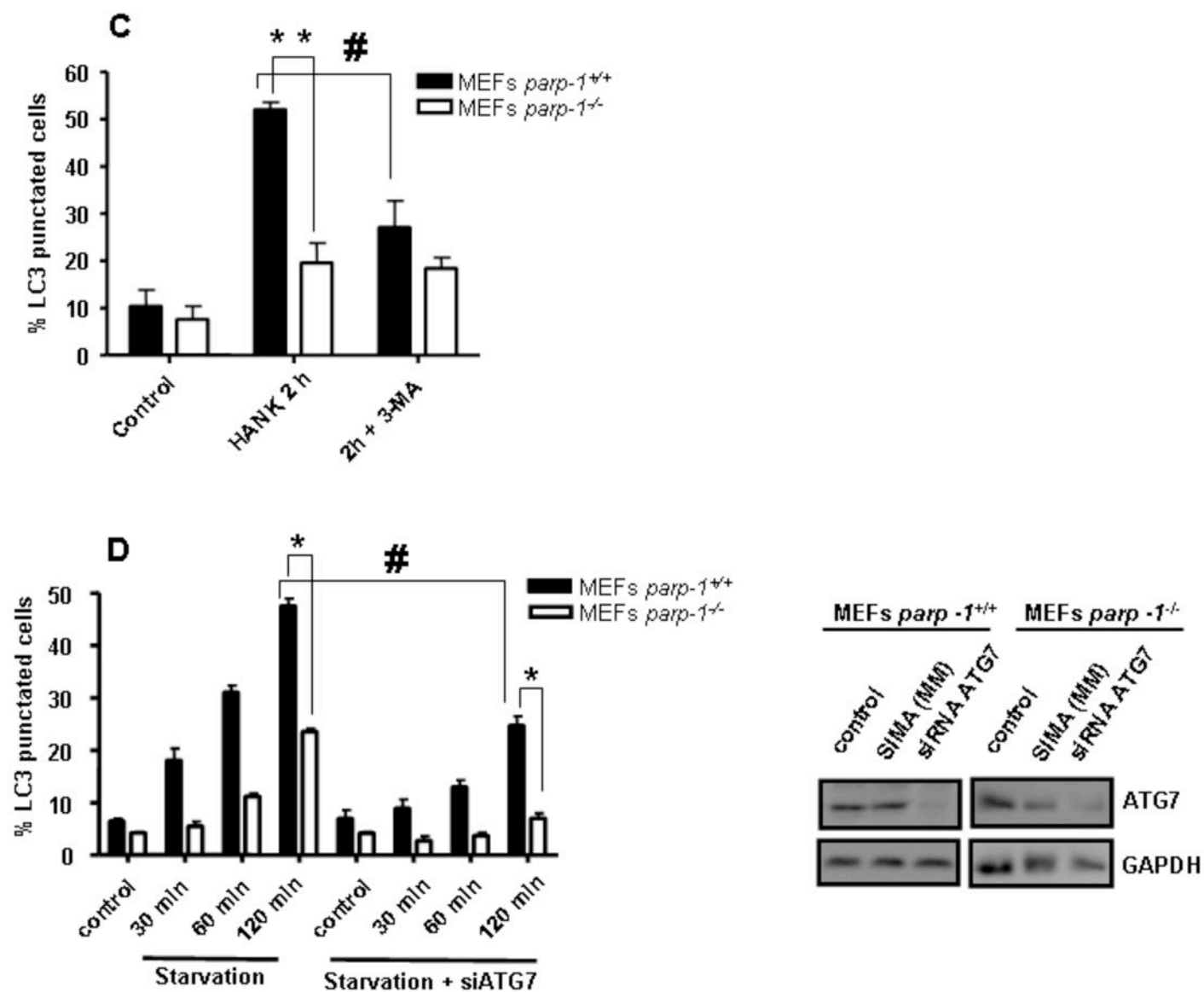


Figure 2

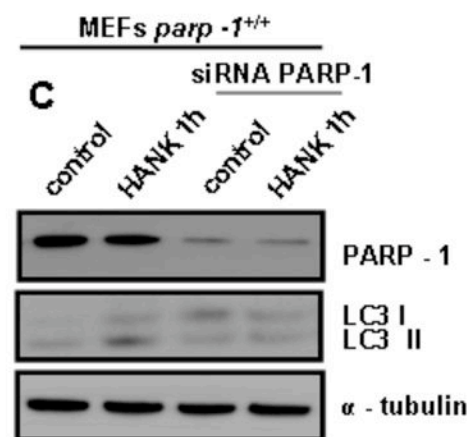
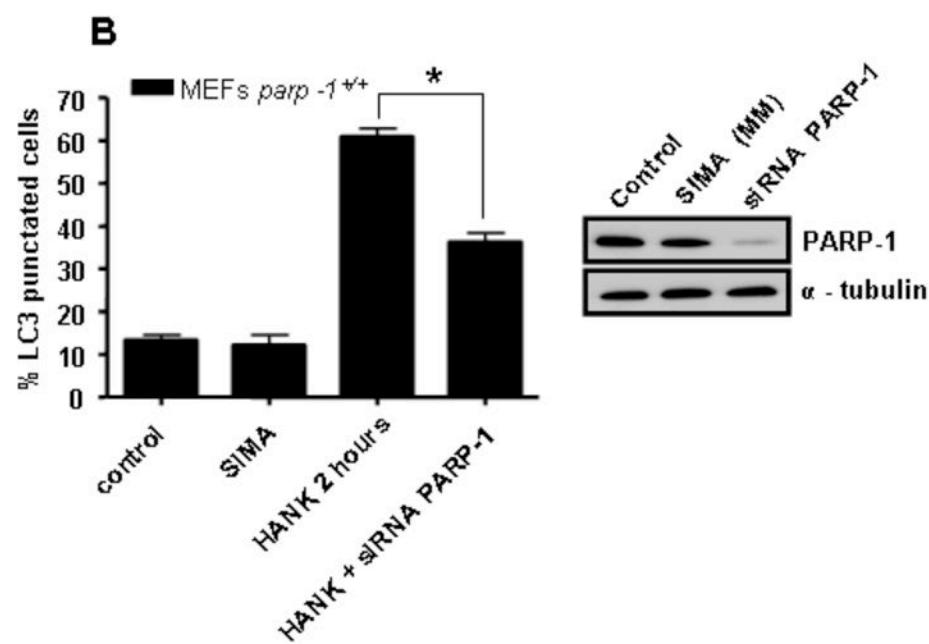
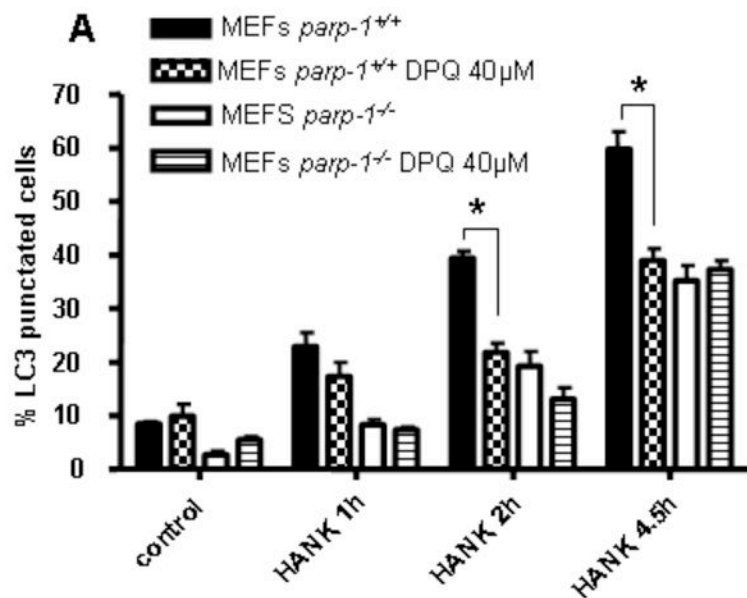


Figure 2

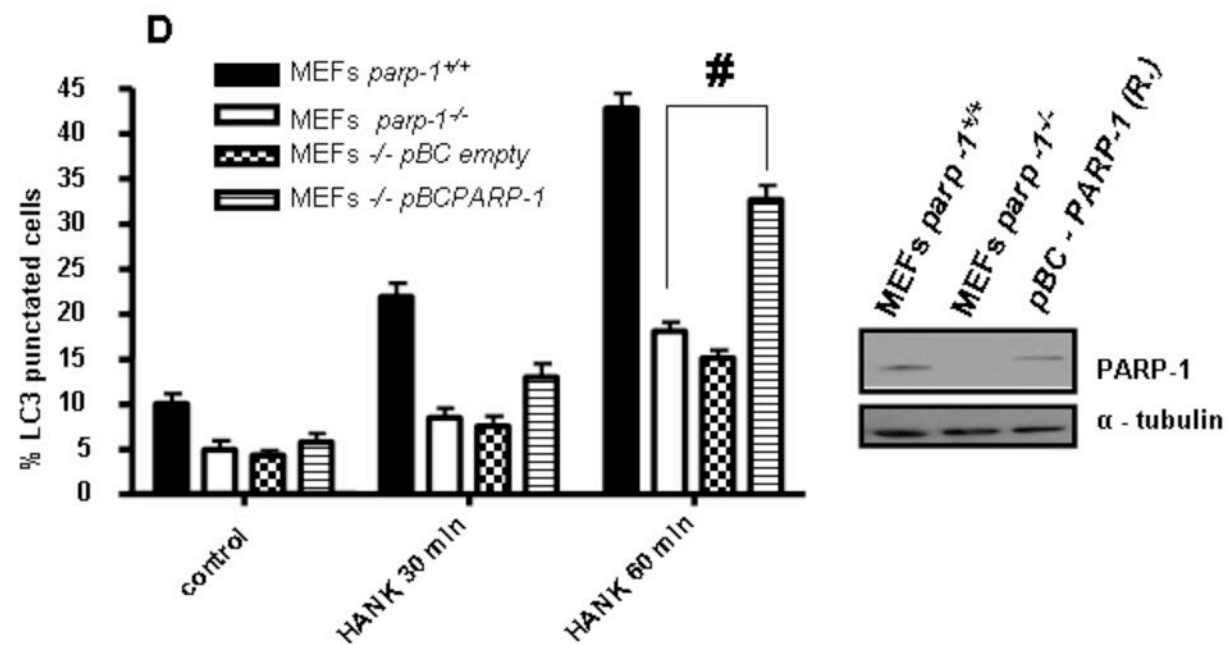


Figure 3

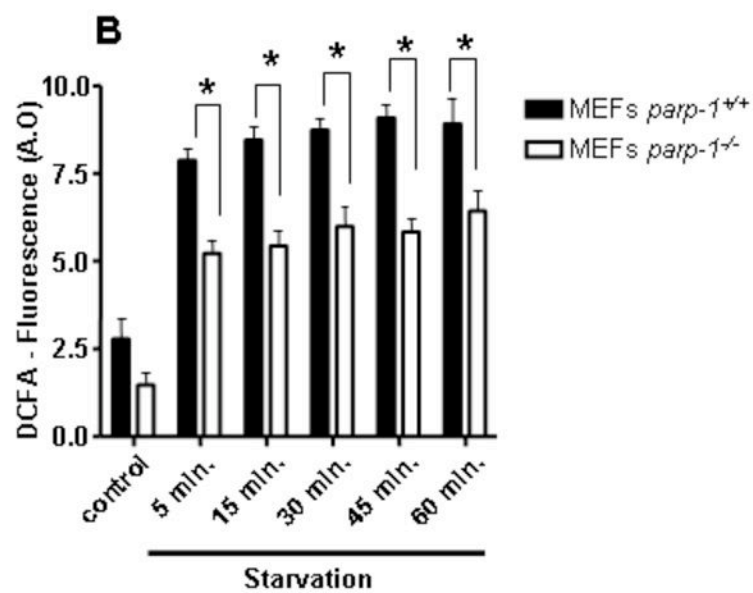
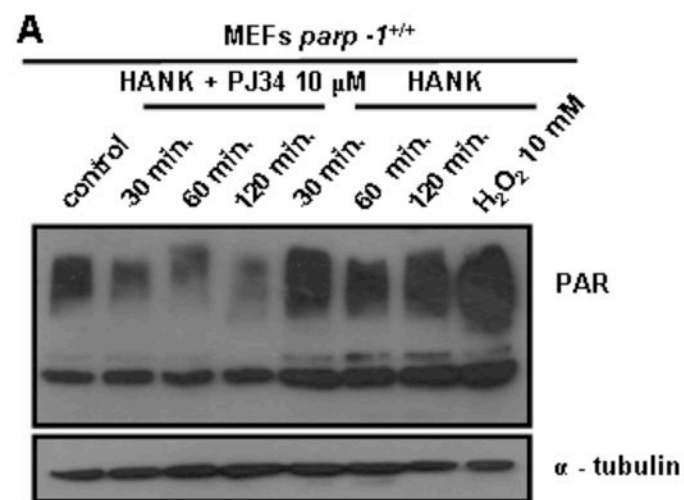


Figure 3

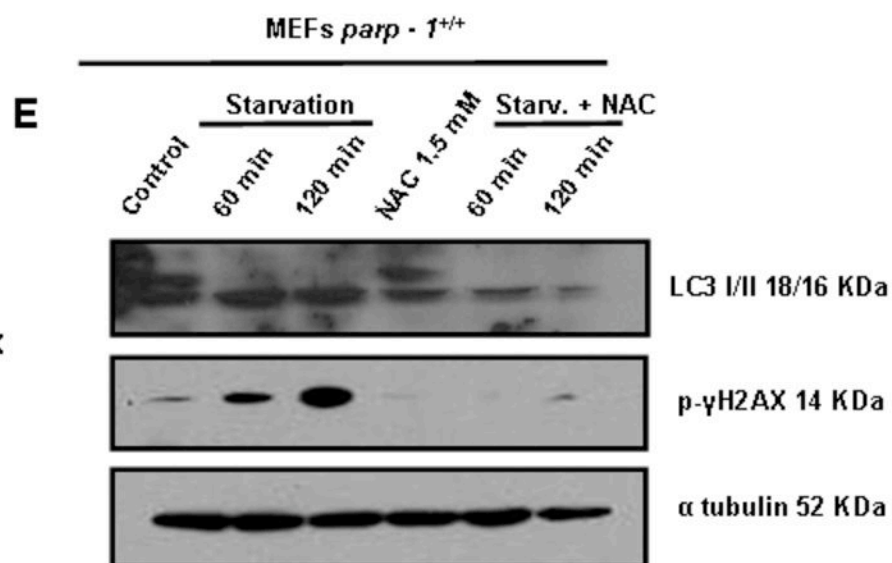
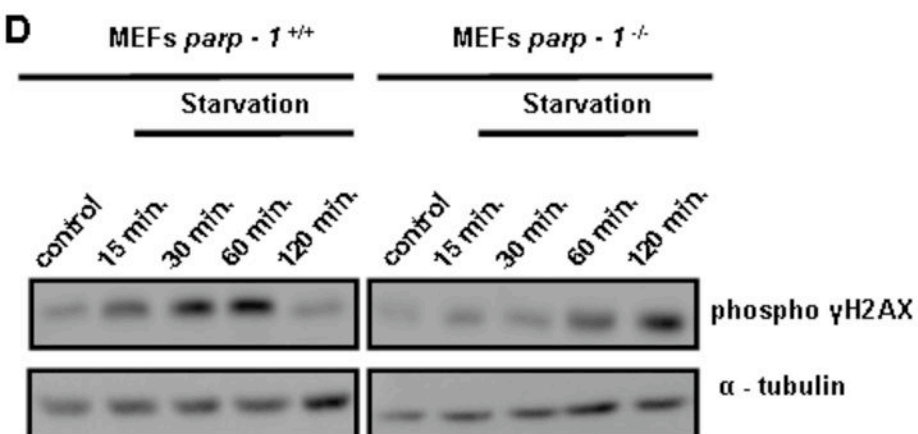
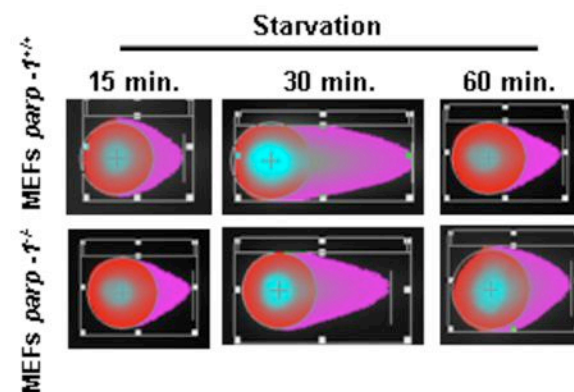
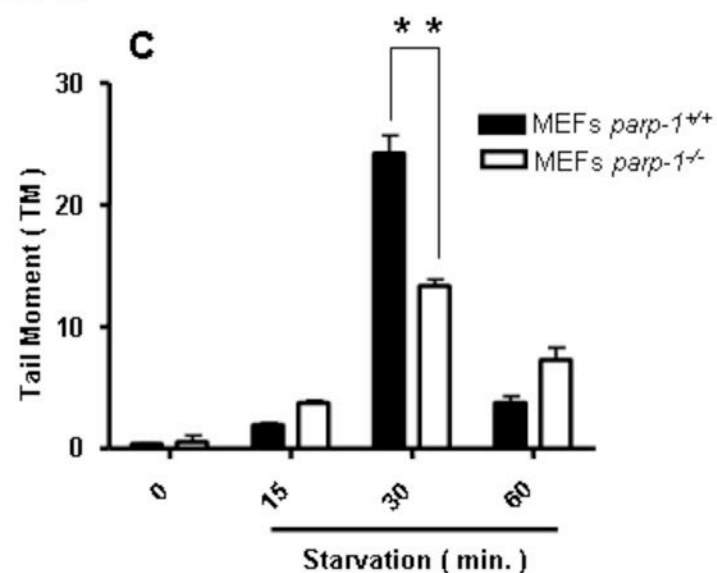
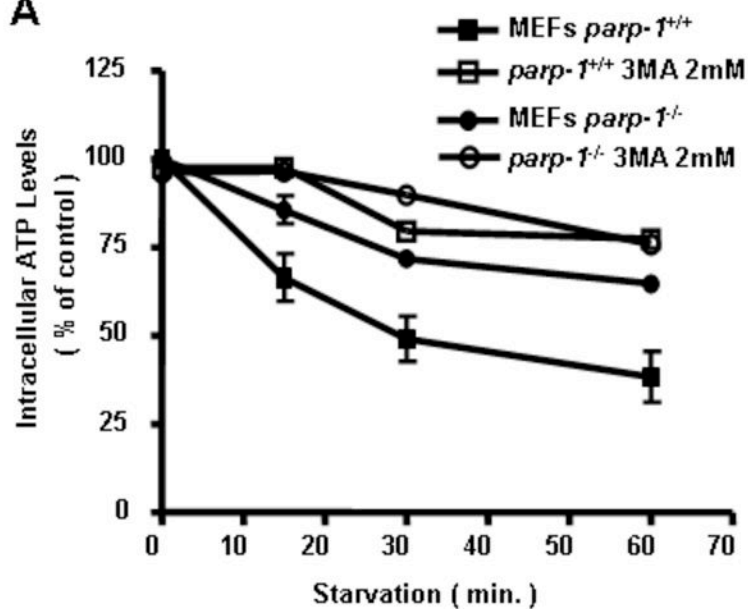
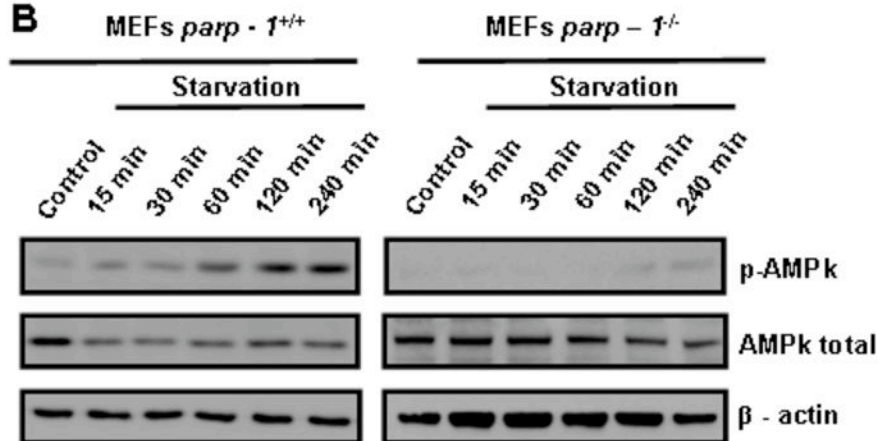


Figure 4

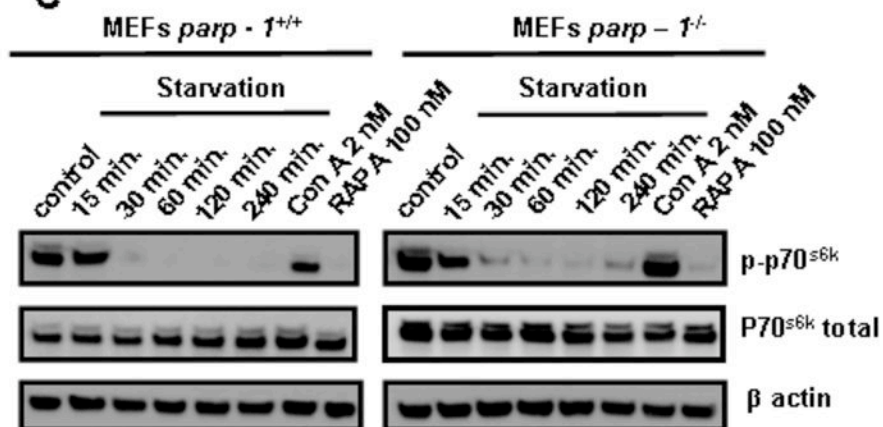
A



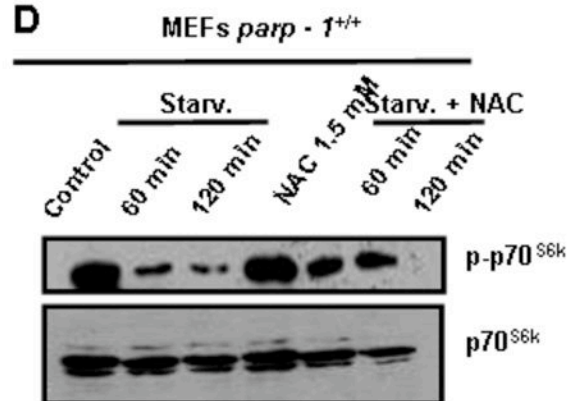
B



C

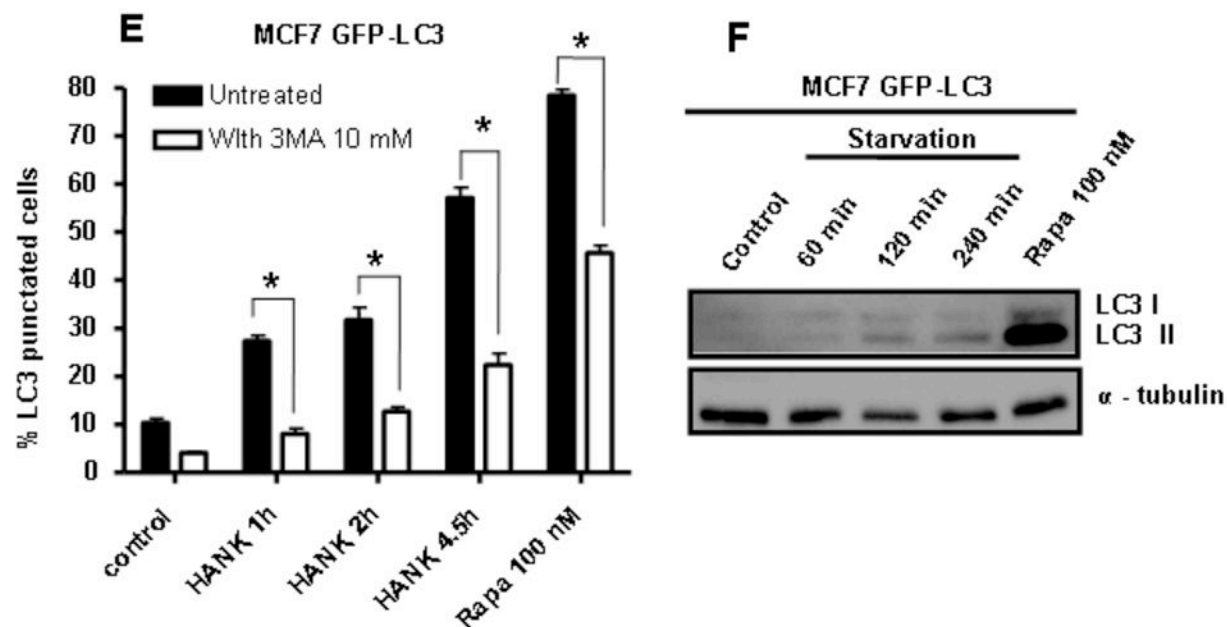


D





**Figure 4**



**G**

MCF7 GFP-LC3 UNTREATED

MCF7 GFP-LC3 siRNA PARP-1

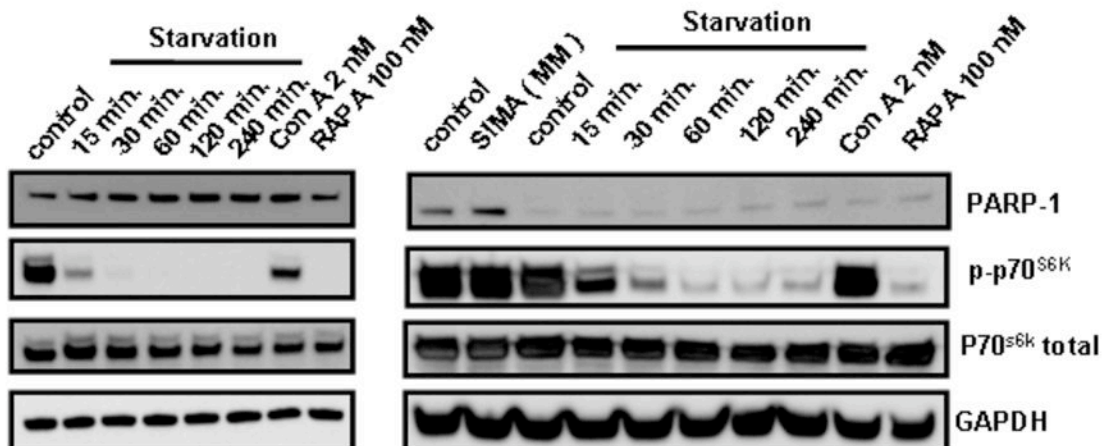
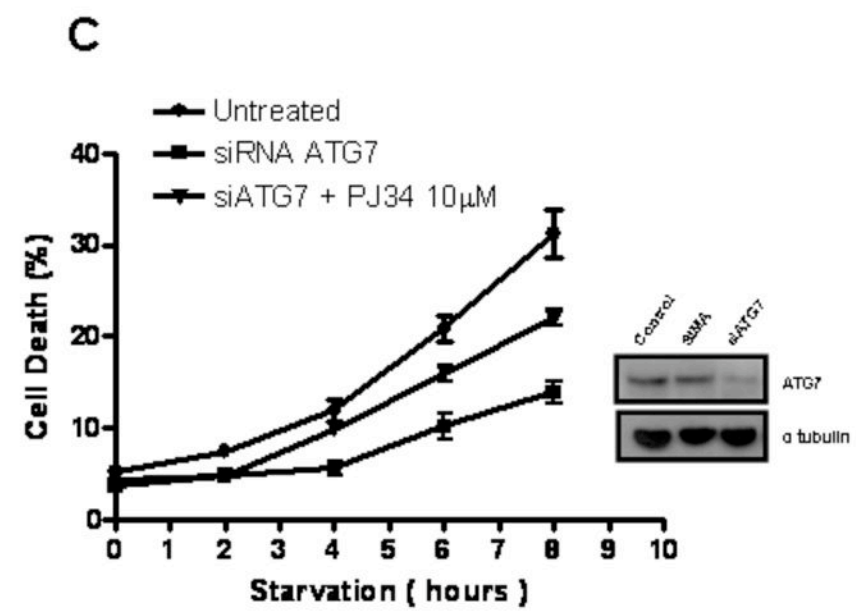
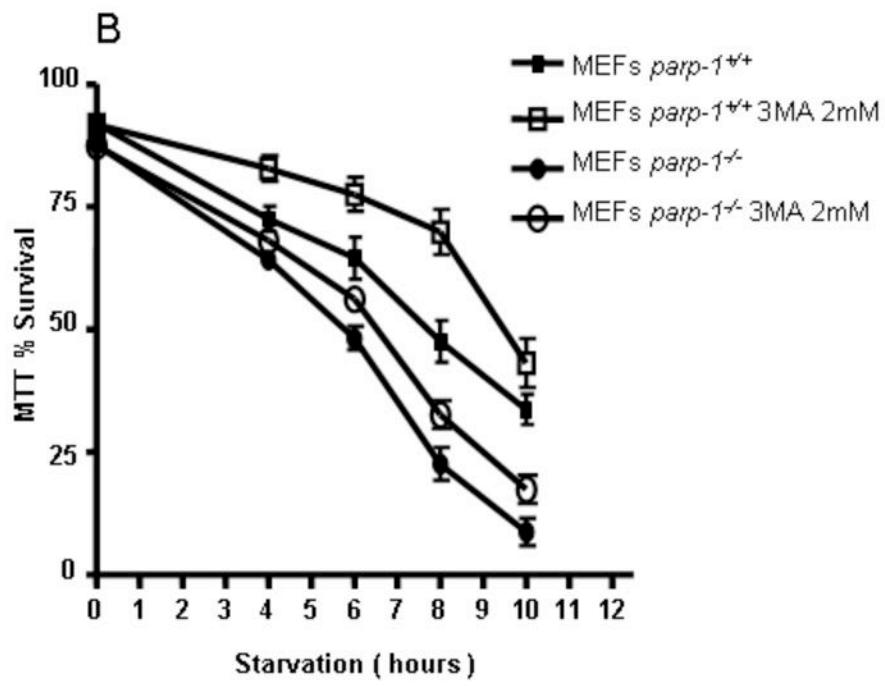
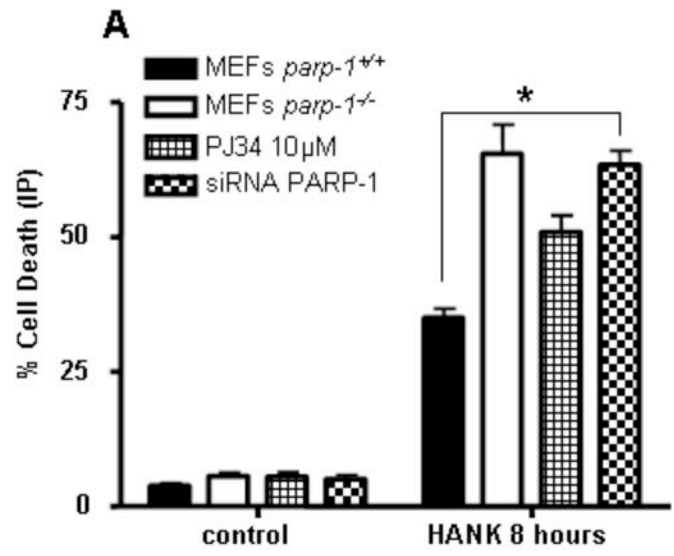
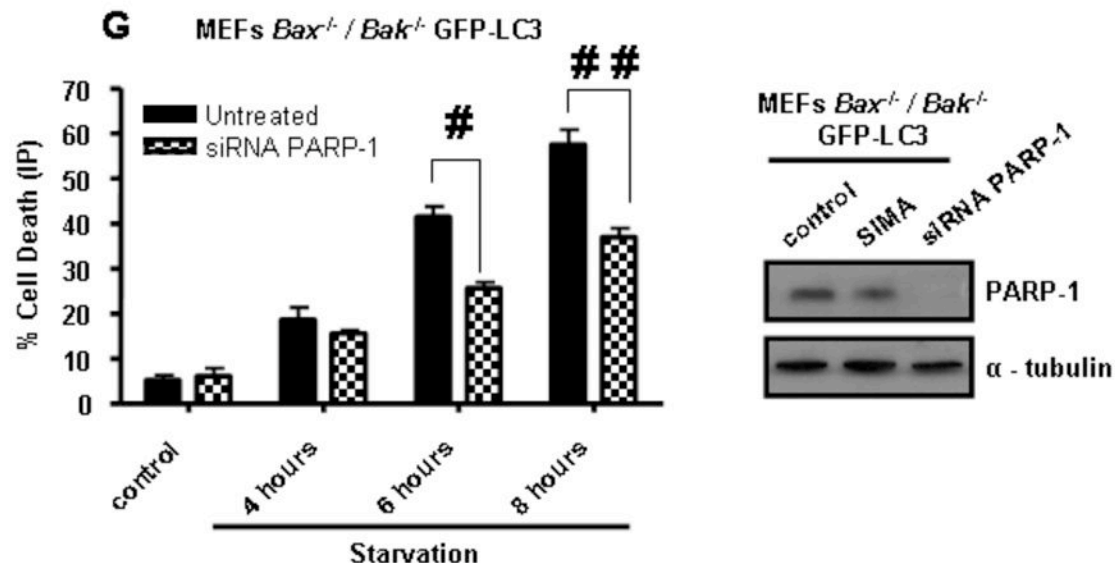
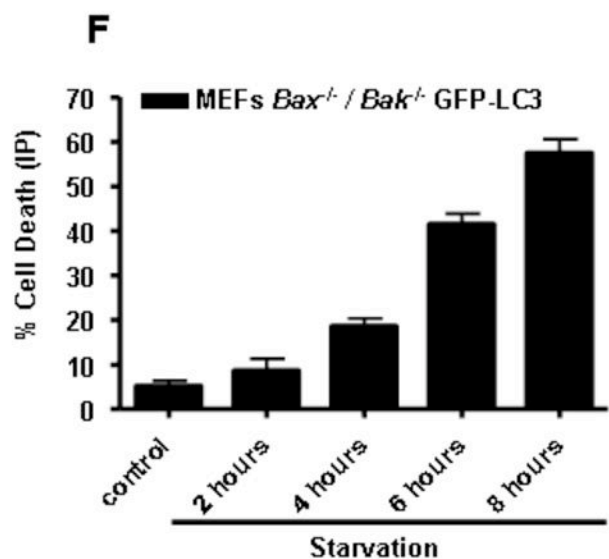
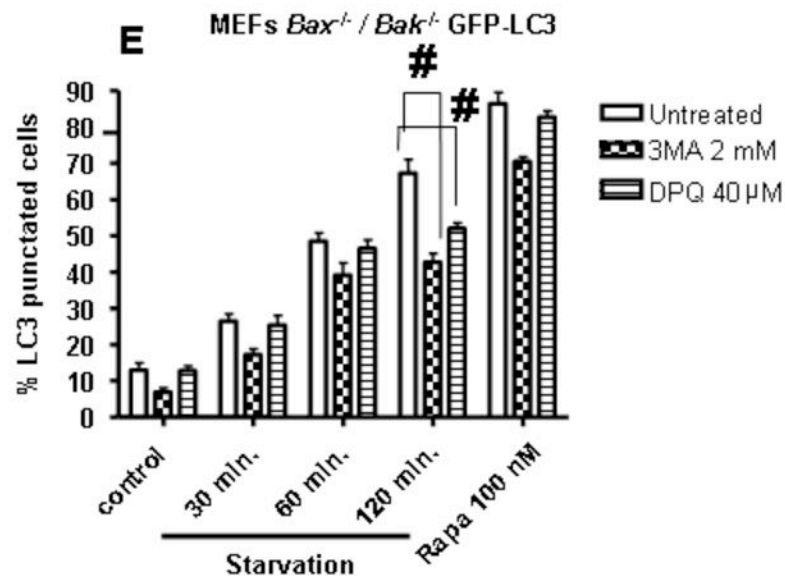
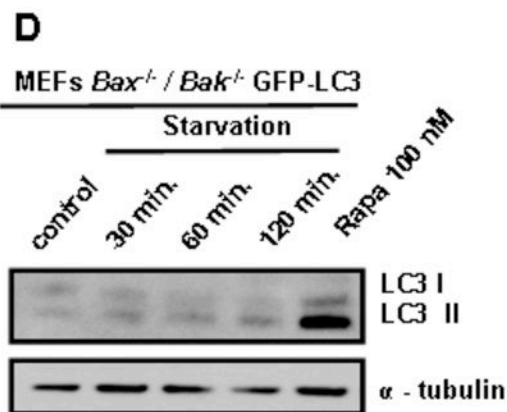


Figure 5





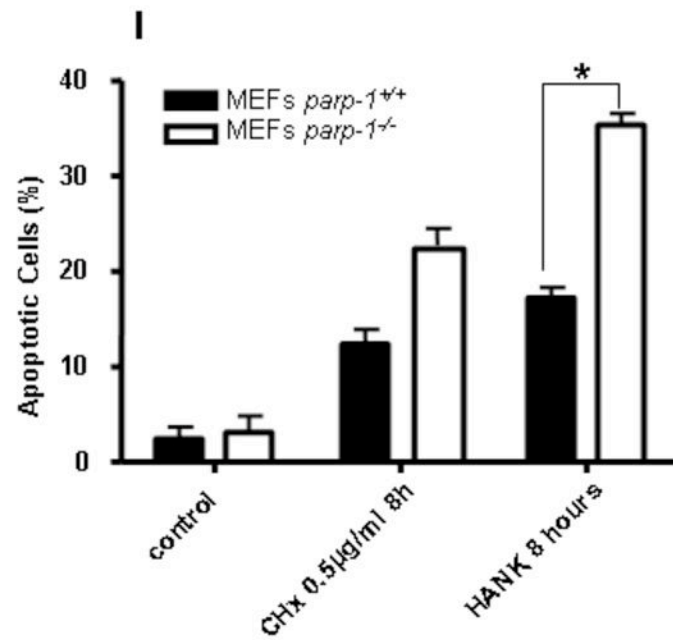
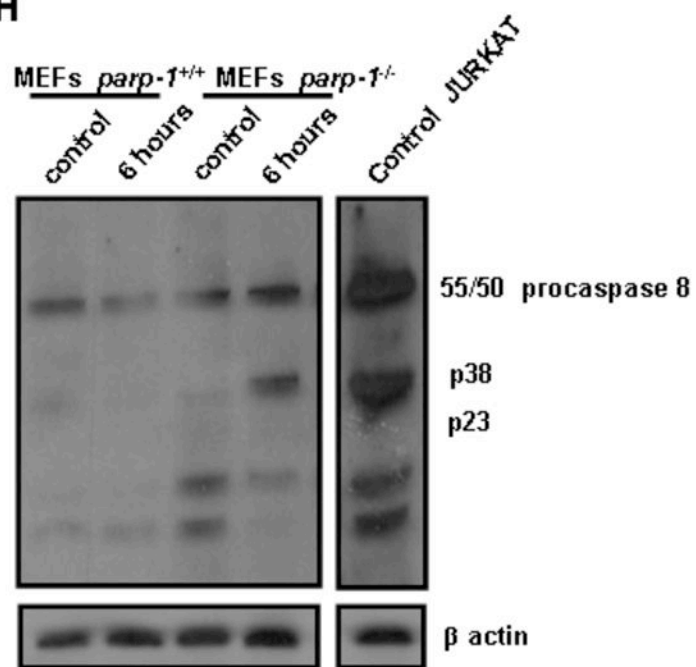
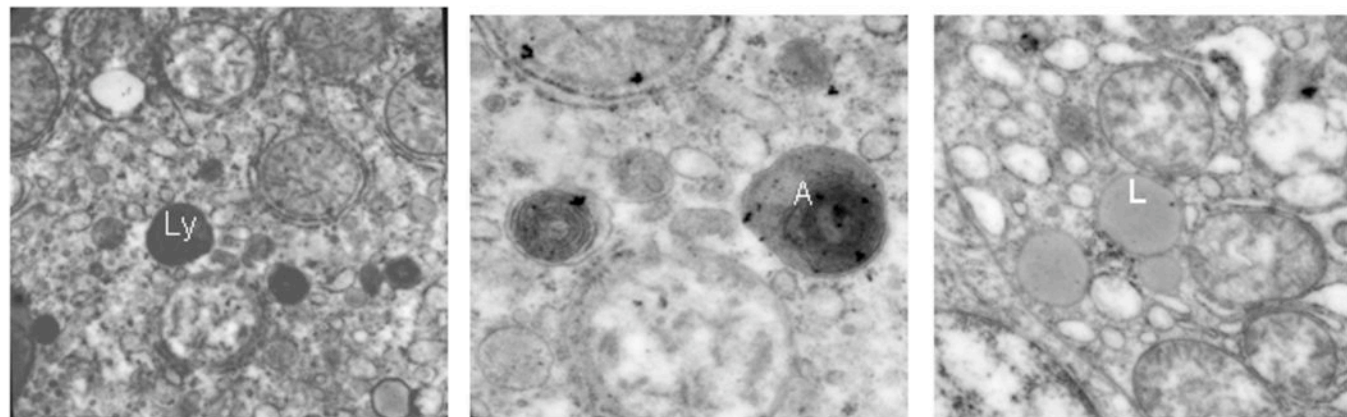
**H**

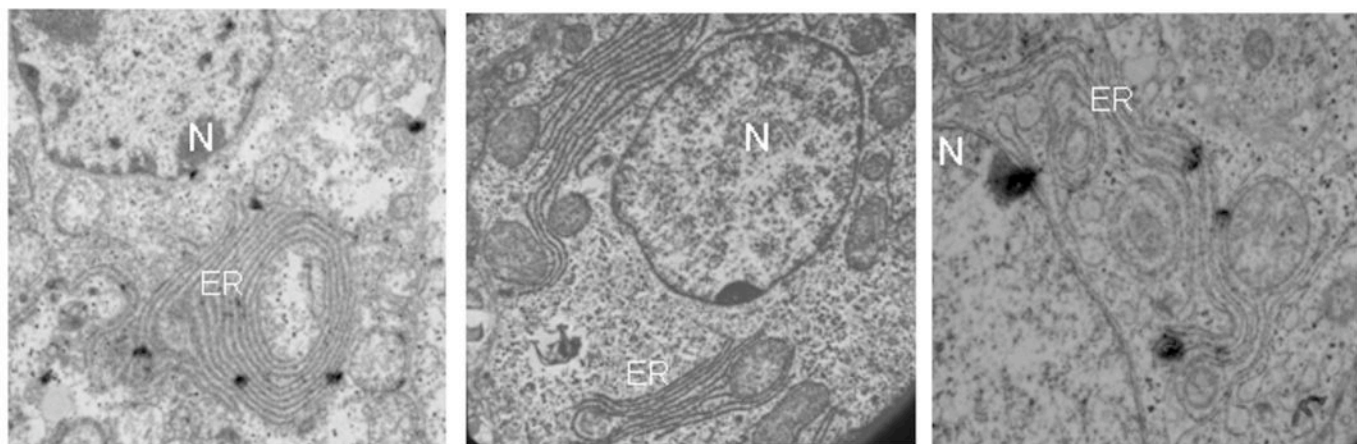
Figure 6

Liver *parp-1* wt mice (starved)

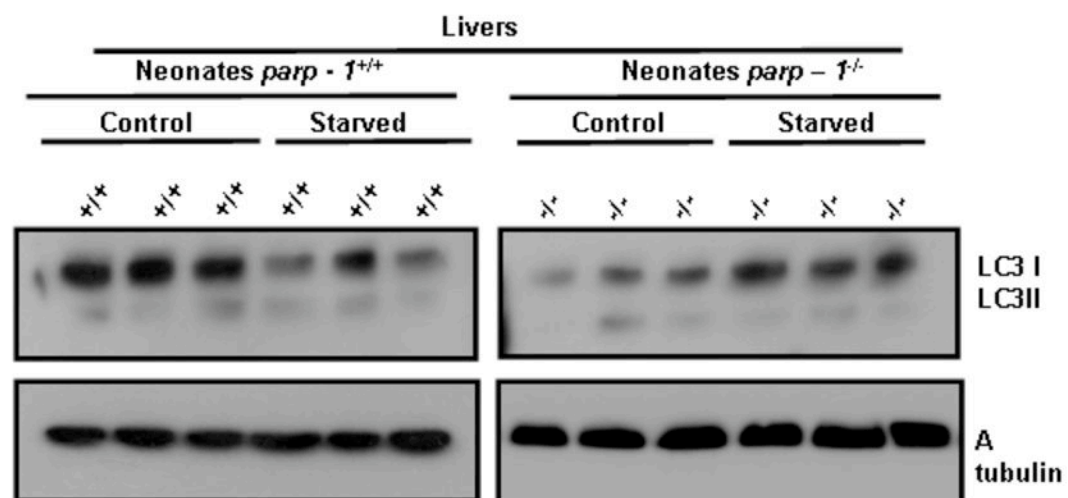
A



Liver *parp-1* KO mice (starved)



B



•t 2.29

•sDev 2.80

•p < 0.05

C

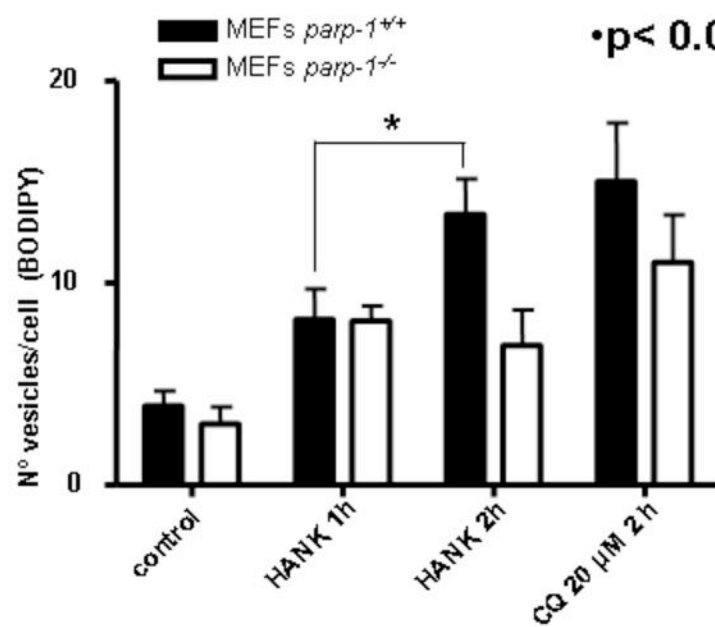
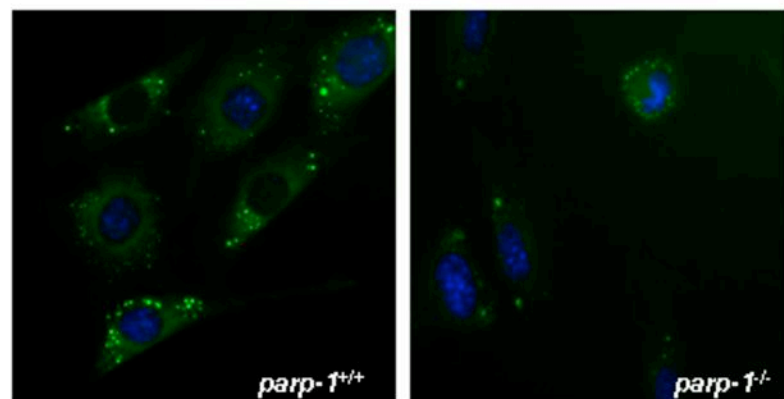


Figure 6

A

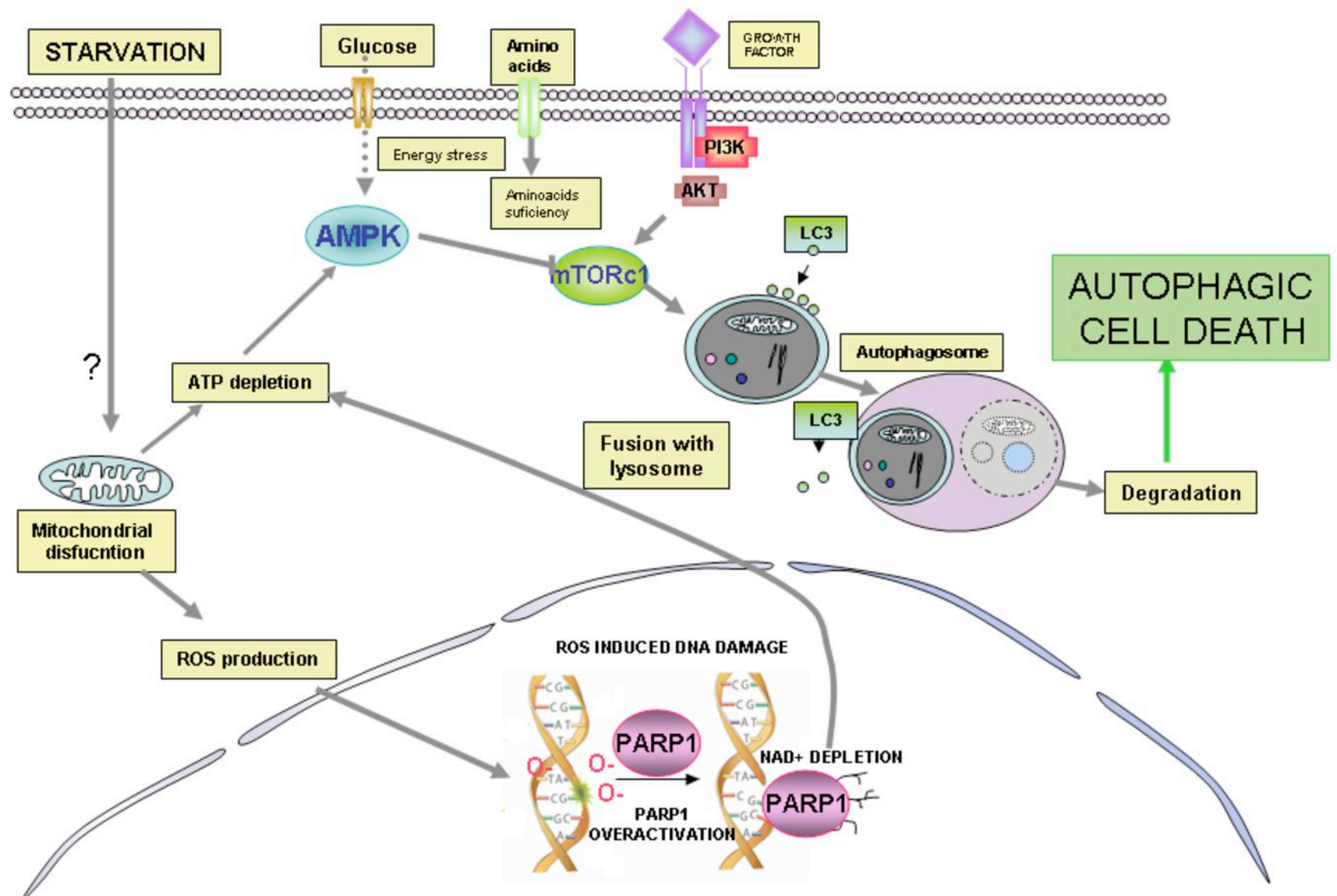
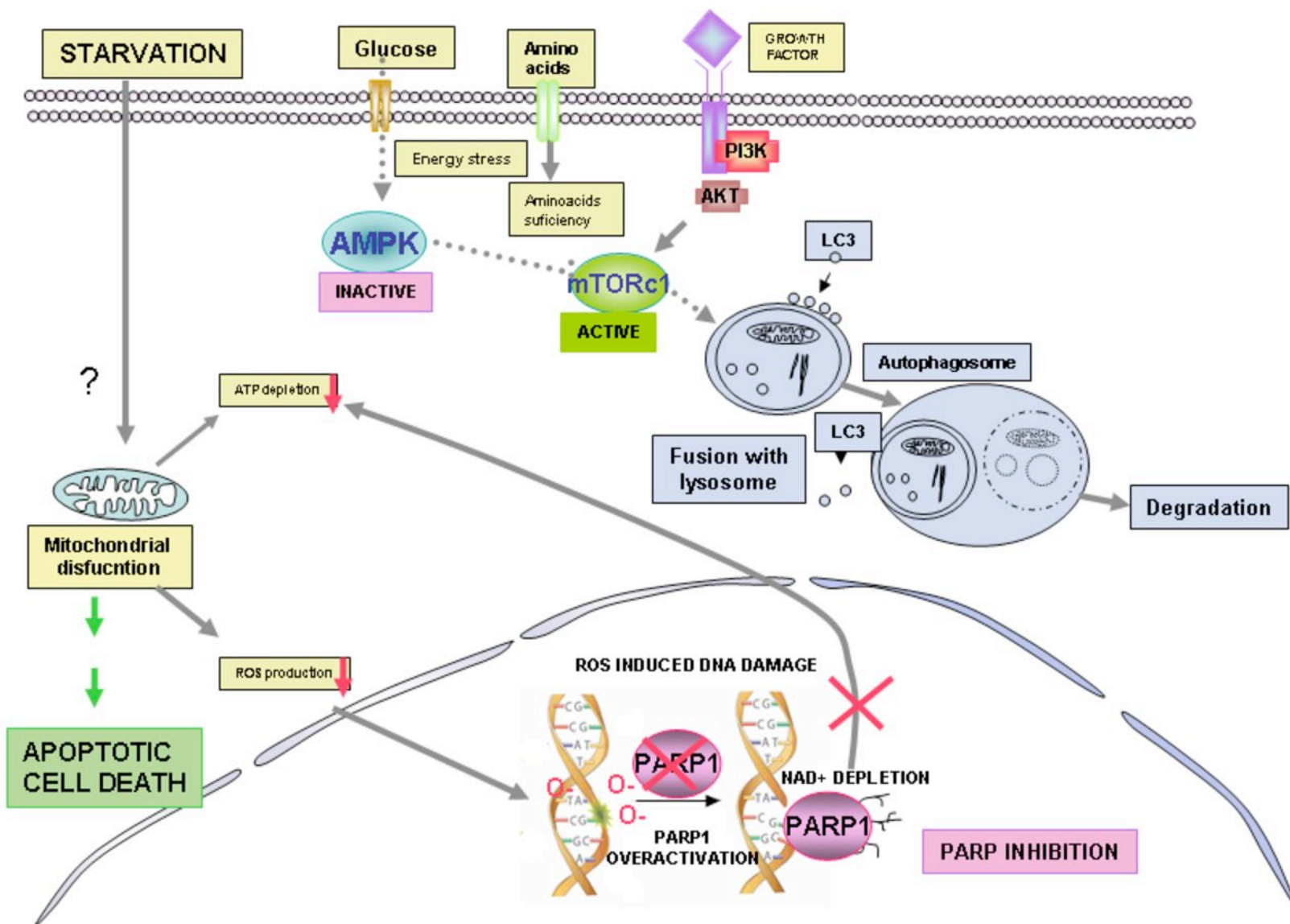


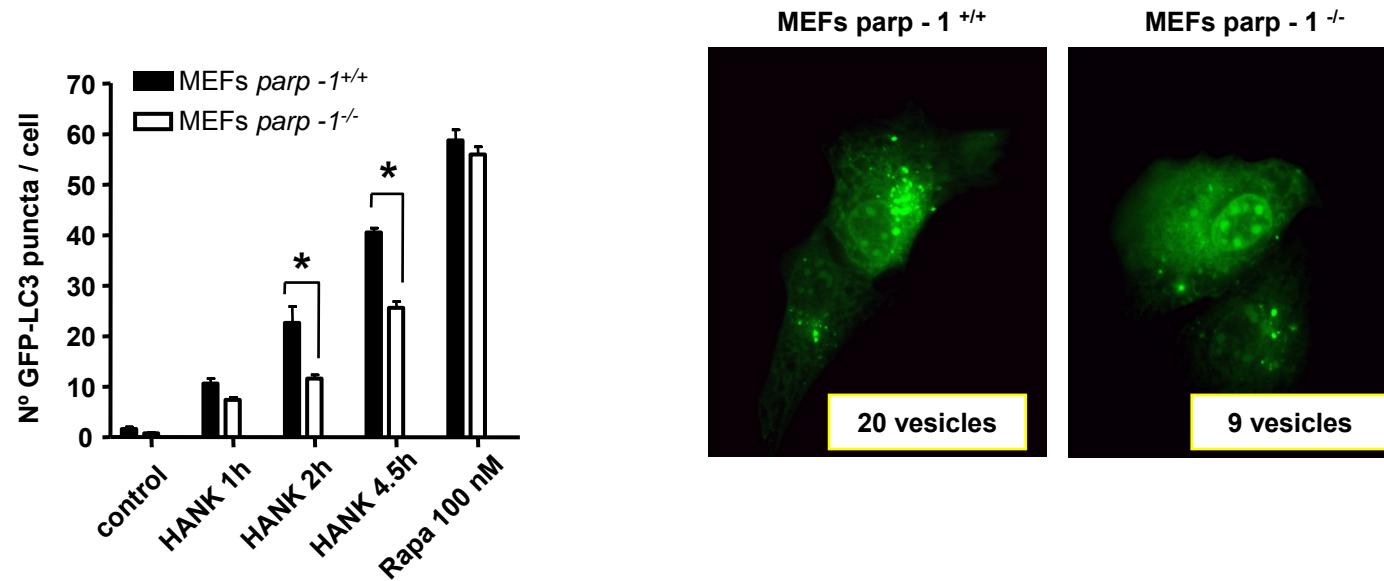
Figure 6

B



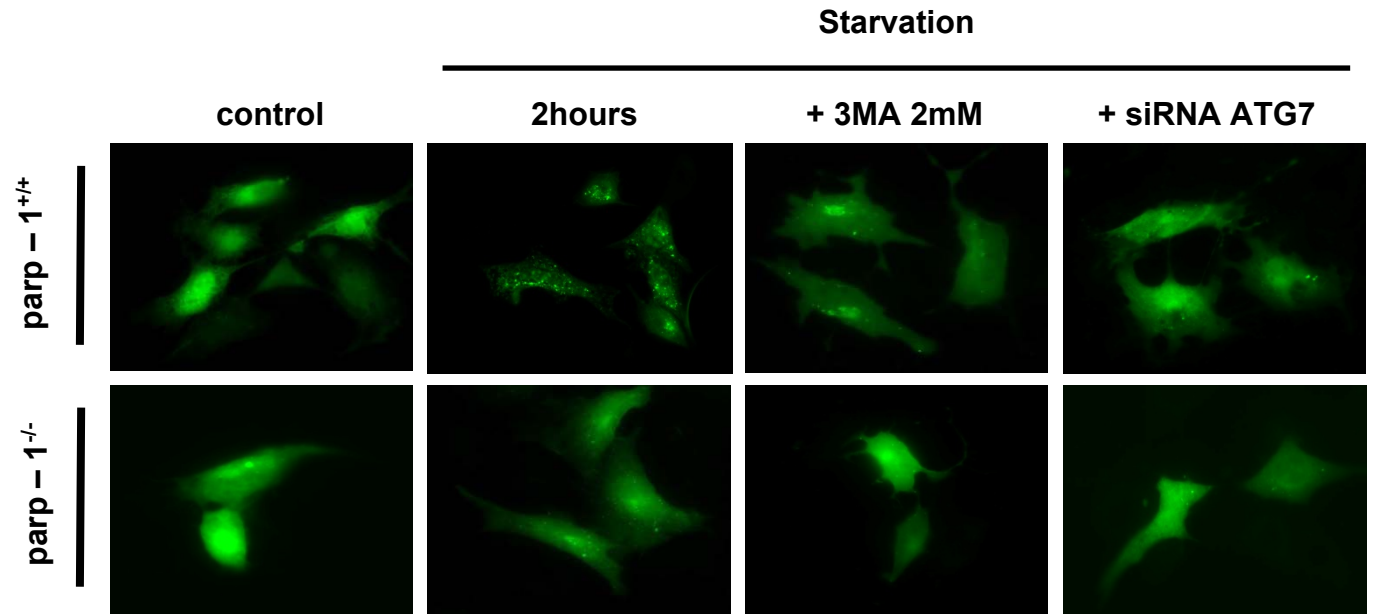


**FIGURE S1: MEFs *parp-1*<sup>-/-</sup> have reduced levels of autophagy after starvation with HANK solution**



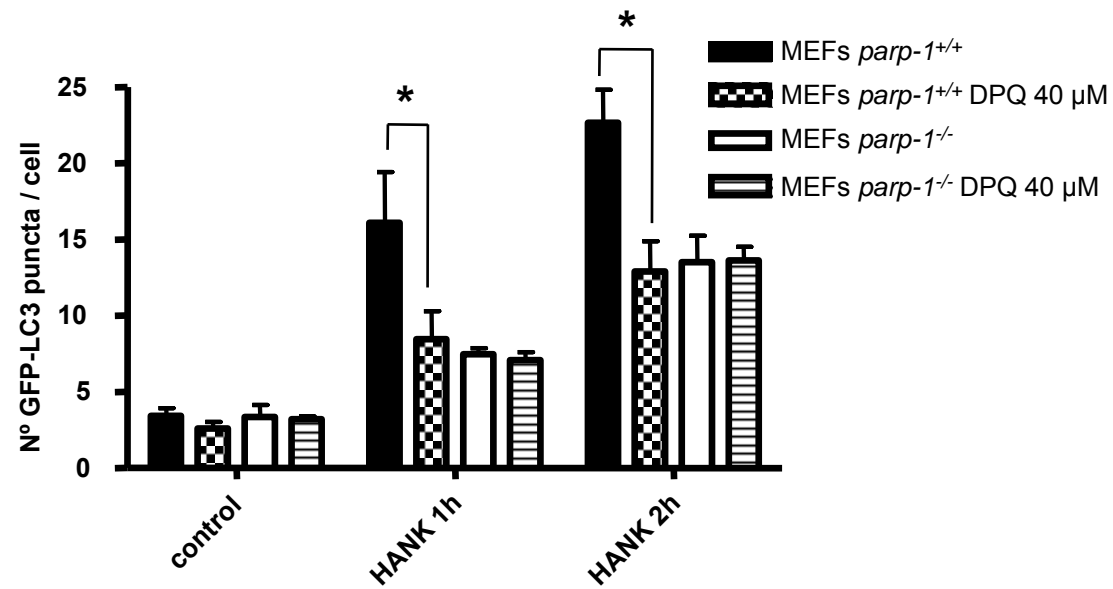
**Figure S1.** MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> transfected transiently with GFP-LC3. 24 hours after the transfection, were starved with HANK solution during 1, 2 and 4,5 hours and the number of vesicles positive to GFP were counted under fluorescence microscopy (LEFT PANEL). Rapamycin 100 nM 4 hours was used as positive control of induction of GFP-LC3-vesicles in both cell lines. The images shown the differences in the number of vesicles at 2 hours of starvation (RIGHT PANEL). Approximately 250 cells were counted in a fluorescent microscope in 3 independent experiments. \* p < 0.01 as compared to starved MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup>.

**FIGURE S2: Effect of the chemical inhibition and the silencing by siRNA of the autophagy during starvation in MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup>**



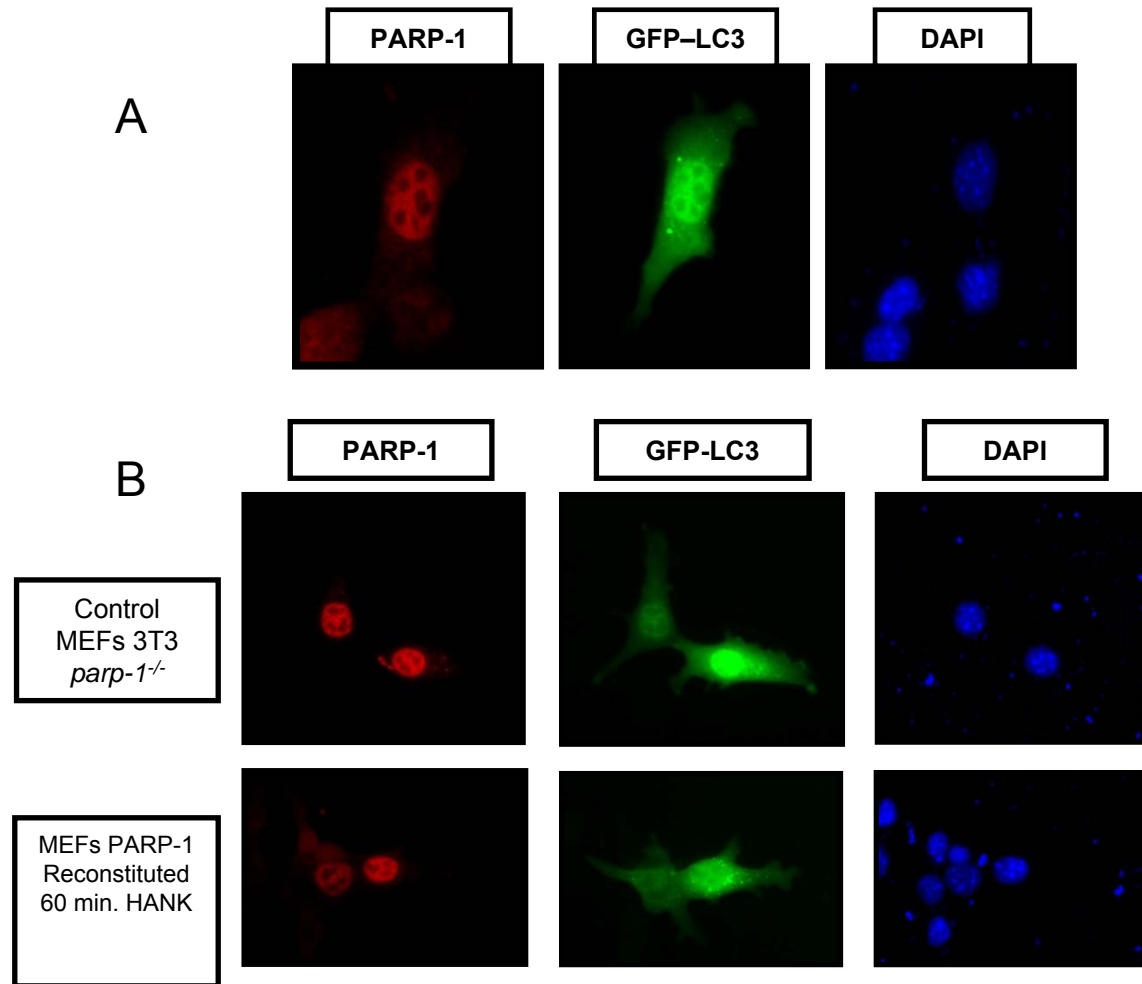
**Figure S2.** MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> transfected transiently with GFP-LC3 were starved in presence of 3MA 2 mM during the treatment with HANK solution and were silenced in Atg7 by siRNA technology. There was an important reduction in the typical GFP-LC3 pattern in MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup>, but the inhibition or silencing of autophagy had no effect in MEFs 3T3 *parp-1*<sup>-/-</sup> where the autophagy is delayed. Similar results were obtained in 3 independent experiments with fluorescence microscopy.

**FIGURE S3:** The PARP-1 inhibitor, DPQ, reduced the levels of starvation-induced autophagy in MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup>



**Figure S3.** MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> and *parp-1*<sup>-/-</sup> transfected transiently with GFP-LC3 were pre-treated with DPQ 40 μM during 1,5 hours and during treatment with HANK solution at 1 and 2 hours, DPQ was added again to maintain PARP-1 inhibited. Cells *parp-1*<sup>-/-</sup> were not affected by DPQ in the number of vesicles GFP-LC3 positive. Similar results were obtained in 3 independent experiments with fluorescence microscopy. \* p < 0.01 as compared to starved MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup>.

**FIGURE S4: Reconstituted expression of PARP-1 in MEFs 3T3 *parp-1*<sup>-/-</sup> restored the autophagy levels**

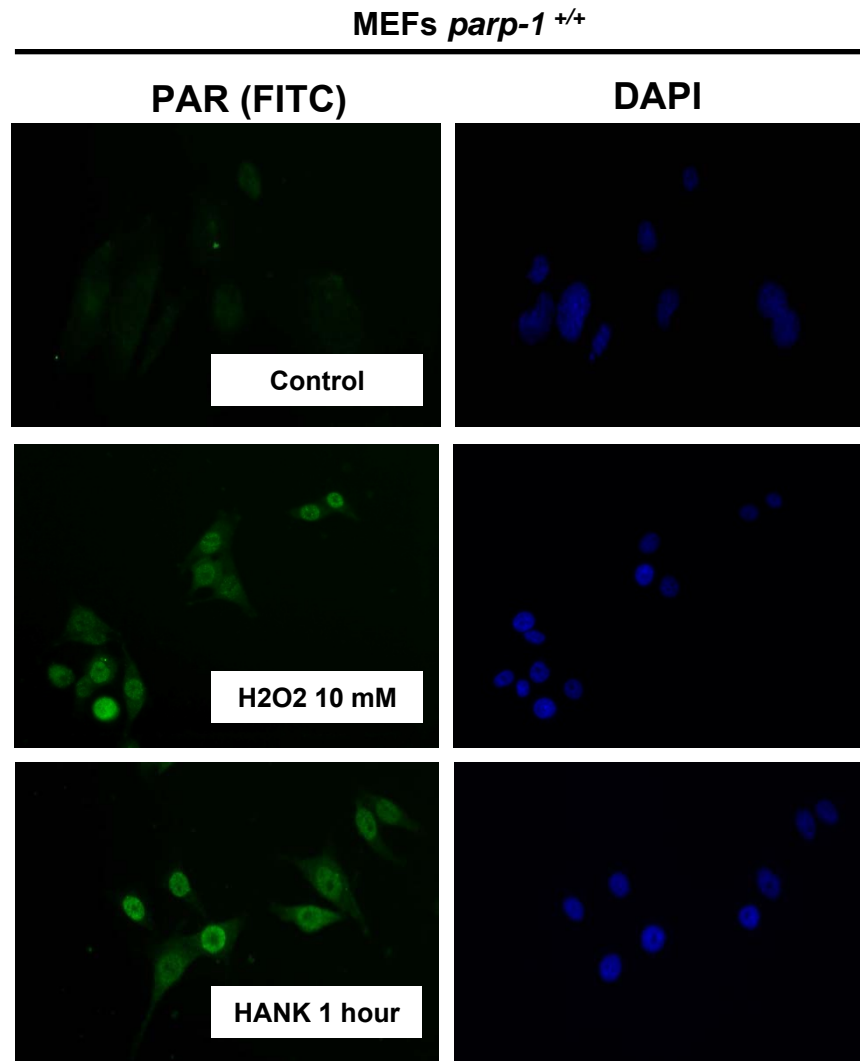


**Figure S4. A.** MEFs 3T3 *parp-1*<sup>-/-</sup> co-transfected with GFP-LC3 and pBC-PARP-1. PARP-1 located in nucleus and GFP-LC3 homogeneously distributed in cytosol and nucleus.

**B.** MEFs 3T3 *parp-1*<sup>-/-</sup> with PARP-1 restored, recovered the response to starvation and the number of vesicles at 60 minutes of treatment with HANK solution, increased.

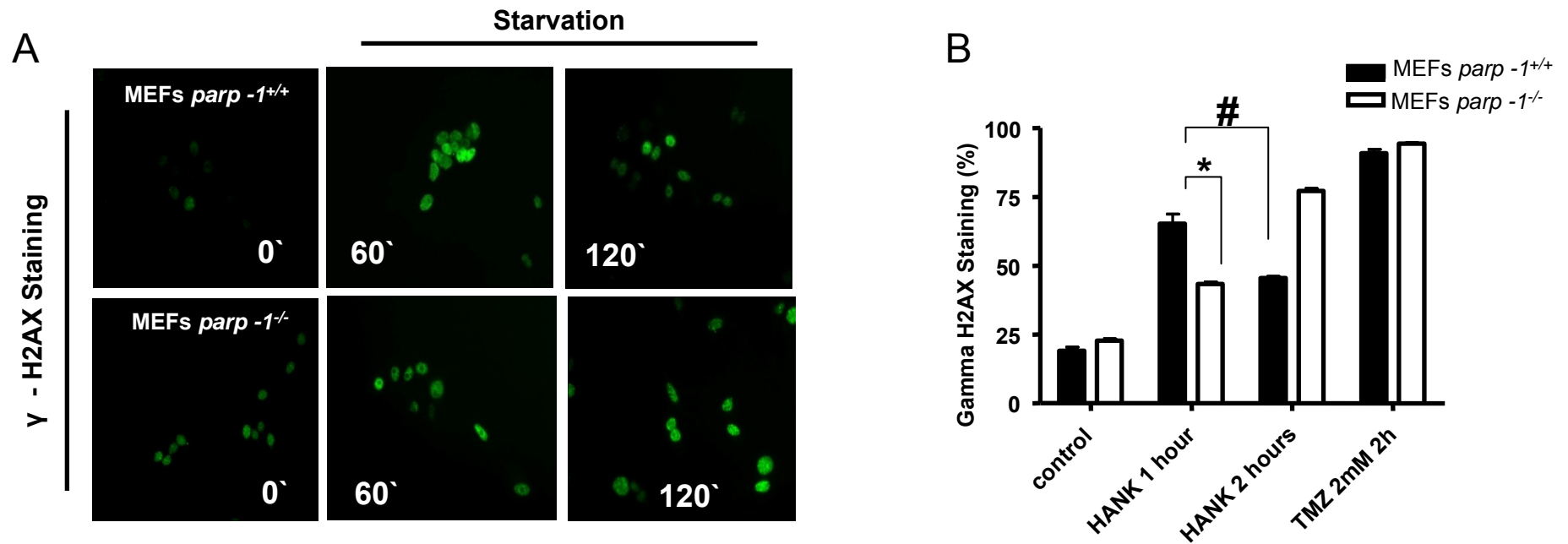
Similar results were obtained in 4 independent reconstitution assays by immunofluorescence.

FIGURE S5: PAR polymer production confirms PARP-1 over-activation during starvation



**Figure S5.** Immunofluorescence of polymer of poly(ADP-ribose) in MEFs 3T3 *parp-1*<sup>+/+</sup> confirms PARP-1 activation during nutrient deprivation. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM act as positive control of activation of PARP-1. This signal is similar to PAR signal obtained during the HANK solution treatment. This results was confirmed in 4 independent immunofluorescence assays.

FIGURE S6:  $\gamma$  - H2AX Staining during starvation in MEFs 3T3 *parp-1<sup>+/+</sup>* and *parp-1<sup>-/-</sup>*

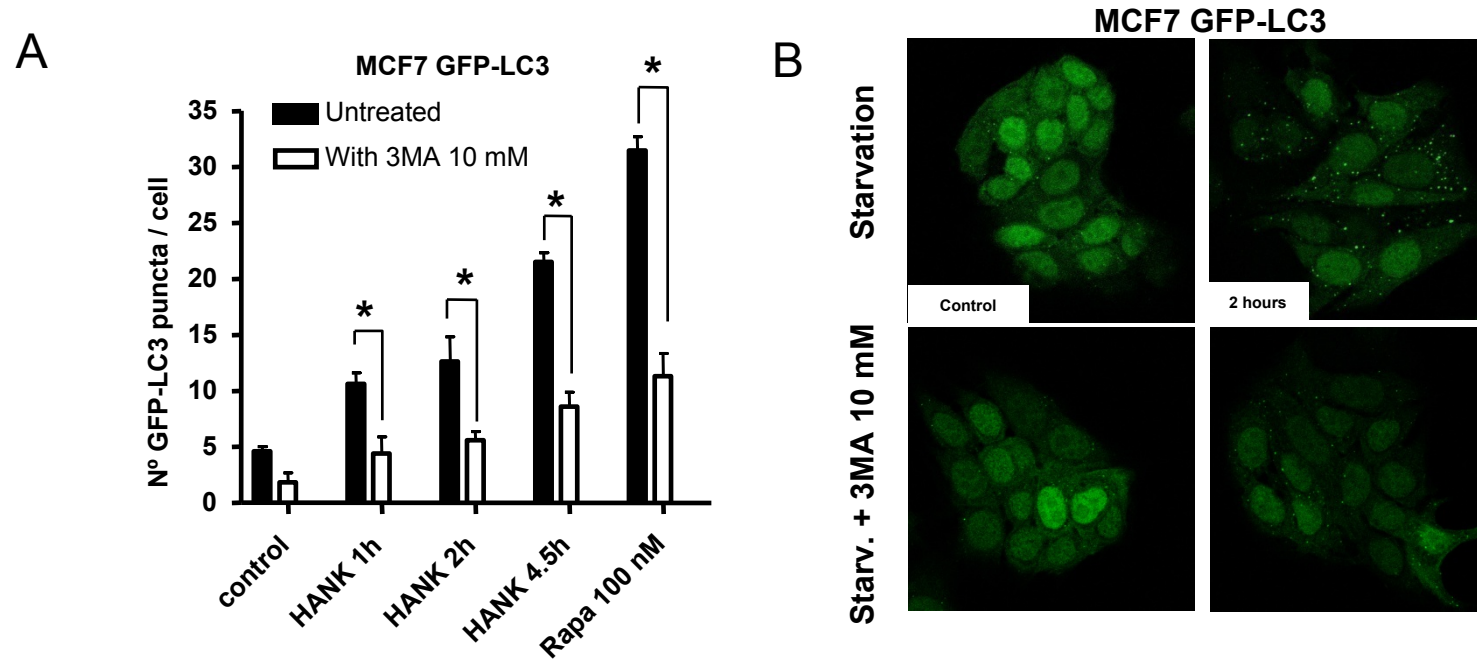


**Figure S6. A.** FIRST PANEL: Foci of  $\gamma$ -H2AX histone in MEFs 3T3 *parp-1<sup>+/+</sup>* and *parp-1<sup>-/-</sup>* at different times of nutrient deprivation with HANK Solution. The intensity at 120 minutes is higher in MEFs 3T3 *parp-1<sup>-/-</sup>*. Similar results was obtained in 3 independent assays.

**B :** Recount of cells *parp-1<sup>+/+</sup>* and *parp-1<sup>-/-</sup>* with the typical staining for Gamma H2AX histone during starvation. The percentage of cells *parp-1<sup>-/-</sup>* at 2 hours of starvation confirm the result obtained by immunofluorescence. Temozolomide 2mM 2 hours was used as positive staining of H2AX foci ( DNA damage ).

\*  $p < 0.01$  and # $p < 0.01$  as compared to starved MEFs 3T3 *parp-1<sup>+/+</sup>*

**FIGURE S7: Typical autophagic pattern in MCF7 GFP-LC3 cells during starvation**



FIRST PANEL: Number of GFP-LC3 vesicles in MCF7 GFP-LC3 cells at different times of nutrient deprivation with HANK solution. Effect of 3 mM 10 mM in the levels of GFP-LC3 puncta / cell. \*  $p < 0.001$  as compared to starved cells.

SECOND PANEL: Confocal images during starvation of MCF7 GFP-LC3 cells co-treated with 3MA 10 mM at 2 hours of treatment with HANK solution. Similar images were obtained in 3 microscopy assays.